

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Biologická fakulta



magisterská práce

# **Reprodukční strategie a genetická variabilita vybraných populací druhu *Gentiana pannonica* SCOP.**



Ester Hofhanzlová  
2005

Školitel: RNDr. Zdeňka Křenová, Ph.D.

HOFHANZLOVÁ E. (2005): Reprodukční strategie a genetická variabilita vybraných populací druhu *Gentiana pannonica* SCOP. [Reproduction strategy and genetic variability among various populations of the species *Gentiana pannonica* SCOP. Master thesis, in Czech.] – 43 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The reproduction strategy and genetic variability of *Gentiana pannonica*, an endangered species in the Czech Republic, were studied. The differences of vegetation composition, seedlings recruitment, seed set and genetic variation within and among six various populations *G. pannonica* in the Šumava Mts. and two populations in the Alps of this species were investigated in a field. The vegetation composition differs between primary and secondary habitat of *G. pannonica* and seedlings recruitment was recorded only in primary habitat. The reproduction output of the study species is probably influenced by sufficient amount of pollinators. No serious genetic diversity between populations in the Šumava Mts. and the Alps was found. The genetic differences were found only between populations on the primary habitats and populations on the secondary mountain meadows. The higher genetic variability was found out within primary populations than within secondary populations, which were probably affected by processes such as bottleneck, genetic drift and founder effect due to changes of their distribution during the Holocene period.

Tato práce byla podpořena studentskými granty – *Mattoni awards for Studies Biodiversity and Conservation* (USA) v roce 2003 a 2004.

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou diplomovou práci vypracovala samostatně pouze s použitím citované literatury.

V Českých Budějovicích dne 23. 4. 2005

Ester Hofhanzlová

„Doufám, že odpověď na otázku, jaký smysl má příroda, nebudeme nikdy znát. Mnohem důležitější je tento smysl cítit. Nejedná se jen o vědění, ale i možnost ztráty. Přírodní vědy nám na tyto otázky neodpovídají, ale dělají něco mnohem důležitějšího – postupně a skoro neviditelně budují nový pocit světa, který je založen na jakési vzájemně provázené síti života.“

Václav Cílek

## Poděkování

Je velmi mnoho těch, kterým patří můj velký dík za to, že tato práce spatřila světlo světa. Chci proto poděkovat všem, kteří mi v průběhu práce podali pomocnou ruku nebo mě povzbudili v těžkých chvílích, které každé lidské konání vždy provázejí.

Své školitelce Zdeňce Křenové děkuji za všechny rady a připomínky, které mi během práce poskytla. Děkuji za její vlídný a přátelský přístup, pomoc v terénu a nesmím opomenout, že bez izolačního Kitu, který mi poskytla, by část této práce vůbec nevznikla.

Největší dík patří ovšem Liborovi za jeho povzbuzování, řadu podmětných připomínek a vůbec všeobecnou podporu a pomoc při práci v terénu i při sepisování práce. Díky jeho pomoci jsem mnohem snáze zvládala všechny nástrahy a překážky, které mě neustále provázely. Velmi chci poděkovat také své rodině, zvláště mamince, která mi po celou dobu mého studia byla neochvějnou oporou a všeobecně mě podporovala.

Za zprostředkování provedení genetických analýz velmi děkuji Mileně Sobotkové, protože bez její pomoci a neocenitelných rad by tato nesporně zajímavá část práce asi nikdy nevznikla. Studentům Zemědělské fakulty Božence, Janě a Tomášovi patří velký dík za nesmírnou ochotu a pomoc při praktickém provedení genetických analýz, se kterou jsem se za celé své studium doposud nikdy nesetkala. Štěpánovi Janečkovi děkuji za velmi výhodnou směnu materiálu, díky které jsem nebyla nucena čerpat prostředky z vlastních, těžce našetřených zdrojů.

Nesmím také opomenout, že bez neocenitelných rad a pomoci Petra Šmilauera při statistickém zpracování výsledků genetických analýz bych dodnes tonula v pochybnostech co ty jednotlivé symboly a zkratky skutečně znamenají a zda to všechno počítám správně. Velmi mu děkuji také za kontrolu příslušné části práce. Také Davidovi Zelenému děkuji za jeho rady a celkový pohled na věc, které mi při zpracování dat velmi pomohly. Nemalé díky patří J. Greimlerovi (Institute of Botany, University of Vienna) za soupis vhodných lokalit v Alpách. Milanovi Štechovi děkuji za determinaci druhů z vegetačních snímků z Alp, spoustu podmětných připomínek, ale v neposlední řadě také za zorganizování cesty na konferenci ve Vídni, kde jsem nečekaně získala důležité informace.

Děkuji také strážcům šumavského Národního parku, že akceptovali moje opakování potulování v prvních zónách a Lesní správě Modrava za poskytnutí střechy nad hlavou. Nesmím také zapomenout poděkovat svatému Petrovi, že mě příliš netrápil zimou, deštěm a mlhami, jako tomu bylo v předchozím bakalářském studiu.

Ráda bych také poděkovala knihovnicím společné knihovny AV a BF JU za ochotu a vstřícnost s jakou mi pomáhaly shánět nejrůznější literaturu.

Na závěr bych ráda poděkovala Bětce, Táně, Lucce, Tomášovi, a také osazenstvu naší studentské pracovny na vile, kteří mě často podpořili ve chvílích největšího zoufalství, poslouchali mé teorie o tom co mi to vlastně vyšlo a snášeli mé hlasité projevy, kterými jsem je ve svém rozhořčení z momentální situace určitě rušila od práce.

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	1
<b>2 Metodika .....</b>	4
2.1 Studovaný druh.....	4
2.2 Reprodukční strategie <i>G. pannonica</i> na různých typech stanovišť ve vazbě na jejich vegetační složení a historii výskytu druhu .....	5
2.2.1 Popis lokalit .....	5
2.2.2 Vztah mezi vegetačním složením lokalit a generativním rozmnožováním studovaného druhu .....	6
2.2.3 Produkce semen na studovaných lokalitách .....	7
2.2.4 Statistické zpracování výsledků.....	7
2.3 Přežívání semenáčků v závislosti na vlhkostních poměrech stanoviště .....	8
2.3.1 Popis lokality .....	8
2.3.2 Uspořádání pokusu .....	8
2.3.3 Statistické zpracování výsledků.....	9
2.4 Hodnocení genetické variability populací <i>G. pannonica</i> na různých typech stanovišť pomocí RAPD markerů.....	9
2.4.1 Odběr vzorků .....	9
2.4.2 Princip metody RAPD ( <u>R</u> andomly <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphic <u>D</u> N <u>A</u> ) .....	10
2.4.3 Izolace DNA .....	11
2.4.4 RAPD reakce .....	11
2.4.5 Rozdělení produktů amplifikace na elektroforéze .....	12
2.4.6 Screening primerů.....	12
2.4.7 Statistické zpracování výsledků.....	12
2.5 Nomenklatura.....	13
<b>3 Výsledky .....</b>	13
3.1 Reprodukční strategie <i>G. pannonica</i> na různých typech stanovišť ve vazbě na jejich vegetační složení a historii výskytu druhu .....	14
3.1.1 Vztah mezi vegetačním složením lokalit a generativním rozmnožováním studovaného druhu .....	14
3.1.2 Produkce semen zkoumaných lokalit .....	17
3.2 Přežívání semenáčků v závislosti na vlhkostních poměrech stanoviště .....	20
3.3 Hodnocení genetické variability populací <i>G. pannonica</i> na různých typech stanovišť pomocí RAPD markerů.....	21
<b>4 Diskuse .....</b>	25
4.1 Reprodukční strategie <i>G. pannonica</i> na různých typech stanovišť ve vazbě na jejich vegetační složení a historii výskytu druhu .....	25
4.1.1 Vegetační složení jednotlivých stanovišť .....	25
4.1.2 Výskyt semenáčků <i>G. pannonica</i> .....	26
4.1.3 Produkce vyvinutých semen v závislosti na velikosti populace <i>G. pannonica</i> .29	29
4.2 Hodnocení genetické variability populací <i>G. pannonica</i> na různých typech stanovišť pomocí RAPD markerů.....	31
<b>6 Závěr .....</b>	36
<b>7 Literatura .....</b>	38
<b>Přílohy</b>	

# 1 ÚVOD

Krajina střední Evropy prošla od konce posledního glaciálu do současnosti řadou významných proměn, kdy se měnilo zastoupení i složení jednotlivých rostlinných společenstev. S nástupem lesní vegetace v průběhu holocénu docházelo k výraznému ústupu druhů i společenstev vázaných na otevřenou krajinu konce pleistocénu a počátku holocénu. Světlomilné druhy a společenstva byly vytlačovány do vyšších poloh, kde se udržovaly nad horní hranicí lesa, či na jiná extrémní stanoviště, kde vzniku souvislého lesního pokryvu bránily edafické či jiné klimatické podmínky (JANKOVSKÁ 2004, JENÍK 1961). Na druhou stranu s rozvojem lidské společnosti spojené odlesnění krajiny umožnilo v prostoru střední Evropy opětovné šíření světlomilných druhů a rostlinných formací (LANG 1994, RYBNÍČKOVÁ & RYBNÍČEK 1996).

Mezi území, jejichž současná podoba je ovlivněna všemi výše uvedenými procesy, patří bezesporu i oblast Šumavy. Skladbu zdejší vegetace významně určuje také skutečnost, že Šumava leží až na výjimky (za hranicemi našeho státu) pod výškovou hranicí primárního subalpínského a alpínského bezlesí (SKALICKÝ 1998, SÁDLO & BUFKOVÁ 2002). V období před lidským osídlením převládaly na Šumavě biotopy lesní. Subalpínská a alpínská květena, která sem migrovala pravděpodobně na konci pleistocénu a na počátku holocénu především z nedalekých Alp, byla v tomto období značně omezena pouze na několik skalnatých vrcholů, ledovcových karů a případně na okraje vodních toků a rašelinišť (MORAVEC 1964, PROCHÁZKA & ŠTECH 2002, SÁDLO & BUFKOVÁ 2002). Později, v průběhu lidské kolonizace území, docházelo k vytváření sekundárního bezlesí podél komunikací a lidských sídlišť (BENEŠ 1996). Tyto druhotné bezlesé plochy se staly vhodným stanovištěm pro řadu světlomilných druhů přežívajících doposud pouze v nevelkých populacích na primárně bezlesích plochách (PRACH et al. 1996, PROCHÁZKA & ŠTECH 2002).

Charakteristickým příkladem alpského migrantu vázaného na primární bezlesí je i studovaný druh *Gentiana pannonica*, který se na území Šumavy rozšířil pravděpodobně na konci posledního glaciálu či na počátku holocénu. Lze předpokládat, že v tehdejší bezlesé krajině Šumavy měl hořec panonský značné rozšíření (PROCHÁZKA & ŠTECH 2002). S rozvojem lesní vegetace v období atlantiku druh pravděpodobně ustoupil na několik málo stanovišť vázaných převážně na kary Černého a Plešného jezera, kde se díky geomorfologii terénu udržela nelesní společenstva. Po odlesnění montánních poloh Šumavy začal tento světlomilný druh migrovat na člověkem vytvořené louky a pastviny a dosáhl zde velkého rozšíření. Jeho výskyt je doložen prakticky na všech výše položených lučních enklávách Šumavy (PROCHÁZKA 1961, ANONYMUS 1972, PROCHÁZKA & ŠTECH 2002). Další výrazná redukce jeho výskytu souvisela s intenzivním sběrem jeho oddenků, což způsobilo, že se druh ve 30. letech 20. století ocitl na pokraji vyhynutí (KRIST 1933, HILITZER 1935). Avšak vlivem společensko-politických změn po druhé světové válce se druh znova spontánně šířil a dosáhl

opět poměrně hojného a širokého výskytu zvláště v oblasti Šumavských plání (PROCHÁZKA & ŠTECH 2002).

Navzdory podrobné znalosti změn rozšíření *G. pannonica* na Šumavě zůstává otázkou, jak se tyto poměrně dramatické změny populačních početností projevily například na genetické struktuře populací. Fragmentace a izolace jednotlivých populací bývá označována za důležitý faktor ovlivňující jejich životaschopnost (KÉRY et al. 2000, LUIJTEN et al. 2000, JACQUEMYN et al. 2001). Malé a izolované populace jsou obecně považovány za více náchylné ke změnám okolního prostředí, protože ztráta genetické variability a zamezení toku genů (pyl a semena) mezi izolovanými lokalitami může výrazně omezit schopnost adaptability populací na měnící se podmínky prostředí (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH 1987, BARRET & KOHN 1991). Nicméně náchylnost k fragmentaci a izolaci či jiným změnám populační struktury je u různých druhů značně odlišná a závisí často na jejich reprodukční strategii a životní historii (ELLSTRAND & ELAM 1993, HOLDERRUGGER & SCHNELLER 1994).

Dalším faktorem, který nelze při dramatických změnách velikosti a početnosti populací opomenout, je potenciální počet a původ jedinců podílejících se na vzniku populací či přežívajících po jejich ústupu (HENRICK 1983, BARRET & KOHN 1991). Rozhodující roli při formování demografické a genetické struktury populací hraje bezesporu také reprodukční strategie konkrétních druhů, která může být často značně ovlivněna specifickými podmínkami prostředí a charakterem či historií daného typu stanoviště (HUENNEKE 1991, KARRON 1991, STEHLIK et al. 2002). Z těchto důvodů je při studiu genetické struktury a variability populací velmi žádoucí detailní znalost biologie a ekologie zkoumaného druhu.

Pro pochopení procesů, které ovlivnily či stále ovlivňují populace studovaných druhů je většinou nezbytné spojit studium genetické struktury a variability populací s podrobným zkoumáním ekologie a historie rozšíření konkrétních druhů (FISCHER & MATTHIES 1998a, SCHMIDT & JENSEN 2000).

Tento přístup byl použit i v případě studia vybraných populací *Gentianna pannonica*. Na spektru všech základních typů stanovišť bylo studováno vegetační složení, přítomnost generativního zmlazení a produkce semen zkoumaného druhu. Zaznamenány byly některé základní ekologické a geomorfologické charakteristiky stanovišť.

Pro studium genetického polymorfismu jedinců z jednotlivých populací byla zvolena metoda RAPD (The Randomly Amplified Polymorphic DNA – WILLIAMS et al. 1990), která je používána zvláště pro nalezení polymorfních lokusů a mapování genomu u organismů, o kterých není dostatek informací na úrovni DNA. Důležitým faktorem pro její výběr byly také relativně nízké finanční náklady potřebné k jejímu provedení.

## Cíle práce:

1. Porovnat vegetační složení a zaznamenat případný výskyt semenáčků *G. pannonica* na všech základních typech stanovišť v oblasti Šumavy. Zjistit zda vůbec a jaké existují rozdíly mezi primárními a sekundárními stanovišti druhu. Porovnat získané výsledky se situací v Alpách, kde je centrum rozšíření studovaného druhu.
2. Na základě porovnání vegetačního složení, podobnosti reprodukční strategie či případně míry genetické variability vtipovat na jakém typu stanoviště mohl druh *G. pannonica* potenciálně přežívat zalesněné období holocénu v oblasti Šumavských plání.
3. Porovnat produkci vyvinutých semen u jednotlivých vybraných typů stanovišť v souvislosti s velikostí dané populace, její izolovaností a nadmořskou výškou konkrétních lokalit.
4. Pomocí terénního experimentu zjistit vliv vlhkosti na přežívání mladých semenáčků *G. pannonica*.
5. Porovnat míru genetické variability populací mezi primárními a sekundárními stanovišti studovaného druhu a zjistit její rozdíly mezi Alpami a Šumavou, což jsou území se značně odlišnou historií rozšíření *G. pannonica*.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Studovaný druh

*Gentiana pannonica* SCOP. (hořec panonský) je řazen do čeledi *Gentianaceae* JUSS. Synonymika druhu byla převzata podle Procházky (PROCHÁZKA 1961).

Syn.: *Gentiana maior purpureo florae* CLUSIUS Stirp. Pann. 278, 1583

*Gentiana purpurea* L. sensu KRAMER Elench. Veg. 66, 1756

*Gentiana punctata* L. sensu JACQUIN Observ. 2: 739, 1786

*Gentiana purpurea* L. sensu SCHRANK Fl. Bayer. 1: 509, 1786

*Pneumonanthe pannonica* (SCOP) F. W. SCHMIDT Fl. Boem. 2: 112, 1795

*Pneumonanthe purpurea* (L.) F. W. SCHMIDT Fl. Boem. 2: 112, 1795

*Gentiana purpurea* L. sensu GEBHARD Verz. Steierm. Pfl. 123, 1821

*Coilantha pannonica* (Scop.) G. DON Gen. Syst. Gard. a. Bot. 4: 186, 1838

*Gentiana pannonica* je vytrvalá bylina s mohutným šikmým vícehlavým hnědavým oddenkem a četnými tuhými silnými kořeny. Lodyha je přímá, 10 až 85 cm vysoká, nevětvená, hladká nebo při bázi nevýrazně rýhovaná. Přízemní listy jsou dlouze řapíkaté a čepel úzce podlouhlá. Lodyžní listy jsou vstřícné s výraznými souběžnými žilkami. Květenství je patrovité a květy se nacházejí ve shlučích v úžlabí horních listů. Kalich je srostlý s nazpět ohnutými cípy, koruna je zvonkovitá, sytě špinavě nachová s temně fialovým tečkováním. Nitky tyčinek jsou přirostlé k dolní části koruny a prašníky srostlé v trubičku kolem čnělky. Plodem je krátce stopkatá tobolka s čočkovitě smáčklými, výrazně křídlatými semeny (KIRSCHNER & KIRSCHNEROVÁ 2000).

Druh je považován za středoevropský endemit s centrem rozšíření ve východních Alpách, kde se vyskytuje od východního Švýcarska přes italské Alpy do Slovinska a přes bavorské Alpy do Dolního Rakouska. Na Šumavě je tento druh typickým alpským migrantem. Těžiště jeho výskytu se nachází v oblasti Kvildských plání, na západ zasahuje až k okolí Železné Rudy a na jihu můžeme nalézt izolované lokality vzácně v masivu Plechého a Třístoličníku. Nejdále na jihovýchod byl druh zaznamenán u obce Zvonková (PROCHÁZKA 1961). V Čechách lze nalézt *G. pannonica* ještě na několika lokalitách v Krkonoších (svah Studniční hory a Modrý důl) a v Hrubém Jeseníku (u chaty Barborka, severní svah Pradědu, Sokolí skály a Vysoká hole). Tyto lokality však nejsou považovány za původní (ŠULA 1957, ŠOUREK 1963, PROCHÁZKA 1999).

Druh se na Šumavu rozšířil pravděpodobně na konci posledního glaciálu či na počátku preboreálu, kdy bezlesá území umožňovala migraci tohoto světlomilného druhu. Ke značnému omezení původního rozšíření došlo pravděpodobně v zalesněném období holocénu, kdy druh přežíval převážně jen na místech, kde se udrželo primární bezlesí. Ve středověku vlivem lidské kolonizace pohoří se začal znovu šířit, tentokrát však na druhotná, člověkem vytvořená heliofilní stanoviště (PRACH et al. 1996, PROCHÁZKA & ŠTECH 2002). Další pokles populačních početností *G. pannonica* souvisel se sběrem jeho kořenů za účelem výroby lihových extraktů používaných v lidovém léčitelství a při výrobě alkoholických nápojů v 19. století a v první polovině 20. století. Výsledkem intenzivního sběru byla

skutečnost, že druh se stal na Šumavě velmi vzácný, dokonce v 30. letech minulého století existovaly i obavy o jeho úplné vyhynutí. K zásadnímu obratu došlo až po druhé světové válce, kdy se po vysídlení německého obyvatelstva a vytvoření veřejnosti nepřístupného pohraničního pásmu druh znovu rozšířil ze zbytků svých populací (KRIST 1933, HILITZER 1935, PROCHÁZKA 1961, ANONYMUS 1972, PROCHÁZKA & ŠTECH 2002).

V současné době je *G. pannonica* rozšířena na Šumavě poměrně hojně. Charakteristickým stanovištěm jsou horské pastviny a louky sv. *Violion caninae*. Roztroušeně se však také vyskytuje v nivách horských potoků a karech ve společenstvech sv. *Calamagrostion villosae* a sv. *Dryopterido-Athyriion*. Ojediněle se vyskytuje ve smrkových lesích, ale většinou se jedná o jeden či několik málo sterilních jedinců (PROCHÁZKA 1961, KOČÍ 2001, HOFHANZLOVÁ 2002). V Alpách roste druh *G. pannonica* na horských loukách v alpinském a subalpinském pásmu, na suti nebo mezi kosodřevinou v nadmořských výškách 1200–2400 m jak na silikátovém, tak vápencovém podloží (KRIST 1933, HEGI 1975). Vyskytuje se tedy podstatně výše než v oblasti Šumavy, kde se nejvíce lokalit nachází v rozmezí mezi 1000–1100 m (PROCHÁZKA 1961).

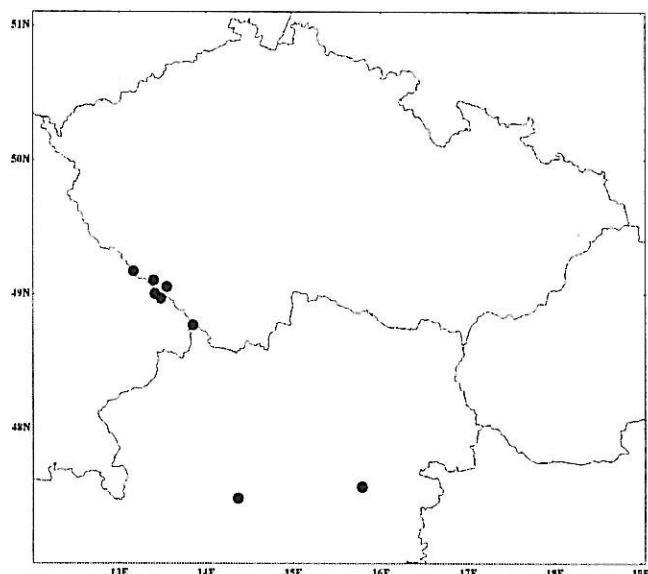
Na území České republiky je druh pro svůj velmi omezený původní výskyt a také reliktní charakter řazen do kategorie silně ohrožený taxon (C2) (Holub & Procházka 2000).

## 2.2 Reprodukční strategie *G. pannonica* na různých typech stanovišť ve vazbě na jejich vegetační složení a historii výskytu druhu

### 2.2.1 Popis lokalit

Pro výzkum bylo vybráno celkem osm lokalit (tab. 2.1). Šest se nachází v oblasti Šumavy, která je považována za izolovanou arelu výskytu *G. pannonica*, a dvě lokality se nalézaly ve východních Alpách, tedy v centru rozšíření studovaného druhu (obr. 2.1).

Na území Šumavy byly vybrané lokality zvoleny tak, aby reprezentovaly všechny hlavní typy stanovišť, kde se druh v současnosti vyskytuje. V Alpách byly vybrány lokality vyskytující se na silikátových horninách (kvůli srovnání s šumavskými lokalitami) a zastupující charakteristická primární stanoviště vázaná na subalpinské a alpinské pásmo.



Obr. 2.1: Poloha studovaných lokalit.

Terénní průzkum lokalit probíhal ve vegetačních sezónách v letech 2003 a 2004.

**Tabulka 2.1:** Lokalizace studovaných lokalit. Na lokalitách v karu Plešného a Černého jezera a také v Alpách v karu nad jezerem Globucken See byly sledovány vždy dva transekty s vegetačními snímky. V případě šumavských karů je každý transekt označen pomocí zeměpisných souřadnic. Na lokalitě Globucken See byly oba transekty dostatečně vzdálené, proto jsou lokalizovány jednotlivě. U alpských lokalit není uveden fytochorion, ale název pohoří alpské soustavy, kde se lokalita nalézá.

Lokalita	Stát, fytochorion (kvadrant středoevropské mapovací sítě): obec nebo orient. bod, přesná lokalizace, nadm. výška, zeměpisné souřadnice
Plešné jezero	Česká republika, 88e. Trojmezenská hornatina (7249a): Plešné jezero, na úpatí skalek v karu asi 500 m J od Stifterova pomníku, 1170 – 1200 m n. m., transekt č. 1 – 48°46'17"N 13°51'42"E, transekt č. 2 – 48°46'24"N 13°51'35"E
Černé jezero	Česká republika, 88a. Královský hvozd (6845a): Černé jezero, na úpatí jezerní stěny, asi 500 m SSZ od vrcholu Jezerní hora, 1184 – 1200 m n. m., transekt č. 1 – 49°10'28"N 13°10'46"E, transekt č. 2 – 49°10'24"N 13°10'50"E
Modravský potok	Česká republika, 88b. Šumavské pláně (7046b): Modravský potok, loučka v meandru při pravém břehu potoka, asi 500 m J od rozcestí Na ztraceném, 1085 m n. m., 48°58'47"N 13°29'31"E
Rokytky	Česká republika, 88b. Šumavské pláně (6946d): potok Rokytky, v loukách na pravém břehu potoka, asi 1 km S od vrcholu Medvěd, 1090 m n. m., 49°00'56"N 13°25'16"E
Slunečná	Česká republika, 88b. Šumavské pláně (6946a): Prášily, louky na okraji bývalé střelnice, asi 1,5 km J od vrcholu Slunečná, 870 m n. m., 49°06'04"N 13°24'06"E
Horská Kvilda	Česká republika, 88b. Šumavské pláně (6947a): Horská Kvilda, louka asi 500 m SZ od rozcestí U Honese (penzion) na SZ okraji obce, 1084 m n. m., 49°03'45"N 13°33'18"E
Globucken See 1	Rakousko, Rottenmanner Tauern: Rottenmann, Rottenmanner H., skalní terásky ve spodní části karu, asi 200 m SSV od jezera Globucken See, 1780 m n. m., 47°29'12"N 14°22'08"E
Globucken See 2	Rakousko, Rottenmanner Tauern: Rottenmann, Rottenmanner H., prudké svahy v horní části východní stěny karu, asi 400 m Z od jezera Globucken See, 1935 m n. m., 47°29'22"N 14°22'02"E
Alois Günther Hause	Rakousko, Fischbacher Alpen: Semmering, pod horou Stuhleck, luční enkláva v kosodřevině asi 500 m SZ od chaty Alois Günther Hause, 1749 m n. m., 47°34'32"N 15°47'26"E

## 2.2.2 Vztah mezi vegetačním složením lokalit a generativním rozmnožováním studovaného druhu

Na každé studované lokalitě bylo druhové složení vegetace zaznamenáno pomocí pěti fytofenologických snímků o velikosti 1 x 1 m. Snímkы byly rozmístěny na transektu dlouhém 9 m, vždy jeden metr od sebe navzájem vzdálené. Na lokalitách v karu Plešného a Černého jezera a také v Alpách v karu nad jezerem Globucken See se *G. pannonica* vyskytovala v několika částečně odlišných typech vegetace, proto zde byly sledovány vždy dva transekty s vegetačními snímkými (viz. tab 2.1, viz příloha 3). Pouze v případě lokality nedaleko horské chaty Alois Günther Hause (Fischbacher Alpen) byly na transektu zaznamenány pouze čtyři fytofenologické snímký, protože plocha vegetace stejnorođého složení zde měla omezenou rozlohu.

Každý transekt byl zaměřen GPS (Etrex, Garmin) v souřadném systému WGS–84. V každém snímku byly zaznamenány pokryvnosti druhů v procentech a dále procentuální zastoupení odkryté zeminy, kamenů a opadu. Dále byla stanovena expozice a sklon v místě snímku a spočítány semenáčky *G. pannonica* v jednotlivých snímcích.

### 2.2.3 Produkce semen na studovaných lokalitách

Na všech studovaných lokalitách bylo odebráno 15 až 30 zralých semeníků *G. pannonica*, vždy po jednom semeníku z vrcholové části jedné lodyhy. Nižší počet než 25 semeníků byl odebrán v případě, že sběr většího počtu nebyl možný, protože na lokalitě byl malý počet kvetoucích rostlin a nebo byly semeníky nějakým způsobem poškozeny.

Po odběru byla semena vybrána ze semeníků a rozdělena na vyvinutá a nevyvinutá (obr. 2.2). Obě skupiny byly spočítány a byl stanoven seed set (tj. poměr vyvinutých semen k celkovému počtu vajíček v semeníku).

Pro účely zkoumání vztahu mezi hodnotou seed set a velikostí a izolovaností populací či nadmořskou výškou lokalit byla stanovena velikost a míra izolace zkoumaných lokalit. Velikost každé populace byla charakterizována pomocí počtu listových růžic či trsů. V menších populacích byl počet trsů spočítán, v populacích s velkým počtem rostlin byl přibližně odhadnut. Izolovanost populací byla vyjádřena pomocí vzdálenosti k nejbližší známé populaci. Nadmořská výška byla změřena pomocí GPS (Etrex, Garmin) nebo případně odečtena z mapy o měřítku 1:10 000 (viz příloha 1).



Obr. 2.2: Rozdíl mezi vyvinutým a nevyvinutým semenem. Rozměry: vyvinuté semeno = 5 x 3 mm, nevyvinuté semeno = 1,8 x 1 mm.

### 2.2.4 Statistické zpracování výsledků

Vegetační data byla zpracována pomocí programu Canoco for Windows 4.5 (TER BRAK & ŠMILAUER 2002), konkrétně unimodálními metodami DCA a CCA, pro které svědčila nejen povaha dat (snímky pocházely z různých biotopů), ale také délka gradientu spočtená pomocí detrendované korespondenční analýzy DCA (LEPŠ & ŠMILAUER 2003).

Nepřímá gradientová analýza DCA (*detrended correspondence analysis*) byla použita pro porovnání druhového složení jednotlivých stanovišť a grafické znázornění počtu semenáčků *G. pannonica* ve snímcích. Zahrnutý byly všechny druhy zachycené ve snímcích vyjma studovaného druhu *G. pannonica*, který byl z analýzy vyloučen.

Přímou gradientovou analýzou CCA (*canonical correspondence analysis*) byla testována závislost druhové skladby na zaznamenaných charakteristikách stanovišť *G. pannonica*. Jako vysvětlující bylo použito šest kvantitativních proměnných (sklon, pokryvnost opadu, pokryvnost mechového patra, zastoupení odkryté zeminy, pokryvnost kamenů či skal, počet semenáčků). Statistická významnost kanonických os byla hodnocena pomocí Monte Carlo permutačního testu s použitím modelu „*cyclic shifts for time series or linear transect*“, a to z důvodu zohlednění vzájemné závislosti mezi snímky z jednoho transektu (HERBEN & MÜNZBERGOVÁ 2002).

Druhová data byla vyjádřena procentickou pokryvností a před analýzou byla podrobena logaritmické transformaci. Grafický výstup ordinační analýzy byl vytvořen pomocí programu CanoDraw for Windows 4.0 (TER BRAAK & ŠMILAUER 2002).

Vztahy mezi zaznamenanými charakteristikami prostředí a počtem semenáčků ve snímcích byly zjištěny pomocí jednoduché lineární regrese v programu Statistica for Windows 6.0 (ANONYMUS 2001). Počty semenáčků byly logaritmovány ( $\log(x+1)$ ) a hodnoty pokryvnosti mechového patra a opadu a dalších charakteristik vyjádřených v procentech byly podrobeny arcsinové transformaci.

Rozdíly v produkci vyvinutých semen mezi jednotlivými lokalitami v obou sledovaných sezónách 2003 a 2004 byly vyhodnoceny pomocí standardních statistických metod s použitím programu Statistica for Windows 6.0 (ANONYMUS 2001), konkrétně pomocí dvoucestné analýzy variance. Mnohonásobné porovnání bylo provedeno Tukey testem (HSD) – *honest significant difference test*. Závislost produkce vyvinutých semen na velikosti, mřeží izolovanosti lokality a nadmořské výšce byla hodnocena pomocí jednoduché lineární regrese. Hodnoty charakteristiky seed set (procento vyvinutých semen v semeníku) byly podrobeny arcsinové transformaci (použity hodnoty od 0 – 1). Všechny testy byly hodnoceny na hladině významnosti 0,05.

## **2.3 Přežívání semenáčků v závislosti na vlhkostních poměrech stanoviště**

### **2.3.1 Popis lokality**

Pokusná plocha se nacházela v nadmořské výšce 1070 m n. m v jihozápadní části bezlesých enkláv v okolí obce Kvilda (asi 1,25 km JZ od kostela v obci) v centrální části Národního parku Šumava. Lokalita je tvořena suchými krátkostébelnými porosty sv. *Violion caninae*, které na místech ovlivněných pramennými vývěry přecházejí ve vlhké zrašelinělé trávníky sv. *Caricion fuscae*.

### **2.3.2 Uspořádání pokusu**

Pokus byl na lokalitě založen na začátku června roku 2003. Na suché části lokality byly náhodně v několika metrových vzdálenostech vytyčeny tři čtverce o velikosti 2 x 2 m. Do celé plochy každého čtverce bylo rovnoměrně vysazeno 50 – 56 jednoletých semenáčků. Vše bylo stejně provedeno i ve vlhčí části lokality. Jednotlivé semenáčky byly označeny pomocí plastových tyček a poté byl jejich počet odečítán třikrát v pravidelných, přibližně měsíčních intervalech v průběhu celé vegetační sezóny.

Použité semenáčky pocházely z umělého výsevu na záhon nacházející se nedaleko pokusné plochy, který byl proveden na podzim roku 2001. Semenáčky vyklíčily v průběhu června a července roku 2002. Na jaře 2003, kdy byly již dostatečně velké pro manipulaci v terénních

podmínkách, byly vyjmuty i s drnem, přeneseny na pokusnou plochu a zasazeny podle výše uvedeného popisu.

Počty uhynulých semenáčků získané v průběhu celé sezóny byly spočítány zvlášť pro jednotlivé čtvrtiny ( $1\text{m}^2$ ) každého velkého čtverce (2 x 2 m). Na základě podílu počtu uhynulých semenáčků a počtu semenáčků vysazených při založení pokusu bylo stanoveno procento uhynulých semenáčků v těchto plochách (1 x 1 m).

Pro pokus bylo třeba vybrat plochy, kde se v relativní blízkosti vyskytovaly dostatečně rozsáhlá jak suchá, tak vlhká stanoviště. Důvodem pro výběr jediné lokality byla nejen snaha o zajištění srovnatelných dalších faktorů ovlivňujících pokusnou plochu (oslunění, vliv inverze atd.), ale především zvládnutelnost založení pokusu po technické stránce. Vhodné vlhké plochy, které by si byly dostatečně podobné, se v oblasti bezlesí obce Kvilda vyskytují zřídka a jsou od sebe značně vzdálené. Vyjmuté semenáčky jsou velmi náchylné k zavadnutí a je třeba je neprodleně zasadit. Existovala obava, že poškození semenáčků přenášením na vzdálenější lokality by také mohlo mít v konečném důsledku větší vliv na jejich přežívání, než vlhkostní poměry stanoviště. Výběr jediné lokality měl sloužit pouze pro získání určité představy o vlivu faktoru vlhkosti na jejich přežívání.

### **2.3.3 Statistické zpracování výsledků**

Rozdíly v přežívání semenáčků v závislosti na vlhkostních poměrech prostředí byly porovnány pomocí standardních statistických metod s použitím programu Statistica for Windows 5.5 (ANONYMUS 1998). Odlišnost stanovišť byla testována dvoucestnou analýzou variance, kde byl sledován vliv faktoru stanoviště (suché, vlhké) a proměnná čtverec byla zadána jako faktor s náhodným efektem. Jako vysvětlované proměnné bylo použito podílu uhynulých semenáčků za celou vegetační sezónu, který byl vyjádřen v procentech. Získané hodnoty byly podrobeny arcsinové transformaci (použity hodnoty od 0 – 1). Všechny testy byly hodnoceny na hladině významnosti 0,05.

## **2.4 Hodnocení genetické variability populací *G. pannonica* na různých typech stanovišť pomocí RAPD markerů**

### **2.4.1 Odběr vzorků**

Pro potřeby genetické analýzy byly odebrány nepoškozené vitální listy z přízemní růžice rostliny vždy po jednom z konkrétní rostliny či trsu. Sběr probíhal na stejných lokalitách, kde byla zkoumána reprodukční strategie a vegetační složení (viz. tab. 2.1). Celkem bylo odebráno 130 vzorků z osmi lokalit (tab. 2.2). Další informace o sběru a počtu vzorků jsou uvedeny v tabulce 2.2. Odebrané vzorky byly vloženy do uzavíratelného igelitového sáčku naplněného silikagolem a skladovány při pokojové teplotě. Počet vzorků byl omezen množstvím dostupných finančních prostředků.

**Tabulka 2.2:** Přehled lokalit a informace o sběru vzorků populací *G. pannonica*. Snížení počtu vzorků použitých při statistickém hodnocení je způsobeno vyřazením vzorků obsahujících poškozenou DNA, u nichž se nepodařilo získat čitelný soubor amplifikačních fragmentů.

Lokalita	Zkratka	Datum odběru	Počet odebraných vzorků	Počet vzorků použitých pro statistické analýzy
Plešné jezero	P	10.8.2003	20	18
Černé jezero	C	7.8.2003	20	18
Modravský potok	MP	9.8.2003	10	10
Rokytká	R	8.8.2003	10	10
Slunečná	S	8.8.2003	10	10
Horská Kvilda	HK	9.8.2003	10	10
Globucken See 2	GS	8.9.2004	20	19
Alois Güther Hause	A	7.9.2004	30	30

#### 2.4.2 Princip metody RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

Náhodně amplifikované polymorfnní DNA (RAPD) markery sestávají z relativně krátkých DNA fragmentů (okolo 20–2000 bazí), které jsou amplifikovány prostřednictvím polymerázové řetězové reakce (PCR – Polymerase Chain Reaction) za použití velmi krátkého primeru (obvykle 10 bazí), jehož nukleotidová sekvence je libovolná a v obvyklém případě je tento primer používán jednotlivě. Teplota při „annealingu“ (při nasedání primeru na komplementární genomové sekvence) je relativně nízká. Primer musí nasednout na homologní místo v opačné orientaci, aby došlo k amplifikaci takto ohraničeného úseku. Výsledkem reakce je amplifikace velkého množství genomových sekvencí, jejichž počet a délky jsou charakteristické pro každou kombinaci genomu a primeru. Rozdíly v sekvenčích genomové DNA se projevují jako polymorfismy délek amplifikačních fragmentů, které jsou využitelné jako genetické markery (WILLIAMS et al. 1990).

Fragmenty jsou podle své molekulární hmotnosti elektroforeticky separovány například na agarózovém gelu, kde rychlosť migrace určitého produktu závisí na jeho velikosti. Vizualizace je umožněna díky přidání ethidium bromidu do gelu, který se během separace naváže na DNA. Po ukončení separace je možno jednotlivé fragmenty pozorovat a vyfotografovat jejich uspořádání při prosvícení UV světlem.

Výhodou RAPD markerů je, že nevyžadují předchozí znalost DNA sekvencí studovaného organismu, požadují jen malá množství templátové DNA a umožňují testování velkého množství jedinců v relativně krátkém čase a s malými náklady.

Nevýhodou je především dominantní charakter získaných markerů. Každý fragment je v podstatě nezávislým lokusem. Tento lokus má pouze dvě alely, které se projeví buď přítomností či nepřítomností daného fragmentu. Fragmenty přítomné u všech jedinců jsou obvykle považovány za monomorfnní lokusy, zatímco lokusy nevyskytující se u všech jedinců představují lokusy polymorfnní. Není tedy možné přímé rozlišení heterozygotů od dominantních homozygotů. Při dostatečném počtu vzorků však existuje jistá možnost výpočtu genotypových četností a tím následně i stanovení určitých populačně-genetických charakteristik (LYNCH & MILLIGAN 1994). Při provádění metody je též nezbytná velká

pečlivost, protože reprodukovanost metody je velmi snadno ovlivnitelná. Každá změna parametrů PCR, jako je například teplota při „annealingu“ či množství templátové DNA, může způsobit pokles či vzestup počtu fragmentů (LEVI et al. 1993, PERÉZ et al. 1998).

#### 2.4.3 Izolace DNA

Suchá listová tkáň byla vyjmuta ze sáčku a oprášena štětečkem od zbytků silikagelu. Na analytických vahách bylo naváženo 60 mg tkáně, která byla poté vložena do plastové ependorfky o objemu 1,5 ml. Homogenizace vzorku, které předcházelo několikaminutové ponoření ependorfky se vzorkem do tekutého dusíku, byla provedena rozdrcením pomocí homogenizátoru. Během samotné homogenizace byla ependorfka se vzorkem také ponořena zčásti v tekutém dusíku.

Izolace DNA byla provedena pomocí izolačního kitu – *Invisorb Spin Plant Mini Kit* (Invitek, <http://www.invitek.de>). Izolovaná DNA v elučním pufru byla uchovávána za teploty - 20°C.

#### 2.4.4 RAPD reakce

Reakce byla provedena v thermocycloru PCT-100<sup>MT</sup> Peltier Thermal Cycler. Reakce probíhala v objemu 25 µl a obsahovala následující složky:

- 17,3 µl ddH<sub>2</sub>O
- 2,5 µl 10 x PCR Buffer (TaKaRa)
- 2,0 µl dNTP Mixture (TaKaRa)
- 2,0 µl 50 pM 10-mer primer
- 0,2 µl rTaq polymeráza (TaKaRa)
- 1 µl roztoku DNA

RAPD reakce jsou vždy připravovány jako násobek základní směsi pro jednu reakci, který je pak rozdělen do adekvátního počtu ependorfek, což znamená po jedné ependorfce pro každého analyzovaného jedince a jedna navíc.

Do připravených ependorfek byl nejdříve napietován 1 µl roztoku DNA a poté bylo přidáno 24 µl základní směsi. Obsah byl promíchán, krátce stočen na mikrocentrifuge a poté byly důkladně uzavřené ependorfky vloženy do termocycloru, kde proběhla amplifikace (PCR) dle následujícího programu:

- Počáteční denaturace za teploty 93°C po dobu 3 min
- 45 cyklů:

Denaturace: 92°C/1 min

Annealing (nasedání primerů): 35°C/2 min

Elongace (syntéza řetězců): 72°C/3 min

- Konečná elongace při 72°C po dobu 10 min

#### **2.4.5 Rozdělení produktů amplifikace na elektroforéze**

Výsledné produkty amplifikace (PCR) o různé molekulární hmotnosti byly pak separovány standartním způsobem (SAMBROOK et al. 1989) na agarázovém gelu o objemu 200 ml, jehož příprava probíhala následujícím způsobem:

- Byla připravena směs skládající se z 3 g agarózy (Serva), 40ml 5 x TBE (Tris – 54 g; k. boritá – 27,5 g; 0,5 M EDTA (pH = 8) – 20 ml) a 160 ml dH<sub>2</sub>O.
- Směs byla rozvářena v mikrovlnné troubě a poté zchlazena přibližně na 40°C, pak byly přidány 4 µl ethidium bromidu.
- Připravená směs byla nalita do formy, následovalo vložení hřebenů a gel polymerizoval. Z tuhého gelu byly vyjmuty hřebeny a do jamek byly postupně v určeném pořadí nanášeny vzorky, do kterých byly předem přidány 3 µl nanášecího barviva (0,25 % bromfenolová modř, 0,25 % xylencyanol FF zeleň, 40 % w/v sacharóza v H<sub>2</sub>O). Do jedné z jamek byl vždy dán DNA standart ( $\lambda$  marker), což je směs fragmentů o známých molekulových hmotnostech (Výsledky, obr. 3.14)
- Gel s nanesenými vzorky byl opatrně vložen do elektroforetické vany naplněné 1 x TBE pufrem.
- Vlastní elektroforéza trvala přibližně dvě hodiny při napětí 90V.
- Fragmenty na gelu byly vizualizovány pomocí UV transluminátoru a vyfotografovány digitálním fotoaparátem.

#### **2.4.6 Screening primerů**

Před vlastní analýzou všech vzorků bylo potřeba vybrat vhodné primery, které by poskytovaly dostatečně polymorfní RAPD markery a to jak na úrovni mezipopulační, tak i vnitropopulační. Pro screening primerů bylo vybráno 10 jedinců z šesti populací, které reprezentovaly všechny typy zkoumaných stanovišť (4 jedinci z lokality Plešné jezero, 2 jedinci z lokality Globucken See a po jednom jedinci z lokalit Modravský potok, Rokytká, Slunečná a Horská Kvilda).

Bylo vyzkoušeno 35 různých primerů (z řad OPA, OPB, OPF, OPG, OPK, OPL a OPT Kits firmy Operon Technologies, Alameda, California, USA). Pro analýzu populací bylo nutné vybrat několik vhodných primerů podle množství a kvality amplifikovaných fragmentů. Přednost měly primery produkující větší počet fragmentů vhodné intenzity a hlavně ukazující nějaký polymorfismus mezi analyzovanými jedinci. Pouze u čtyřech primerů byl zaznamenán významnější polymorfismus (OPB 16, OPA7, OPA9, OPA17), ty byly poté použity pro analýzu všech vzorků (jedinců). Počet testovaných primerů byl finančně omezen.

#### **2.4.7 Statistické zpracování výsledků**

Uspořádání fragmentů na gelu bylo přepsáno do formy matice, kde každý řádek představoval jedince a každý sloupec určitý fragment (marker). Přítomnost či nepřítomnost fragmentu (markeru) v jednotlivých profilech byla zapsána jako 1 respektive 0 (viz příloha 2).

Výchozí matice binárních dat byla pomocí programu GenAlEx V5 (PEAKALL & SMOUSE 2001) převedena na matici euklidovských vzdáleností definovanou jako  $E = \{\varepsilon_{xy}^2\} = n [1 - (n_{xy}/n)]$ , kde  $n_{xy}$  je počet markerů sdílených dvěma jedinci a  $n$  je rovno celkovému počtu polymorfních míst (EXCOFFIER et al. 1992, HUFF et al. 1993).

Variabilita RAPD markerů u analyzovaných jedinců byla testována analýzou molekulární variance (AMOVA) s využitím „pairwise squared Euclidean metrics“ (HUFF et al. 1993) také pomocí programu GenAlEx V5 (PEAKALL & SMOUSE 2001). Velikost variability uvnitř jednotlivých populací byla vyjádřena pomocí „mean square (MS)“, jehož hodnota byla získána podílem hodnoty sumy čtverců uvnitř populace a počtem stupňů volnosti ( $n-1$ ).

Rozdíly v genetické struktuře populací vyjádřené RAPD markery byly znázorněny pomocí klastrové analýzy [metodou unweighted pair-group average (UPGMA)] a analýzy hlavních koordinát (PCoA). Jako vstupní data pro obě analýzy byla použita matice genetických vzdáleností (pairwise population  $\Phi_{PT}$  values) osmi zkoumaných populací získaná při analýze molekulární variance.

Analýza hlavních koordinát (PCoA) byla provedena programem PrCoord 1.0 (TER BRAAK & ŠMILAUER 2002). Pro výpočet UPGMA a zobrazení výsledného dendrogramu byla použita klastrová analýza v programu Statistica for Windows 6.0 (ANONYMUS 2001).

## 2.5 Nomenklatura

Nomenklatura jednotlivých taxonů je uvedena podle Klíče ke květeně ČR (KUBÁT et al. 2002). U taxonů, které nejsou v Klíči uvedeny, byla použita nomenklatura podle klíče ke květeně Rakouska (ADLER et al. 1994). Jména syntaxonů jsou použita podle Moravce (MORAVEC 1995) Členění fytogeografických okresů (fytochorionů) na území České republiky je použito podle Skalického (SKALICKÝ 1988). Čtverce středoevropského síťového mapování jsou uvedeny podle Niklfelda (NIKLFELD 1971).

### **3 VÝSLEDKY**

#### **3.1 Reprodukční strategie *G. pannonica* na různých typech stanovišť ve vazbě na jejich vegetační složení a historii výskytu druhu**

##### **3.1.1 Vztah mezi vegetačním složením lokalit a generativním rozmnožováním studovaného druhu**

Pro ordinační analýzy bylo použito 54 vegetačních snímků (viz příloha 3), ve kterých bylo celkem zaznamenáno 79 taxonů cévnatých rostlin. K vyhodnocení dat byly použity metody DCA (*detrended correspondence analysis*) a CCA (*canonical correspondence analysis*).

Výsledky analýzy DCA jsou shrnuty v tabulce 3.1 a znázorněny na obrázku 3.1. Rozmístění jednotlivých snímků podél první ordinační osy (zleva doprava) v ordinačním diagramu odpovídá jejich příslušnosti k různým typům stanovišť. Vlevo jsou umístěny snímkы z šumavských karů, na které navazují snímkы pocházející z alpských lokalit nad horní hranicí lesa, ale také snímkы zaznamenané na drobné luční enklávě při břehu Modravského potoka. Na pravé straně diagramu jsou naopak seskupeny snímkы sekundárních horských luk v oblasti Šumavských plání. Podél druhé ordinační osy se částečně projevily rozdíly ve druhovém složení vegetace jednotlivých karů (obr. 3.2, viz příloha 3).

Stanovištěm *G. pannonica* v karových stěnách Černého a Plešného jezera jsou vysokobylinné nivy s dominantním zastoupením kapradin, zvláště *Athyrium distentifolium* místo s příměsí *Lastrea limbosperma* či *Dryopteris dilatata* zařaditelné do sv. *Dryopterido-Athyriion*. Tyto biotopy se nalézají většinou na více humózních plochách pod skalními terasami. Tato vegetace se zde střídá, místo i prolíná, s porosty vysokostébelných trávníků sv. *Calamagrostion villosae* pokrývajících často skalní terasy či plochy na mělkém půdě, kde jsou vedle dominantní *Calamagrostis villosa* zastoupeny další druhy jako *Molinia caerulea* či *Avenella flexuosa*. Zatímco v karu Plešného jezera jsou vysokostébelné trávníky na skalních terasách tvořeny především porosty *Calamagrostis villosa*, v karu Černého jezera je hojně zastoupena také *Molinia caerulea*, která v karu Plešného jezera zcela chybí. *G. pannonica* se vyskytuje většinou v nevelkých skupinách rostlin v obou typech vegetace.

Na alpských lokalitách byl druh zaznamenán zejména na prudkých svazích karových stěn v subalpinské zóně a při jejím horním okraji, často na travnatých enklávách uvnitř porostů *Pinus mugo*. Vegetace byla tvořena buď krátkostébelnými trávníky prolínajícími se s keříčkovou vegetací se zastoupením druhů *Calluna vulgaris*, *Rhododendron ferrugineum*, *Vaccinium vitis-idaea* či *Empetrum hermafroditum* nebo vysokostébelnějšími porosty s výrazným zastoupením *Calamagrostis villosa* vzácně i s *Athyrium distentifolium* (obr. 3.2,

viz příloha 3). *G. pannonica* zde opět netvoří rozsáhlé polykormony a vyskytuje se roztroušeně v různě velkých skupinách rostlin.

Další zkoumaný biotop *G. pannonica* nacházející se na břehu Modravského potoka je tvořen také porosty s dominancí *Calamagrostis villosa* a *Avenella flexuosa*. Jedná se o drobnou bezlesou enklávu při břehu potoka pravděpodobně na místě v minulosti zazemněného meandru. Charakter vegetace je zde podobný vysokostébelným trávníkům sv. *Calamagrostion villosae* vyskytujících se například v karu Plešného jezera. Je ovšem obohacen o některé specifické druhy jako *Soldanella montana* či *Ligusticum mutellina* nebo druhy vyskytující se hojně na horských trávnících a vřesovištích jako je například *Arnica montana*. *G. pannonica* zde tvoří drobné trsy nacházející se roztroušeně, často v blízkosti mladého smrkového náletu.

Poslední skupinou stanovišť studovaného druhu jsou druhotné horské louky a degradovaná vřesoviště v oblasti Šumavských plání zařaditelná do sv. *Violion caninae* či v případě lokality Horská Kvilda k degradované podobě as. *Arnico montanae-Callunetum* (sv. *Genistion*). Oběma typům společenstev většinou dominují druhy *Avenella flexuosa*, *Nardus stricta*, *Agrostis capillaris* či na vlhčích stanovištích *Deschampsia cespitosa* (obr. 3.2, viz příloha 3). *G. pannonica* je zde zastoupena většinou se značnou pokryvností a tvoří často rozsáhlé polykormony.

Jednotlivé lokality se též lišily počtem semenáčků *G. pannonica*, který byl zaznamenán v jednotlivých snímcích (obr. 3.3). Generativní zmlazení se vyskytovalo pouze na lokalitách v karech a podél Modravského potoka.

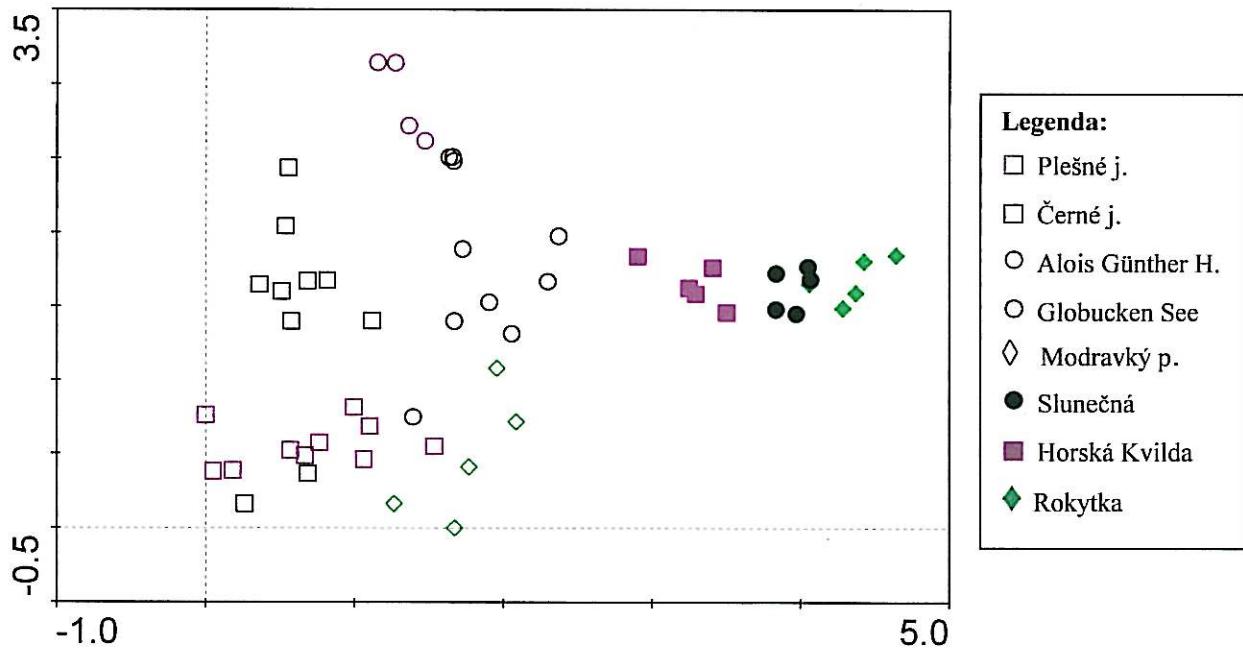
Charakteristiky prostředí zaznamenávané v jednotlivých snímcích (viz metodika) neměly statisticky průkazný vliv nejen na druhové složení jednotlivých lokalit (testováno pomocí Monte Carlo permutačního testu v analýze CCA), ale ani na výskyt resp. počet semenáčků (testováno jednoduchou lineární regresí). Proto nejsou konkrétní výsledky uvedeny.

**Tabulka 3.1:** Výsledky detrendované korespondenční analýzy (DCA) druhového složení společenstev na lokalitách *G. pannonica*.

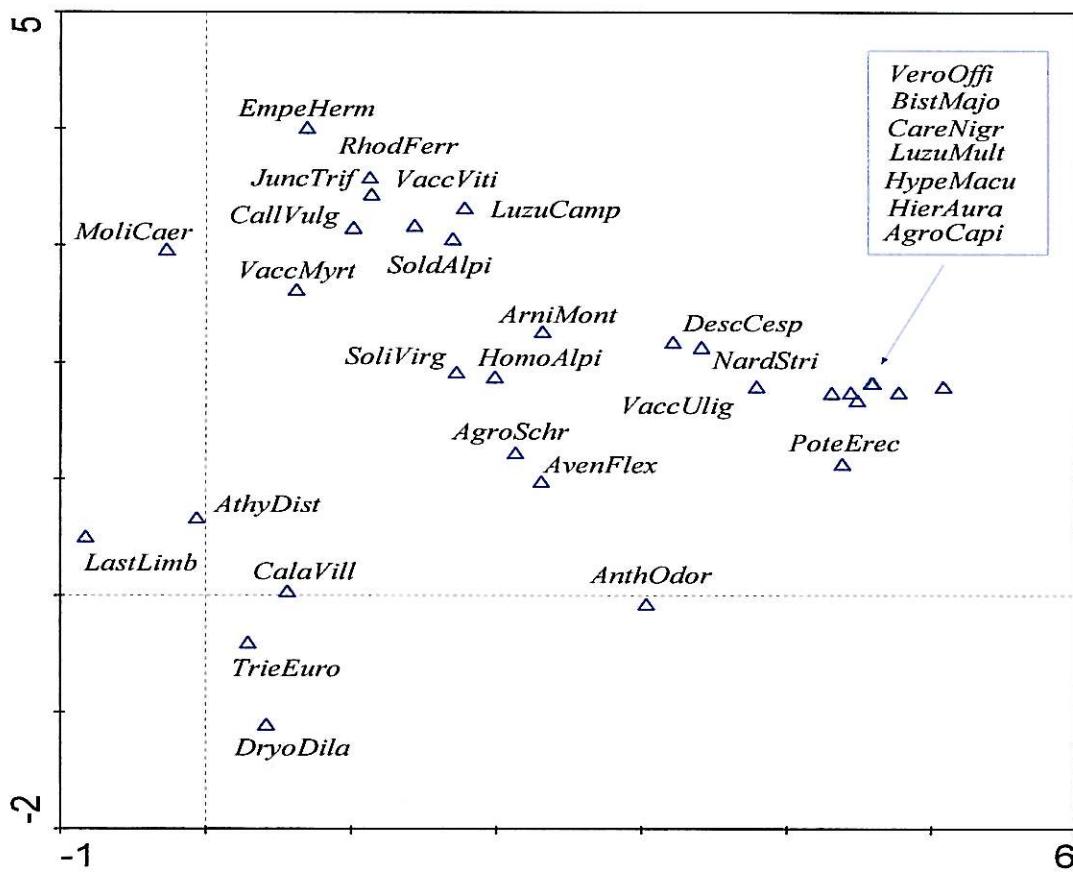
Ordinační osa	1	2	3	4
Eigenvalue osy (podíl vysvětlené variability)	0,692	0,378	0,262	0,188
Kumulativní % vysvětlené variability	11,8	18,2	22,6	25,8

**Box 1:** Legenda ke druhům zobrazeným v ordinačních diagramu (obr. 3.2):

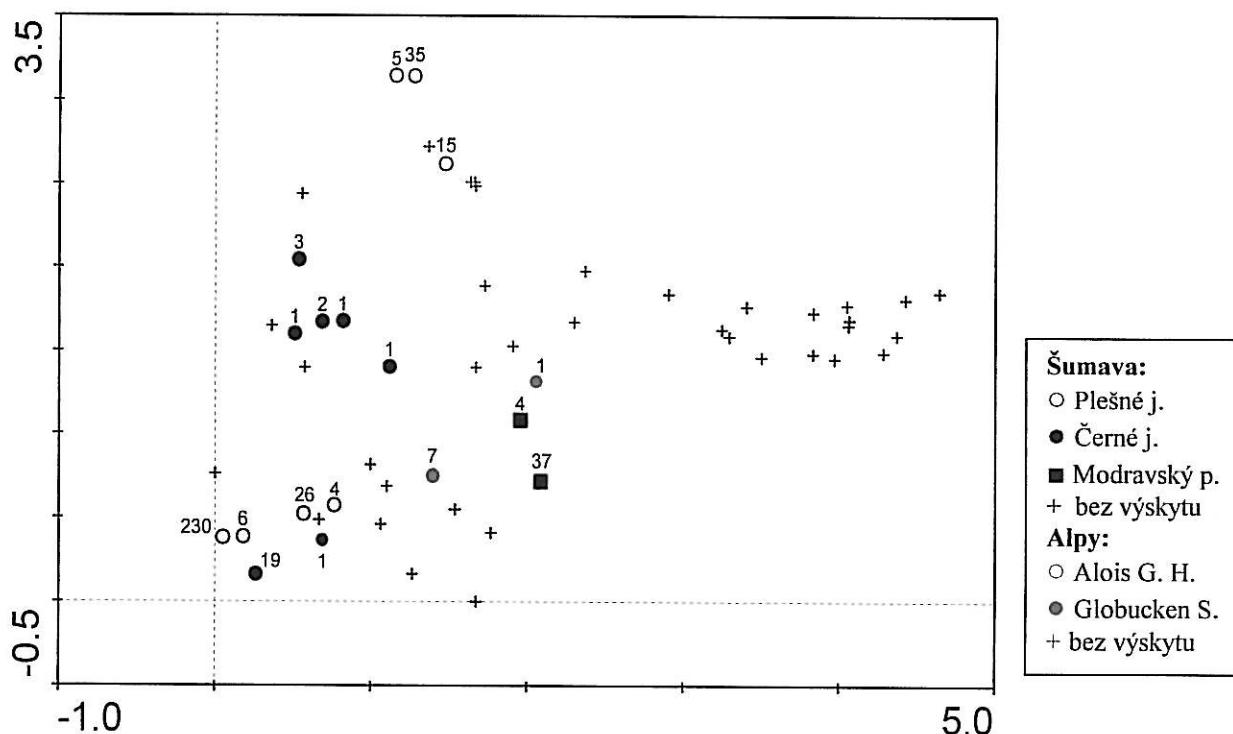
*AgroCapi* = *Agrostis capillaris*, *AgroSchr* = *Agrostis schraderiana*, *AnthOdor* = *Anthoxanthum odoratum*, *ArniMont* = *Arnica montana*, *AthyDist* = *Athyrium distentifolium*, *AvenFlex* = *Avenella flexuosa*, *BistMajo* = *Bistorta major*, *CalaVill* = *Calamagrostis villosa*, *CallVulg* = *Calluna vulgaris*, *CareNigr* = *Carex nigra*, *DescCesp* = *Deschampsia cespitosa*, *DryoDila* = *Dryopteris dilatata*, *EmpeHerm* = *Empetrum hermaphroditum*, *HierAura* = *Hieracium aurantiacum*, *HomoAlpi* = *Homogyne alpina*, *HypeMacu* = *Hypericum maculatum*, *JuncTrif* = *Juncus trifidus*, *LastLimb* = *Lastrea limbosperma*, *LuzuCamp* = *Luzula campestris* agg., *LuzuMult* = *Luzula multiflora*, *MoliCaer* = *Molinia caerulea*, *NardStri* = *Nardus stricta*, *PoteErec* = *Potentilla erecta*, *RhodFerr* = *Rhododendron ferrugineum*, *SoldAlpi* = *Soldanella alpina*, *SoliVirg* = *Solidago virgaurea*, *TrieEuro* = *Trientalis europaea*, *VaccMyrt* = *Vaccinium myrtillus*, *VaccUlig* = *Vaccinium uliginosum*, *VaccViti* = *Vaccinium vitis-idaea*, *VeroOffi* = *Veronica officinalis*



Obr. 3.1: Rozložení vegetačních snímků z jednotlivých studovaných lokalit v prostoru ordinačního diagramu DCA. Vodorovná osa odpovídá první, svislá osa druhé ordinační ose.



Obr 3.2: Ordinační diagram DCA druhového složení zkoumaných lokalit. Vodorovná osa odpovídá první, svislá osa druhé ordinační ose. Zobrazeno je 31 nejlépe fitujících druhů. Legenda ke druhů viz. Box 1.



Obr. 3.3: Rozložení vegetačních snímků v prostoru ordinačního diagramu DCA. Vodorovná osa odpovídá první, svislá osa druhé ordinační ose. Označeny jsou pouze lokality, kde byly nalezeny semenáčky *G. pannonica*. Počet zaznamenaných semenáčků ve snímku uvádí číselná hodnota vedle příslušného symbolu.

### 3.1.2 Produkce semen zkoumaných lokalit

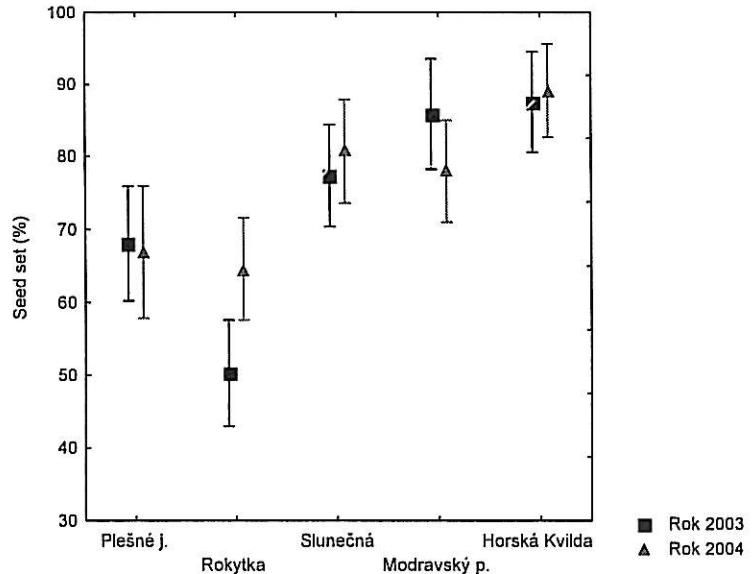
Rozdíly v produkci vyvinutých semen resp. jejich podílu v semenících (seed set) ve dvou vegetačních sezónách (2003, 2004) byly hodnoceny pouze v rámci pěti šumavských lokalit. I přesto, že odběr semeníků byl proveden v obou sledovaných sezónách r. 2003 a r. 2004 na všech studovaných lokalitách, musely být některé vyloučeny. V případě lokality v karu Černého jezera byla v roce 2004 značná část semeníků napadena housenkami a nebylo tedy možné odebrat dostatečný počet zdravých semeníků. U obou alpských lokalit se nepodařilo v obou sezónách nalézt dostatečný počet semeníků, protože rostliny zde kvetly jen velmi vzácně.

Na získaném souboru dat byly testovány následující hypotézy :

- H1:** Rok 2003 se nelišil od roku 2004 v podílu vyvinutých semen v semenících (seed set) na jednotlivých sledovaných lokalitách ( $F = 1,21$ ;  $p = 0,2717$ ).
- H2:** Podíl vyvinutých semen v semenících (seed set) se nelišil v rámci různých zkoumaných lokalit ( $F = 23,50$ ;  $p < 0,001$ ).
- H3:** Faktory (rok, lokalita) nejsou ve vzájemné interakci ( $F = 2,23$ ;  $p = 0,067$ )

Výsledek provedené analýzy ukázal, že hodnota seed set byla v obou sledovaných letech mezi jednotlivými populacemi velmi podobná (výsledky testu jsou uvedeny v závorce za formulovanou hypotézou). Rozdíly mezi oběma sledovanými sezónami byly zanedbatelné. Pouze v případě lokality Rokytka a částečně lokality Modravský potok byl zaznamenán jistý výkyp hodnot seed set mezi rokem 2003 a 2004. Přes tyto odlišnosti však lze souborně říci, že nižších hodnot dosahovala proměnná seed set v semenících pocházejících z populací na lokalitě Rokytka a z karu Plešného jezera. Naopak vyšší hodnoty byly zjištěny v populacích na lokalitách Modravský potok a Horská Kvilda (tab. 3.2, obr. 3.4). Zvláště patrné to bylo v případě populace na Horské Kvildě, kde byly v obou sledovaných letech zaznamenány signifikantně vyšší hodnoty seed set než na lokalitách Plešné jezero a Rokytka. Celkově nejnižší hodnoty dosahoval podíl vyvinutých semen v semeníku v populaci na lokalitě Rokytka, a to zejména v roce 2003, kdy byl signifikantně nižší než ve všech ostatních populacích s výjimkou populace v karu Plešného jezera (tab. 3.2, obr. 3.4).

**Tabulka 3.2:** Dosažené hladiny významnosti u jednotlivých porovnání hodnoty seed set při testování Tukey testem ve dvoucestné analýze variance s faktory „rok“ a „lokalita“. Statisticky průkazná odlišnost je označena tučně. V závorce za zkratkou lokality je uvedena průměrná hodnota seed set (%). P = Plešné j., R = Rokytka, S = Slunečná, MP = Modravský p., HK = Horská Kvilda



**Obr. 3.4:** Hodnota seed set (%) u jednotlivých populací zjištěná v sezónách r. 2003 a r. 2004. Vynesen je průměr a 95% konfidenční interval.

Lokalita 2003/2004	2003					2004			
	P(68)	R(50)	S(77)	MP(86)	HK(88)	P(67)	R(65)	S(81)	MP(78)
R	0,0611								
S	0,8445	< 0,001							
MP.	<b>0,0288</b>	< 0,001	0,6728						
HK	<b>0,0055</b>	< 0,001	0,3671	0,9999					
P	1,0000	0,1216	0,8984	0,0615	0,0165				
R	0,9999	0,1635	0,4091	<b>0,0021</b>	<b>0,0002</b>	0,9999			
S	0,3407	< 0,001	0,9982	0,9862	0,8998	0,4619	0,0651		
MP	0,5521	< 0,001	0,9999	0,9176	0,7039	0,6657	0,1524	0,9999	
HK(89)	<b>0,0005</b>	< 0,001	0,1004	0,9982	0,9999	<b>0,0023</b>	< 0,001	0,5785	0,3161

Navzdory tomu, že byly nalezeny signifikantní rozdíly v podílu vyvinutých semen v semeníku (seed set) mezi některými populacemi, závislost mezi hodnotou seed set a velikostí či „izolovaností“ populací nebo nadmořskou výškou jejich lokalit nebyla statisticky průkazná (tab. 3.3). Nicméně, i přes velmi malý počet lokalit bylo možné vysledovat jisté trendy mezi sledovanými charakteristikami populací a zjištěnou produkcí vyvinutých semen.

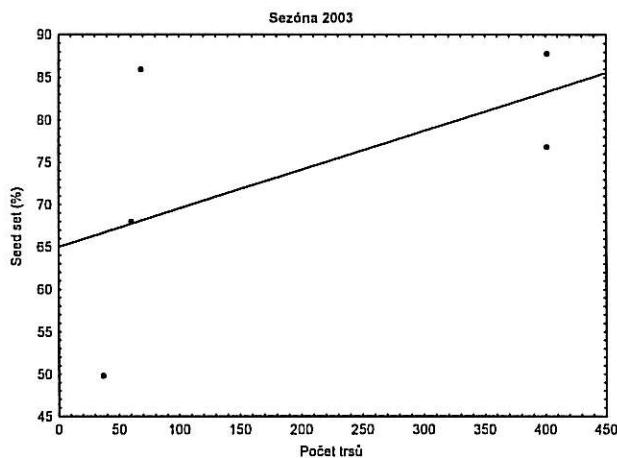
Konkrétně v případě vztahu mezi hodnotou seed set a mírou „izolovanosti“ lokality vyjádřenou pomocí vzdálenosti od nejbližší lokality nebyla nalezena žádná závislost. Ani závislost na nadmořské výšce nebyla příliš výrazná. Pouze v roce 2004 se projevil jistý pokles hodnoty seed set se zvyšující se nadmořskou výškou (obr. 3.6, obr. 3.8).

Na druhou stranu v obou letech byl zaznamenán pozitivní vztah mezi velikostí populace vyjádřenou počtem trsů na lokalitě a podílem vyvinutých semen v semeníku. V roce 2004 se závislost mezi nimi pohybovala dokonce při stanovené hladině významnosti (obr. 3.5, obr. 3.7).

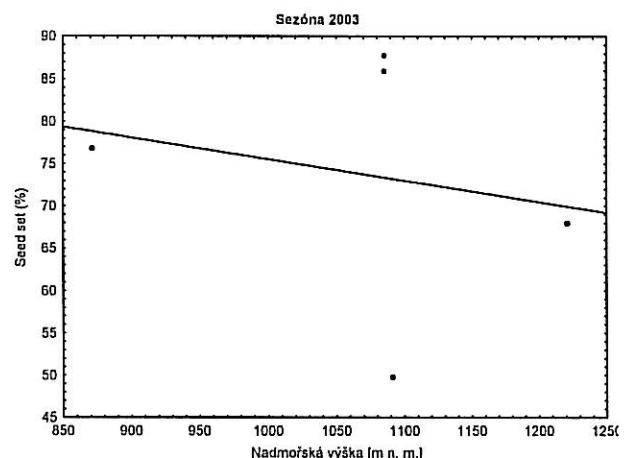
Závěrem je však nutné podotknout, že vzhledem k malému počtu lokalit a statisticky neprůkazným výsledkům jsou všechny uvedené skutečnosti pouze orientační a jejich interpretace je velmi omezená.

**Tabulka 3.3:** Výsledky jednoduché lineární regrese závislosti podílu vyvinutých semen v semeníku (seed set) na velikosti a izolovanosti populace a nadmořské výšky jejich lokalit v obou sledovaných sezónách.

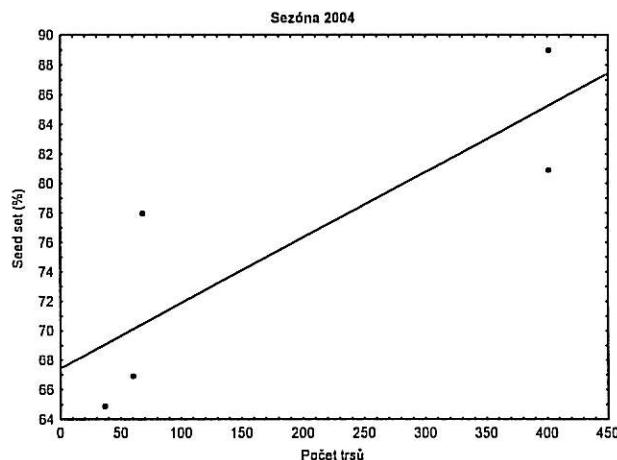
	2003				2004			
	$\beta$	$R^2$	F	p – level	$\beta$	$R^2$	F	p – level
Seed set × vzdálenost	-0,15	0,02	0,07	0,810	-0,17	0,03	0,09	0,784
Seed set × počet trsů	0,55	0,31	1,32	0,333	0,85	0,72	7,59	0,070
Seed set × nadm. výška	-0,19	0,04	0,12	0,755	-0,44	0,19	0,72	0,460



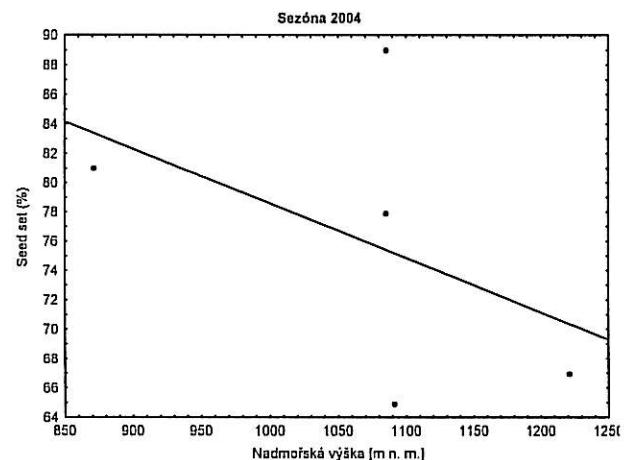
Obr. 3.5: Závislost hodnoty seed set (%) na velikosti populace vyjádřené počtem trsů *G. pannonica* v roce 2003.



Obr. 3.6: Závislost hodnoty seed set (%) na nadmořské výšce zkoumaných lokalit v roce 2003.



Obr. 3.7: Závislost hodnoty seed set (%) na velikosti populace vyjádřené počtem trsů *G. pannonica* v roce 2004.



Obr. 3.8: Závislost hodnoty seed set (%) na nadmořské výšce zkoumaných lokalit v roce 2004.

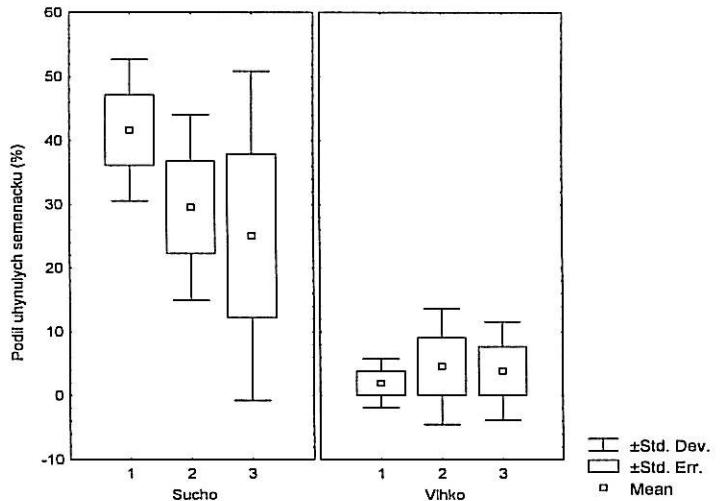
## 3.2 Přežívání semenáčků v závislosti na vlhkostních poměrech stanoviště

Semenáčky umístěné na stanovišti s rozdílnými vlhkostními poměry se signifikantně lišily v přežívání v průběhu vegetační sezóny. Trend byl obdobný ve všech sledovaných čtvercích a nebyly nalezeny žádné významné interakce mezi faktory (tab. 3.4).

Významně vyšší úmrtnost byla zaznamenána na suchých plochách tvořených krátkostébelnou vegetací sv. *Violion caninae* s dominancí *Nardus stricta* a *Avenella flexuosa*. Ve čtvercích umístěných na vlhkých plochách došlo naopak k úhybu pouze nepatrného množství vysazených mladých semenáčků (obr. 3.9). Tyto plochy lze charakterizovat pravděpodobně jako nevyhraněná travní společenstva na přechodu sv. *Caricion fuscae* a sv. *Polygono-Trisetion*.

**Tabulka 3.4:** Dosažené hladiny významnosti u jednotlivých porovnání podílu uhynulých semenáčků (%) při testování dvoucestnou analýzou variance ANOVA, kde čtverec byl použit jako faktor s náhodným efektem. Průkazná odlišnost je znázorněna tučně

	F	p - level
Typ stanoviště	32,29	<b>0,027</b>
Čtverec	0,54	0,593
Interakce	0,87	0,436



**Obr. 3.9:** Rozdíly v podílu uhynulých semenáčků (%) v jednotlivých čtvercích (1, 2, 3) na plochách s různými vlhkostními poměry, vyjádřené pomocí průměru, S.D., SEM.

### 3.3 Hodnocení genetické variability populací *G. pannonica* na různých typech stanovišť pomocí RAPD markerů

Analyzováno bylo 125 vzorků (jedinců) *G. pannonica*. Pět vzorků bylo vyřazeno z důvodu velmi špatné tvorby amplifikačních fragmentů pravděpodobně kvůli poškozené DNA.

Pomocí čtyř vybraných primerů bylo získáno u studovaného druhu *G. pannonica* 38 RAPD markerů v rozmezí od sedmi do jedenácti amplifikačních fragmentů na jeden primer (tab. 3.5, obr. 3.14). Celkem bylo zaznamenáno 31 polymorfních lokusů, což činí 81,6 % všech získaných RAPD markerů. Monomorfních lokusů bylo 7 (18,4 %) ze všech 38 získaných markerů (viz příloha 2). Šest dvojic a jedna trojice vzorků (jedinců) obsahovala totožný soubor RAPD markerů (viz příloha 2).

**Tabulka 3.5:** Použité primery a počet získaných RAPD markerů.

Primer	Sekvence	Velikost mim – max (pb)	Počet amplifikovaných fragmentů		
			Monomorfni	Polymorfni	Celkem
OPB16	TTT GCC CGG A	560 – 3530	3	8	11
OPA7	GAA ACG GGT G	500 – 1375	1	6	7
OPA9	GGG TAA CGC C	200 – 565	0	9	9
OPA17	GAC CGC TTG T	445 – 2500	3	8	11

Výsledek analýzy hlavních koordinát (PCoA) podobnosti jednotlivých populací vyjádřené pomocí genetických vzdáleností (pairwise population  $\Phi_{PT}$  values) ukázal, že většina populací si je geneticky poměrně blízká. Pouze populace pocházející z Horské Kvildy a z lokality Rokytky se částečně odlišují (obr. 3.12). Obdobný výsledek poskytla i analýza PCoA podobnosti všech testovaných jedinců na základě jejich genetických vzdáleností. Byl patrný značný překryv většiny zkoumaných populací (obr. 3.11).

Velmi podobný výsledek poskytla i klastrová analýza, při níž byla použita stejná distanční matici jako v předchozí analýze PCoA. Dendrogram vytvořený metodou UPGMA ukázal taktéž značnou odlišnost malé populace nacházející se při potoce Rokytka na poměrně izolované luční enklávě v oblasti Modravských slatí. Částečně se odlišovala i populace na Horské Kvildě. Naopak velmi blízké se zdají být dvě další populace z oblasti Šumavských plání (Modravský potok, Slunečná). Značná genetická podobnost byla zaznamenána mezi populacemi pocházejícími ze jak šumavských, tak z alpských lokalit nacházejících se v karových stěnách (obr. 3.13).

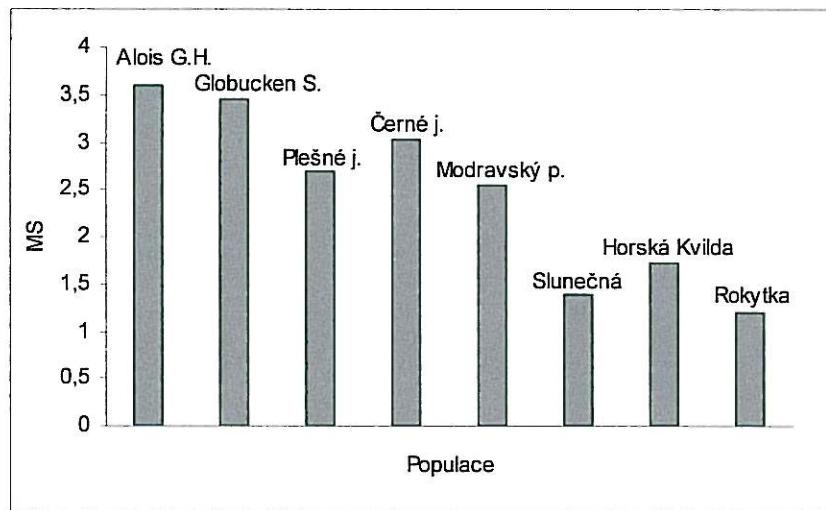
Jak již z výše uvedeného vyplývá, nebyla nalezena žádná významná genetická rozdílnost mezi lokalitami pocházejícími ze dvou odlišných zkoumaných pohoří Alp a Šumavy. Analýza molekulární variance (AMOVA) ukázala, že rozdíly mezi dvěma srovnávanými regiony (Alpy, Šumava) vysvětlují jen nepatrnou část variability (1%) a nejsou statisticky průkazné ( $p = 0,096$ ).

Na druhou stranu byly nalezeny signifikantní genetické rozdíly (tab. 3.6) mezi skupinou tvořenou populacemi nacházejícími se na primárních stanovištích *G. pannonica* (Alois Günther H., Globucken See, Plešné j., Černé j., Modravský potok) a populacemi z druhotných (polopřirozených) horských luk (Horská Kvilda, Slunečná, Rokytka). Konkrétně rozdíl mezi těmito skupinami činil 5% z celkové variability. Rozdíly mezi populacemi uvnitř skupin byly také statisticky průkazné (tab. 3.6) a představovaly přibližně jednu třetinu celkové genetické variability (30%) zkoumaného souboru dat. Největší část variability byla vázána na jedince uvnitř populací (65%) (tab. 3.6).

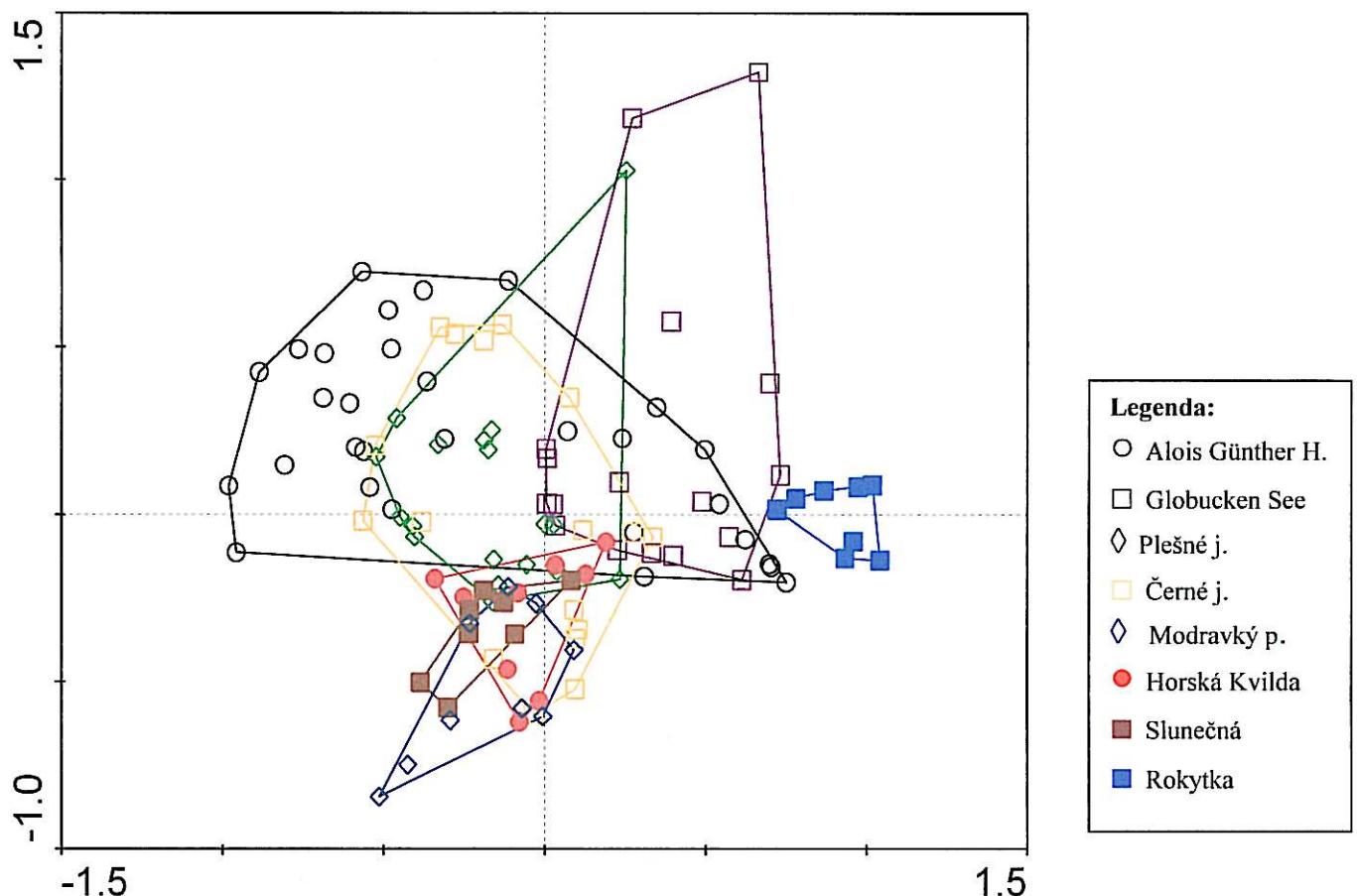
**Tabulka 3.6:** Analýza molekulární variance (AMOVA) 125 jedinců *G. pannonica* při použití 38 RAPD markerů. Analyzovaní jedinci pocházeli ze dvou skupin populací. První skupina reprezentovala 5 primárních stanovišť, druhá 3 sekundární stanoviště. Dosažené hladiny významnosti byly stanoveny permutačním testem při  $N = 999$ .

	df	MS	Variance	Celková variabilita (%)	$\Phi_{PT}$	P-value
Prim. vs. sek. stanoviště	1	33,665	0,039	5	0,047	<0,001
Populace uvnitř skupin	6	22,129	1,358	30	0,317	<0,001
Jedinci uvnitř populací	117	2,787	2,787	65		

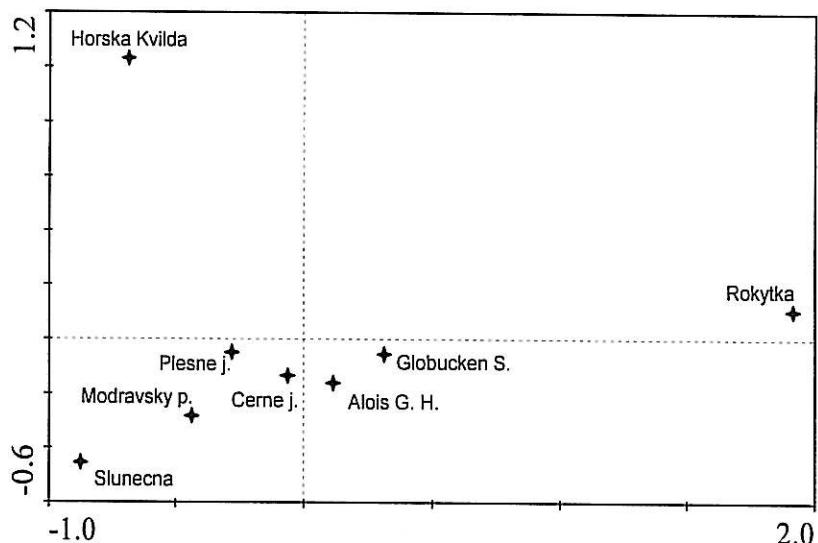
Dalším charakteristikou, která se také lišila mezi populacemi z primárním a druhotným stanoviště, byla velikost genetické variability uvnitř populací vyjádřená pomocí *mean square* (SS uvnitř populace/n-1). Největší genetická variabilita byla zjištěna v populacích na alpských lokalitách (Alois Günther H., Globucken See). V rámci Šumavy byla vyšší variabilita zaznamenána v populacích v karech Plešného a Černého jezera, ale také v populaci rostoucí při břehu Modravského potoka. Nejméně variabilní byly jedinci pocházející z horských luk v oblasti Šumavských plání (obr. 3.10).



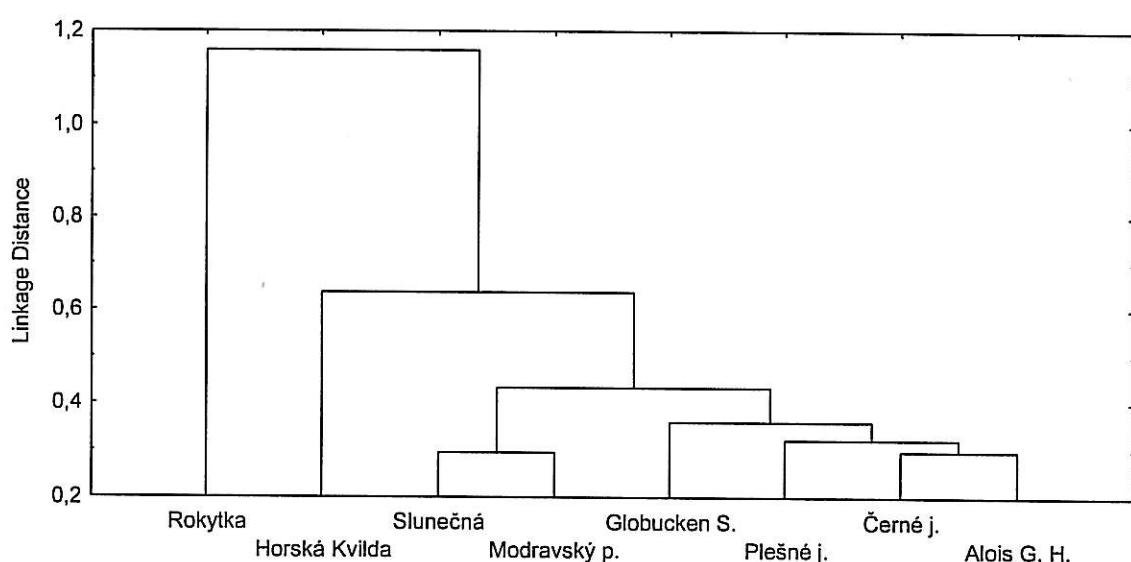
Obr. 3.10: Velikost genetické variability uvnitř jednotlivých populací vyjádřená pomocí hodnoty mean square (SS uvnitř populace/n-1)



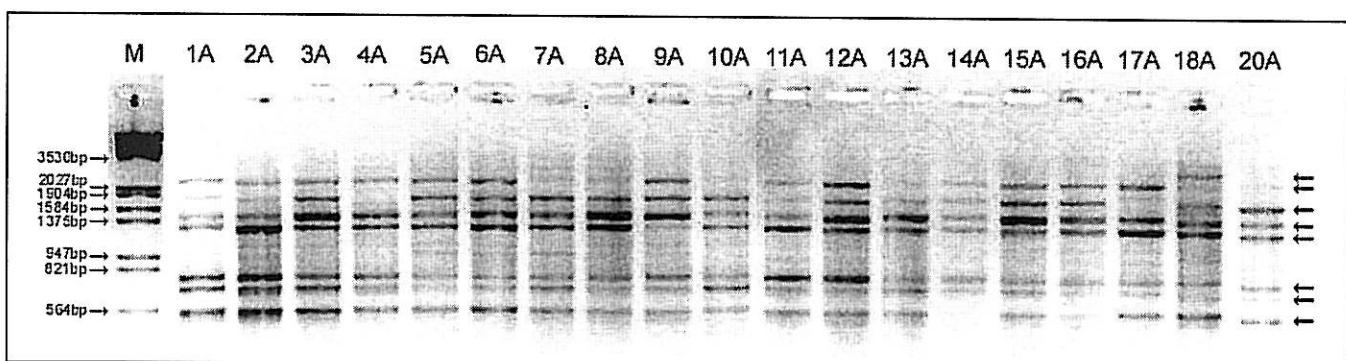
Obr. 3.11: Analýza hlavních koordinát (PCoA) variability RAPD markerů u analyzovaných jedinců druhu *G. pannonica*. První a druhá ordinační osa vysvětlily 35,3 % z celkové variability.



**Obr. 3.12:** Analýza hlavních koordinát (PCoA) variability RAPD markerů; genetická vzdálenost jednotlivých populací je vyjádřena pomocí „pairwise population  $\Phi_{PT}$  values“. První a druhá ordinační osa vysvětlily 83,7 % z celkové variability.



**Obr. 3.13:** UPGMA dendrogram genetických vzdáleností (pairwise population  $\Phi_{PT}$  values) osmi zkoumaných populací *G. pannonica* na základě získaných 38 RAPD markerů. Počty analyzovaných jedinců v jednotlivých populacích jsou uvedeny v tabulce 2.2 (Metodika 2.4.1).



**Obr. 3.14:** Agarózový gel s amplifikovanými fragmenty vytvořené primerem OPB16 u 19 jedinců z lokality Alois Günther Hause v Alpách (vizualizováno pomocí UV transluminátoru). V první lince je standart s uvedenými molekulovými hmotnostmi. Po pravé straně jsou šipkami označeny jednotlivé RAPD markery. Písmenem M je označen DNA standart ( $\lambda$  marker), což je směs fragmentů o známých molekulových hmotnostech. A1 – A20 označuje jednotlivé analyzované vzorky DNA.

## 4 DISKUSE

### 4.1 Reprodukční strategie *G. pannonica* na různých typech stanovišť ve vazbě na jejich vegetační složení a historii výskytu druhu

#### 4.1.1 Vegetační složení jednotlivých stanovišť

Analýza druhového složení základních typů stanovišť *G. pannonica* zaznamenala zřetelný rozdíl mezi primárními a sekundárními stanovišti. Obecně lze říci, že výskyt *G. pannonica* je charakteristický pouze pro omezenou škálu biotopů sekundárního bezlesí. Lokality na druhotných horských loukách v oblasti Šumavských pláních jsou si svým druhovým složením relativně podobné. Jedná se převážně o suché až mírně vlhké louky sv. *Violion caninae* či vřesovištní porosty as. *Arnico montanae-Callunetum* (sv. *Genistion*), které uvádí jako typické pro výskyt *G. pannonica* v oblasti Šumavy i řada dalších autorů, často však s odlišným syntaxonomickým pojetím (PROCHÁZKA 1961, ANONYMUS 1972, KIRSCHNER & KIRSCHNEROVÁ 2000).

Podstatně různorodější je spektrum primárních stanovišť, což je zřejmě dáno nejen jejich geografickou polohou, ale také rozdílnými geologickými, edafickými a klimatickými podmínkami na jednotlivých lokalitách.

Rozdíly mezi karovou stěnou Plešného a Černého jezera jsou zásadním způsobem ovlivněny odlišným geologickým pokladem. Zatímco kar Plešného jezera je tvořen na živiny chudými granitoidy moldanubického plutonu (LOŽEK 2001), geologickým podkladem Jezerní stěny je svor s vložkami pegmatitu (SOFRON & ŠTĚPÁN 1971), což je hornina živinami bohatší. Dokumentuje to například hojný výskyt *Molinia caerulea* v Jezerní stěně, která v karu Plešného jezera zcela chybí. Odlišný je také celkový charakter obou karových stěn, což částečně ovlivňuje stanoviště heterogenitu a rozsah primárně bezlesích ploch. Výskyt *G. pannonica* je charakteristický pro porosty vysokobylinných niv s dominancí *Athyrium distentifolium* (sv. *Dryopterido-Athyriion*) a vysokostébelných trávníků s dominancí *Calamagrostis villosa* (sv. *Calamagrostion villosae*), jejichž charakter je i přes částečně odlišné druhové složení na obou lokalitách velmi podobný. Obecně hojnější je druh v porostech vysokobylinných horských niv, které byly dříve řazeny do as. *Gentiano pannonicae-Athyrietum alpestris* (SOFRON & ŠTĚPÁN 1971), která je ovšem v současném pojetí zahrnuta v rámci variability as. *Adenostylo-Athyrietum alpestris* (KOČÍ 2001).

Výrazná specifika byla zaznamenána i u alpských lokalit. Zde byla *G. pannonica* součástí subalpínských a alpínských společenstev tvořených vyšším zastoupením druhů charakteristických pro vegetaci nad horní hranicí lesa, které na Šumavě nenajdeme, například *Rhododendron ferrugineum* či *Loiseleuria procumbens* nebo druhy *Empetrum*

*hermaphroditum* a *Juncus trifidus*, které v karech jako reliky přežívají, ale jejich výskyt je omezen (SOFRON & ŠTĚPÁN 1971, PROCHÁZKA & ŠTECH 2002).

Zvláštním případem je lokalita při břehu Modravského potoka, která reprezentuje vedle karových stěn a sekundárních horských luk další typ stanovišť *G. pannonica* v oblasti Šumavy. Jedná se o pásy trávníků či drobné luční enklávy na otevřených plochách při břehu převážně větších potoků obklopených lesními porosty (osobní pozorování). Je pravděpodobné, že tyto nevelké otevřené plochy tvořené řídkými, často jen několik desítek centimetrů širokými porosty s dominancí převážně *Calamagrostis villosa* mohly sloužit v průběhu holocénu jako refugia nelesní vegetace. Umožňovaly pravděpodobně přežívat druhům jako například *Aconitum plicatum*, *Ligusticum mutellina* či *Doronicum austriacum* (SÁDLO & BUFKOVÁ 2002).

Získané výsledky napovídají, že by tomu mohlo tak být i v případě *G. pannonica*. Důvodem tohoto předpokladu je částečně podobný charakter vegetace v porovnání s ostatními primárními biotopy. Ovšem i další charakteristiky, jako například přítomnost regenerace semenáčků a v neposlední řadě i vyšší genetická variabilita uvnitř populací, se ukázaly být společné všem primárním stanovištěm (Výsledky 3.3, obr. 3.10). Výskyt těchto refugiálních stanovišť by mohl objasnit možnost přežití *G. pannonica* v oblasti Šumavských plání v zalesněném období holocénu, které je obecně považováno za nejasné (PROCHÁZKA & ŠTECH 2002). Za refugia prvotního významu byly vždy považovány karové stěny Plešného a Černého jezera. V oblasti Šumavských plání se pak objevovaly spekulace o přežití druhu v okrajových částech některých rašelinišť (PROCHÁZKA & ŠTECH 2002), což obecně koresponduje s tradiční představou o primárním bezlesí jakožto málo dynamického blokovaného stadia udržovaného trvalým stresem. V případě bezlesých refugíí podél vodních toků se pravděpodobně jednalo jen o prostorově i časově izolované kratší epizody otevření lesa, které byly závislé na změnách toku například v důsledku meandrování (SÁDLO & BUFKOVÁ 2002). Důležitým faktorem přetrvání tohoto typu bezlesí je také skutečnost, že v důsledku pozdního a poměrně nevelkého odlesnění vyšších partií Šumavy (BENEŠ 1996) nedošlo v nivách vlivem antropogenního otevření krajiny k sedimentaci povodňových hlín (LOŽEK 1973) a s tím spojené významné změny vegetačního složení (RYBNÍČKOVÁ & RYBNÍČEK 1996).

#### 4.1.2 Výskyt semenáčků *G. pannonica*

Velmi zajímavým zjištěním je výskyt semenáčků pouze na lokalitách primárního charakteru. Populační dynamika, a s ní související reprodukční strategie, je v případě klonálních druhů vyznačujících se velmi dlouhým životním cyklem, obecně málo známa. Také regenerace semenáčků je považována u většiny klonálních rostlin za méně častou a značně nepravidelnou (ERIKSSON 1993). Regenerace je také do jisté míry závislá na životní historii, genetické diverzitě a prostorové struktuře populací klonálních druhů (ERIKSSON 1989). Výskyt semenáčků může být také závislý na konkrétním typu stanoviště, kde se daný druh vyskytuje.

Ke studiu a pochopení dynamiky populací klonálních druhů je proto často nutné zvolit prostorově široké měřítko či velmi dlouhou časovou škálu (ERIKSSON 1993, VANDVIK & VANGE 2003).

Poměrně těsná stanovištní vazba klíčení semen a přežívání semenáčků je způsobena celou řadou faktorů jako je teplota, množství opadu, charakter povrchu půdy, vlhkost stanoviště, obsah dusíku, či heterogenita stanoviště. Jedná se proto většinou o velmi zranitelnou životní fázi rostlin, protože ekologická tolerance semenáčků je omezená. Klíčení semen a růst semenáčků je tak často vázán na místa specifická svými vlastnostmi označovanými například jako regenerační niky (HARPER 1977, GRUBB 1977).

V případě studia *G. pannonica* se sice nepodařilo jasně definovat konkrétní rozdíly v podmírkách prostředí mezi primárními a druhotnými stanovišti, ale na základě terénního pozorování se zdá, že právě vlhkost spolu s celkovým charakterem vegetačního krytu stanoviště by mohla být jedním z rozhodujících faktorů. Potvrzuje to i výsledky provedeného experimentu vlivu vlhkosti na přežívání mladých semenáčků (viz Výsledky 3.2, obr 3.9). Vyšší vlhkost může být na primárních typech stanovišť pravděpodobně důsledkem specifických mikroklimatických podmínek jako je například akumulace sněhu v zimním období, většinou nepříliš intenzivní oslunění v průběhu dne a v neposlední řadě i značné zastínění zemského povrchu vegetací (SOFRON & ŠTĚPÁN 1971, WIED & GALEN 1998).

Například v karových stěnách je *G. pannonica* často součástí výrazně chionofilních společenstev nacházejících se v místech, kde dochází během zimy k akumulaci sněhu (SOFRON & ŠTĚPÁN 1971). I v Alpách se semenáčky vyskytovaly na místech, kde orografie terénu napovídala, že zde může docházet k tvorbě sněhových návějí (osobní pozorování). Pomalu odtačající nahromaděný sníh je pak zdrojem vlhkosti na jaře a na počátku letních měsíců, což je obecně zvláště nad hranicí lesa považováno za jeden z významných faktorů ovlivňující druhové složení společenstev vázaných na sněhová výležiska (JENÍK 1961). Obdobně by tento efekt mohl fungovat i v uzavřených údolích potoků, kde omezené oslunění a vliv inverzí značně zpomaluje odtačání sněhu na jaře (osobní pozorování) a obecně zde udržuje vyšší vlhkost.

Dalším významným faktorem ovlivňujícím nepřímo vlhkost půdy je zastínění jejího povrchu vegetací nebo případně i opadem. Výsledkem může být významně vyšší přežívání semenáčků na zastíněných či jinak chráněných plochách v porovnání se semenáčky vyskytujícími se na exponovaných místech (WIED & GALEN 1998). Tento předpoklad potvrzuje částečně i starší studie druhu zabývající se klíčením a přežíváním semenáčků *G. pannonica*, i když jejich vzájemná interpretace výsledků je poněkud nešťastná. Klouda (KLOUDA 1996) poukazuje na významnou změnu v přežívání semenáčků na zcela otevřeném prostředí strženého drnu. Semenáčky zde sice poměrně úspěšně vyklíčily, ale se zvyšováním teploty a ubýváním srážek v průběhu léta jich většina uhynula. Přežily pouze semenáčky na místech chráněných okolní vegetací. Stejný efekt byl částečně pozorován i na suchých

plochách při zaznamenávání úmrtnosti semenáčků v pokusu testujícím vliv vlhkosti na přežívání semenáčků (Výsledky 3.2). Naopak práce Vackové (VACKOVÁ 1997) nezaznamenala významný úhyb semenáčků na plochách se strženým drnem, i přesto že autorka považuje svůj výsledek za totožný s výše uvedenou prací (KLOUDA 1996). Rozdíl v přežívání semenáčků při stejném typu zásahu je pravděpodobně důsledkem rozdílného charakteru stanoviště, na kterém byly pokusy prováděny. Stanoviště, kde došlo téměř k úplnému úhybu semenáčků během vegetační sezóny (KLOUDA 1996), bylo tvořeno suchým krátkostébelným trávníkem s dominancí *Nardus stricta*, zatímco Vacková (VACKOVÁ 1997) prováděla svůj pokus na ploše s dominancí *Carex brizoides*, která je obecně vázána spíše na vlhčí stanoviště (DOSTÁL 1989), a kde přežívání semenáčků nebylo pravděpodobně tolik limitováno suchem v letních měsících.

Obě výše uvedené studie ze zabývají zmlazováním semenáčků na sekundárních horských loukách, kde ovšem v průběhu této práce, ale ani během předchozího studia (HOFHANZLOVÁ 2002) nebyly přirozeně vzniklé semenáčky zaznamenány. Může to být jednak důsledek nízké vlhkosti v letních měsících či nedostatek mikrostanovišť vhodných k vyklíčení semen a regeneraci semenáčků. Právě nedostatek těchto mikrostanovišť může být způsoben strukturou vegetace, která je tvořena převážně graminoidy, k nimž na některých lokalitách přistupují keříčky jako například *Calluna vulgaris*, *Vaccinium uliginosum* či *Vaccinium myrtillus* (viz. příloha 3, HOFHANZLOVÁ 2002). Jedná se většinou o stanoviště velmi světlá, kde zapojení vegetace je poměrně kompaktní a rozvolněná místa provázející poměrně suché plochy často pokryté opadem.

Částečně srovnatelná situace byla zjištěna v alpínské vegetaci ve Finsku, kde nízké hustoty semenáčků různých druhů provázely právě společenstva s dominancí keříčků a graminoidů. Naproti tomu plochy s bohatým výskytem semenáčků byly zaznamenány ve společenstvech s dominancí plazivých keříčků a bylin či s dominantním zastoupením bylin a graminoidů. Obecně se dá říci, že hustota semenáčků tam byla zjištěna vyšší na loukách, sněhových výležiscích a částečně v porostech vysokobylinných niv než na vřesovištích (WELLING & LAINE 2000a), což poměrně dobře odpovídá i situaci zjištěné pro druh *G. pannonica*.

Další zajímavou podobností s touto prací (WELLING & LAINE 2000a) je také neprůkazný vliv pokryvnosti mechrostů a opadu na množství semenáčků v různých typech společenstev, který byl zaznamenán i v případě *G. pannonica*. Důvodem může být různá tloušťka vrstvy opadu a mechrostů v různých typech vegetace (WELLING & LAINE 2000a). V případě *G. pannonica* je významným faktorem i rozdílný charakter opadu na suchých horských loukách tvořený zejména *Nardus stricta* v porovnání s poměrně „měkkým“ opadem *Calamagrostis villosa* či *Athyrium distentifolium*, na němž se semenáčky *G. pannonica* často vyskytují.

Závěrem tohoto bloku lze říci, že zjištěné skutečnosti potvrzují výsledky jiných studií dokazujících (WELLING & LAINE 2000a, 2000b, CHAMBERS 1993), že význam generativní reprodukce druhů v drsných podmínkách arktického či alpínského pásma není pravděpodobně tak druhořadým a vzácným jevem, jak se předpokládalo (ARCHIBOLD 1995), a to i v případě klonálních druhů. Dále je důležité poznamenat, že *G. pannonica* je druhem výhradně horských až vysokohorských biotopů, které jsou spojeny se specifickými klimatickými faktory. Z historie jeho rozšíření se zdá, že šíření a prosperita jeho populací není výhradně závislá na žádném zvláštním způsobu obhospodařování. Navíc na jeho primárních stanovištích probíhá zřejmě obnova populací zcela spontánně a přirozeně. Nelze tedy podmínky potřebné pro regeneraci semenáčků srovnávat s výsledky studií zabývajících se jinými druhy r. *Gentiana* nebo r. *Gentianella* vázanými převážně pouze na druhotná mezická, xerofitní či jiná luční stanoviště sekundárního původu v nižších nadmořských výškách (OSTERMEIJER et al. 1992, 1994, KŘENOVÁ & LEPŠ 1996, FISCHER & MATTHIES 1998b, ROSE et al. 1998), u nichž hráje obhospodařování člověkem klíčovou úlohu.

#### **4.1.3 Produkce vyvinutých semen v závislosti na velikosti populace *G. pannonica***

Produkce semen resp. potomstva u rostlin je často velmi úzce závislá na velikosti a izolovanosti jednotlivých populací (MAVRAGANIS & ECKERT 2001). Zvláště významné je to u druhů cizosprašných, inkompatibilních vůči vlastnímu pylu (BYERS 1995, KÉRY et al. 2000) nebo druhů, kterým v samosprášení zabraňuje řada dalších mechanismů jako je například proterandrie či herkogamie (KÉRY et al. 2000). Míra úspěšné produkce vyvinutých životoschopných semen souvisí tedy nejen s dostatečným množstvím sexuálních partnerů (SCHEMSKE & LANDE 1985b), ale také s počtem opylovačů či přítomností jiného faktoru zajišťujícího úspěšné opylení (KWAK 1988, KWAK et al. 1998). K narušení reprodukčních schopností populací a redukci výsledné fitness jejich potomstva může docházet jak vlivem genetických procesů probíhajících v malých a izolovaných populacích (SCHEMSKE & LANDE 1985a, CHARLESWORTH & CHARLESWORTH 1987), tak často také neschopností populace přilákat dostatečné množství vhodných opylovačů (SPIRA & POLLAK 1986, KWAK & JENNERSTEN 1991).

Řadu výše uvedených skutečností lze pozorovat i na studovaných populacích *G. pannonica*. Z pěti sledovaných populací měli významně nižší seed set dvě nejmenší populace, jejichž historie i charakter jsou podstatně odlišné (Výsledky 3.1.1). Zatímco populaci v karu Plešného jezera lze bezesporu označit za klasickou reliktní populaci s probíhající úspěšnou generativní reprodukcí, populace při břehu potoka Rokytky je naopak příkladem výskytu *G. pannonica* na druhotných horských loukách, kde převládá klonální šíření. Obě populace však mají jedno společné, a to jejich relativní nenápadnost pro případné opylovače, což je do jisté míry dáno nejen jejich výskytem na značně omezené ploše, ale v případě karu Plešného jezera také roztroušeným růstem ve vysokobylinné vegetaci. Je

známa řada jiných případů, kde je nižší hodnota seed set v semenících také přisuzována neschopnosti malých a relativně nenápadných populací přilákat dostatek opylovačů (KWAK & JENNERSTEN 1991, SCHMIDT & JENSEN 2000) a patří mezi ně i druhy z čeledi *Gentianaceae* (SPIRA & POLLAK 1986, PETANIDOU et al. 1995, FISCHER & MATTHIES 1997, KÉRY et al. 2000).

Zdá se tedy velmi pravděpodobné, že nedostatečné opylení bylo hlavním důsledkem nízké hodnoty seed set i v semenících *G. pannonica* na výše uvedených lokalitách. Druh není sice inkompatibilní vůči vlastnímu pylu, ale díky dobře vyvinuté herkogamii je úspěšný vývoj semen závislý na opylení hmyzem (HOFHANZLOVÁ 2002, HOFHANZLOVÁ & KŘENOVÁ 2004). Domněnu, že nižší hodnota seed set je důsledkem omezené schopnosti přilákat dostatečné množství opylovačů, potvrzuje i velmi vysoká hodnota seed set zaznamenaná po několik let v populaci na lokalitě Horská Kvilda (HOFHANZLOVÁ 2002, HOFHANZLOVÁ & KŘENOVÁ 2004). Jedná se o populaci <sup>arum</sup> velmi početnou, bohatě kvetoucí, kterou nelze v době květu přehlédnout i z velké vzdálenosti. Podobně nápadná je i populace na lokalitě Slunečná, což potvrzuje obecný předpoklad, že velká populační hustota může mít v mnoha případech pozitivní vliv na plodnost zvláště u rostlin citlivých na nedostatek pylu při opylení či inkompabilních, protože jsou mnohem nápadnější a atraktivnější pro opylovače (ERIKSSON 1993). Obdobný výsledek přinesla i studie opylovací strategie *Swertia perennis* (LIENERT & FISCHER 2004), kde jednotlivé populace byly sice značně roztroušené a často izolované, ale početné a nápadné. Také zde nebyla zaznamenána žádná redukce seed set v semenících pocházejících z přirozeně opylených květů.

Dalším faktorem, který může být důvodem nižšího množství opylovačů, je také poloha lokalit s nižší hodnotou seed set uvnitř rozsáhlých lesních komplexů. V případě Plešného jezera by mohla být příčinou přirozeně nižšího množství vhodných opylovačů také poměrně vysoká nadmořská výška (MALO & BAONZA 2002). Přesto, že výsledky ukázaly jistou negativní závislost (Výsledky 3.1.2; obr. 3.6, 3.8) hodnoty seed set a nadmořské výšky, nelze toto vysvětlení snížené hodnoty seed set založené na předpokladu snižujícího se počtu opylovačů s rostoucí nadmořskou výškou na základě získaných dat použít. Nelze totiž opomenout, jak velmi malý počet dat byl pro výpočet závislostí použit. Všechny závěry jsou pouze orientační a při jejich interpretaci je nezbytná značná opatrnost zhledem k počtu sledovaných lokalit i statisticky neprůkazným výsledkům jednotlivých závislostí.

Otázkou ovšem zůstává, jakou měrou může být snížení hodnoty seed set projevem inbredních depresí, které jsou často zaznamenávány v malých populacích jako negativní důsledek zvýšené míry inbreedingu a s ním spojené ztráty genetické variability v populacích (SCHEMSKE & LANDE 1985a, CHARLESWORTH & CHARLESWORTH 1987). Předchozí studie ukázaly, že druh je potenciálně k projevům inbreedingu náchylný, protože uměle samosprášené květy produkovaly podstatně nižší množství vyvinutých semen než druhy uměle cizosprášené (HOFHANZLOVÁ 2002, HOFHANZLOVÁ & KŘENOVÁ 2004). Stejně tak řada

dalších prací interpretuje nižší reprodukční schopnosti a sníženou fitness potomstva v malých populacích právě jako důsledek inbreedingu a nízké genetické variability (SCHMIDT & JENSEN 2000, VERGEER et al. 2003).

Na základě výše uvedených předpokladů je možné uvažovat, že vliv inbredních depresí se projevil pouze v populaci na lokalitě Rokytna, kde byla, kromě snížené hodnoty seed set, zjištěna i velmi nízká genetická variabilita uvnitř populace (Výsledky 3.3, obr 3.10, viz příloha 2). V ostatních populacích není souvislost mezi nízkou vnitropopulační variabilitou a redukcí hodnoty seed set nijak zvlášť patrná. Jedinou výjimkou je populace na lokalitě Slunečná, kde je patrný mírný pokles hodnoty seed set a zjištěná variabilita uvnitř populace je také nízká. Vynikne to ovšem pouze částečně při srovnání s populací na Horské Kvildě. Obě populace jsou obdobně rozsáhlé a za květu velmi nápadné. Ovšem dávat toto mírné snížení do souvislosti s projevem inbrední deprese vzhledem k poněkud vyšší genetické variabilitě uvnitř populace na Horské Kvildě (Výsledky 3.3, obr 3.10) se zdá být příliš odvážné.

## 4.2 Hodnocení genetické variability populací *G. pannonica* na různých typech stanovišť pomocí RAPD markerů

Genetický polymorfismus v populacích je možné detektovat pomocí celé řady metod jednak na úrovni fenotypových projevů (elektroforéza enzymů) a jednak na úrovni DNA (BRIGGS & WALTERS 2001). Vzhledem k historickému vývoji rozšíření, geografické poloze studovaných populací a významné roli klonálního růstu byla u druhu *G. pannonica* předpokládána spíše nižší úroveň genetické variability. Proto byla pro studium genetických rozdílů vybraných populací zvolena metoda detekující polymorfismus na úrovni DNA, konkrétně metoda využívající RAPD markery (Randomly Amplified Polymorphic DNA – WILLIAMS et al. 1990). Alozymové metody totiž obecně odhalují pouze variabilitu fenotypovou, která je mnohem nižší než variabilita genotypu, protože celková genotypová variabilita na strukturních místech zůstává skryta (KREIMAN 1993), což může podstatně snižovat zaznamenanou míru polymorfismu (SEGARRA-MORAGUES & CATALÁN 2003). Zejména v malých a geneticky izolovaných populacích ohrožených druhů alozymové markery ukazují často jen velmi malý nebo žádný polymorfismus (BARRET & KOHN 1991).

RAPD markery jsou všeobecně považovány za relativně nenáročnou a účinnou metodu detekující polymorfismus genomu, a to zejména u druhů, u kterých není dostatek informací na úrovni DNA. V posledním desetiletí byla proto tato metoda hojně využívána pro studium genetické struktury zvláště rostlinných druhů (BAKER 2000). Je ovšem také provázena řadou nevýhod (Metodika 2.4.2), a proto se od ní v současné době spíše ustupuje a využívá se pouze k prvnímu orientačnímu průzkumu celkové variability genomu populací zkoumaných druhů (HARAŠTOVÁ 2003). Nespornou výhodou však zůstává její relativně nízká finanční náročnost, což bylo nezadecbatelným důvodem jejího použití v této studii.

Již „screening“ jednotlivých primerů potvrdil, že variabilita na úrovni genomu není u tohoto druhu pravděpodobně nijak zvlášť vysoká. Pouze čtyři z testovaných 35 primerů zaznamenaly nějaký polymorfismus. Přesto byl pomocí těchto čtyř primerů získán relativně vysoký počet polymorfních RAPD markerů (81,6%). Na základě tohoto výsledku lze poukázat na nesporné výhody metod detekujících polymorfismus na úrovni DNA, které často odhalí variabilitu i u vzájemně značně podobných jedinců či populací (GABRIELSEN & BROCHMANN 1998, SEGARRA-MORAGUES & CATALÁN 2003).

Je nesporné, že hlavním faktorem ovlivňujícím genetickou podobnost a vnitropopulační či mezipopulační variabilitu je způsob rozmnožování v kombinaci s historií druhu na daných stanovištích (HAMRICK et al. 1991). Například u cizosprašných druhů se obecně vyšší genetické diverzita vyskytuje mezi jedinci uvnitř populace než mezi populacemi (SEGARRA-MORAGUES & CATALÁN 2003). Naopak u druhů, u nichž se vyskytuje samosprášení, je většinou zaznamenávána vyšší diferenciace na úrovni populací (WOLFF et al. 1994, FISCHER & MATTHIES 1998a). Zvláště se to pak může projevit u úzce endemických taxonů v izolovaných populacích (JIMÉNEZ et al. 2002).

Těmto obecným zjištěním odpovídá i výsledek zaznamenaný u *G. pannonica*, kde stejně jako u jiných cizosprašných druhů byla vnitropopulační variabilita vysoká, zatímco jednotlivé populace nebyly až na výjimky (Rokytnka) příliš geneticky odlišné. Je ovšem pozoruhodné, že nebyla nalezena téměř žádná genetická odlišnost mezi populacemi pocházejícími z Alp a ze Šumavy. Největší rozdíly v rámci jednotlivých populací se objevily mezi populacemi sekundárních horských luk v oblasti Šumavských plání a ostatními populacemi vyskytujícími se na primárních stanovištích jak v Alpách, tak na Šumavě.

Nízká genetická rozdílnost mezi populacemi a vysoká vnitropopulační variabilita mohou často dokumentovat významnou míru genetického toku, který mezi populacemi probíhá nebo v relativně v nedávné době probíhal (HAMRICK & GOTTH 1996). V případě druhu *G. pannonica* tomu ovšem odporuje značná izolovanost populací a omezená schopnost šíření pylu a semen. Naopak velká mezipopulační variabilita, která obvykle ukazuje na vysoký stupeň prostorové izolace a genetické diferenciace mezi populacemi (FISCHER & MATTHIES 1998a, SCHMIDT & JENSEN 2000) u studovaného druhu zjištěna nebyla.

Vysvětlení je však možné hledat v historii rozšíření *G. pannonica* ve spojení s jeho životní strategií. *G. pannonica* je na Šumavě považována za prvek alpského migrantu (KLÁŠTERSKÝ 1961). Vezmeme-li v úvahu, že během chladných výkyvů pleistocénu byl výskyt alpínské vegetace z důvodu horského zalednění soustředěn do středních a podhorských poloh (RYBNÍČKOVÁ & RYBNÍČEK 1996), je možné, že vzdálenost alpských a šumavských lokalit *G. pannonica* byla mnohem menší, něž je tomu dnes. Navíc šíření diaspor v otevřené krajině konce pleistocénu a počátku holocénu (LOŽEK 1973) mohlo vlivem silného větru a zvláště na sněhové pokrývce probíhat na značnou vzdálenost. Je tedy možné, že čas, který

uběhl od migrace či izolace lokalit vlivem vývoje lesní vegetace v holocénu, byl příliš krátký k formování specificky geneticky odlišných populací.

Obdobným způsobem je interpretována nízká mezipopulační variabilita u jiných dlouhodobě vytrvalých, cizosprašných druhů, zvláště v souvislosti se zpětnou kolonizací horských či arktických oblastí po ústupu zalednění (SEGARRA-MORAGUES & CATALÁN 2003, GABRIELSEN et al. 1997). Generační doba u řady dlouhodobě vytrvalých a zvláště klonálních druhů jako *G. pannonica* je extrémně dlouhá a jejich populace se mění velmi pomalu (ERIKSSON 1993). Z těchto důvodů změny v genomu musí pravděpodobně probíhat velmi dlouho. Nicméně skutečnost, že geografická vzdálenost nemusí být určujícím faktorem míry genetické podobnosti jednotlivých populací potvrdila řada dalších studií (FISCHER & MATTHIES 1998a, SEGARRA-MORAGUES & CATALÁN 2003, ZAHREDDINE et al. 2004).

Na závěr je však nutné poznamenat, že situace, kdy v podstatě žádný marker nebyl specifický pro jednotlivé zkoumané regiony, nemusí nutně znamenat, že alpské a šumavské populace se geneticky téměř neliší. Nebyl pouze nalezen vhodný primer, který by genetickou variabilitu mezi regiony odhalil. Ovšem na základě skutečnosti, že bylo testováno 35 různých primerů a žádný z nich podstatnou variabilitu neukázal, lze říci, že populace v těchto regionech mají velmi mnoho společného. Pro jistější potvrzení nízké genetické variability mezi regiony by však bylo nutné testovat mnohem více různých primerů, což ovšem nebylo vzhledem k omezeným finančním prostředkům v rámci této práce možné. Tato skutečnost spolu s dominantním charakterem RAPD markerů omezují poněkud možnosti interpretace.

Jak již bylo uvedeno výše, více než lokality alpské se geneticky odlišovaly populace z oblasti Šumavských plání, a to zejména malá a relativně izolovaná populace při břehu potoka Rokytka. Zřetelná odlišnost této malé populace může být pravděpodobně důsledkem působení genetického driftu, který následoval po bottlenecku způsobeného ústupem bezlesí v průběhu holocénu (BARRET & KOHN 1991). Podobně, i když ne již tak výrazně, je to patrné v případě dalších lokalit (Horská Kvilda, Slunečná, viz Výsledky 3.3, obr. 3.12). Rozvoj lesní vegetace, který způsobil úbytek veškerých heliofilních stanovišť, vyvolal značný ústup populací *G. pannonica* na velmi omezená, malá refugia vhodných nelesních společenstev (PROCHÁZKA & ŠTECH 2002). V oblasti Šumavských plání to mohly být zřejmě drobné otevřené plochy podél větších vodních toků, jak již bylo zmiňováno výše. Zde však přežíval pravděpodobně pouze nepatrý počet jedinců původních populací, což mohlo vlivem již uvedeného genetického driftu (náhodné změny v přenosu alel z generace na generaci) podstatně pozměnit genetickou strukturu jednotlivých populací (BARRET & KOHN 1991, FISCHER et al. 2000).

Obdobné výsledky přinesla i studie druhu *Saxifraga oppositifolia* (GABRIELSEN et al. 1997). Bylo zjištěno, že většina populací na celém území Norska si je značně geneticky podobná. Jediná významně geneticky odlišná populace se nachází na malé izolované lokalitě

při pobřeží v jižním Norsku, kde došlo vlivem zalesnění v průběhu holocénu k výrazné redukci vhodných stanovišť.

Významné změny populační početnosti a hustoty v průběhu historie výskytu *G. pannonica* na Šumavě ovlivnily také míru celkové genetické variability uvnitř současných populací studovaného druhu. Vlivem bottlenecku způsobeného dramatickým snížením počtu jedinců jednotlivých populací v důsledku změny prostředí dochází totiž velmi často ke ztrátě genetické variability (BARRET & KOHN 1991). Po příznivé změně podmínek prostředí může často docházet k opětovnému nárůstu populačních početností z několika přeživších jedinců, kteří nesou pouze zlomek celkové genetické variability rodičovské populace. Tato situace, označovaná jako efekt zakladatele (founder effect), může vést nejen k částečnému rozrůznění jednotlivých populací, ale také většinou značně poznamená právě úroveň genetické variability v populacích (MAYR 1963, HENRICK 1983, BARRET & KOHN 1991, BAUERT et al. 1998, SCHMIDT & JENSEN 2000).

Výše uvedené zákonitosti lze pravděpodobně pozorovat i v případě studovaných populací *G. pannonica*. V porovnání s alpskými byla v šumavských populacích zaznamenána obecně nižší genetická variabilita. Projevil se tak pravděpodobně dramatický ústup populací v období klimatického optima holocénu a také izolovaná pozice šumavských populací vůči centru areálu *G. pannonica*, které se nachází ve východních Alpách (KRIST 1933, PROCHÁZKA 1961).

V rámci Šumavy lze obecně říci, že vyšší genetická variabilita byla zaznamenána na stanovištích, která sloužila jako refugia a kde byla zjištěna úspěšná generativní reprodukce (Výsledky 3.3, obr. 3.10). To znamená v populacích vázaných na primárních stanoviště v karech Černého a Plešného jezera a při břehu Modravského potoka. Mírné snížení genetické variability populace u Modravského potoka je pravděpodobně možné vysvětlit významnějším působením bottlenecku následovaného genetickým driftem způsobeným omezeným počtem jedinců, kteří mohli na těchto stanovištích přežívat.

Naopak velmi nízká genetická variabilita byla zjištěna v populacích na sekundárních horských loukách v oblasti Šumavských plání. Tyto populace pravděpodobně vznikly po odlesnění z velmi omezeného počtu jedinců přeživších na otevřených plochách podél vodních toků. Možnosti úspěšné generativní reprodukce jsou pravděpodobně na těchto často suchých a relativně zapojených stanovištích velmi omezené (Výsledky 3.1, obr 3.3) a zdá se, že zde převažuje klonální šíření. Úvaha, že regenerace semenáčků mohla být v minulosti na horských loukách přítomna díky narušování povrchu vlivem pastvy dobytka, je velmi sporná. Dobytek totiž nadzemní části *G. pannonica* velmi selektivně spásá (osobní pozorování). Je tedy velmi pravděpodobné, že na pasených místech nemohly rostliny vůbec kvést a tvořit semena. Pastva mohla naopak podporovat jejich klonální šíření. To vše samozřejmě velmi limituje míru genetické variability v jednotlivých populacích.

Nelze také podceňovat významnou roli člověka v rozšíření *G. pannonica* na sekundárních stanovištích, který tuto okrasnou a užitkovou rostlinu (RUKAVIČKA 1926) pravděpodobně vysazoval do okolí svých obydlí (HOFHANZLOVÁ 2002). Na druhou stranu způsobil člověk masivním sběrem jejich oddenků další významný pokles populačních početností *G. pannonica* před druhou světovou válkou (PROCHÁZKA 1961), což mohlo ještě zvýšit ztrátu genetické variability jejich populací. Zůstává však otázkou, jak dramatické bylo skutečné snížení populačních početností v tomto období. Je totiž možné, že populace na intenzivně pasených plochách nemusely být vůbec zaznamenány, a proto údaje o téměř úplném vymizení druhu v předválečném období (KRIST 1933, HILITZER 1935) mohly být částečně přehnané. Příčinnou těchto úvah je skutečnost, že rychlosť s jakou došlo k opětovnému rozšíření *G. pannonica* po válce a po ukončení sběru oddenků původním německým obyvatelstvem se zdá být až neuvěřitelná. To je tvrzení sice velmi odvážné, ale vzhledem k současnému pozorování dynamiky populací *G. pannonica* (Křenová, ústní sdělení, osobní pozorování) a velmi pomalému růstu jedinců (ŠOUREK 1963), je možné o něm uvažovat.

## 5 ZÁVĚR

Předkládaná práce si kladla za cíl zaznamenat základní rozdíly mezi jednotlivými populacemi *G. pannonica* na různých typech stanovišť v oblasti Šumavy a porovnat je s populacemi v Alpách. Získané výsledky lze stručně shrnout do těchto bodů:

1. Analýza druhového složení základních typů stanovišť *G. pannonica* zaznamenala zřetelný rozdíl mezi primárními a sekundárními stanovišti. Zatímco primární stanoviště v oblasti Šumavy představují porosty vysokobylinných horských niv s dominancí *Athyrium distentifolium* (sv. *Dryopterido-Athyriion*) a vysokostébelných trávníků s dominancí *Calamagrostis villosa* (sv. *Calamagrostition villosae*), tak na silikátových podkladech v Alpách je *G. pannonica* součástí spíše nižší rozvolněné vegetace subalpínských a alpínských trávníků, často s významným zastoupením keříčků a bylin.
2. Výskyt semenáčků *G. pannonica* byl zaznamenán pouze na stanovištích primárního charakteru (karové stěny, břehy potoka). V populacích na sekundárních horských loukách se nepodařilo regeneraci semenáčků zaznamenat.
3. Dostatečná vlhkost v průběhu celého vegetačního období se zdá být jedním s podstatných faktorů, které ovlivňují přežívání semenáčků *G. pannonica*. V provedeném terénním experimentu přežívaly mladé semenáčky mnohem lépe na vlhkých než na suchých plochách.
4. Světlé, otevřené plochy podél vodních toků vznikající například tvorbou náplavů či změnami meandrování lze označit za možná refugia druhu *G. pannonica* v oblasti Šumavských plání. Svědčí pro to řada podobností s vegetačním složením stanovišť na primárním bezlesí v karech Černého a Plešného jezera, výskyt semenáčků a vyšší genetická variabilita uvnitř populace.
5. Velikost populace a její schopnost přilákat dostatečné množství opylovačů by mohla být jedním z velmi důležitých faktorů ovlivňujících produkci vyvinutých semen. V případě malé populace s velmi nízkou vnitropopulační variabilitou při břehu potoka Rokytky lze zvažovat, že významně snížená hodnota seed set je důsledkem inbrední deprese.
6. Pomocí provedených analýz bylo získáno u druhu *G. pannonica* 38 RAPD markerů, z nichž 81,6 % ukazovalo polymorfismus mezi zkoumanými vzorky. Výsledky ukázaly značnou variabilitu mezi jedinci uvnitř populací. Na úrovni populací byly částečně odlišné pouze populace na sekundárních horských loukách v oblasti Šumavských plání, zejména se lišila malá a relativně izolovaná populace u potoka Rokytky. Nebyla nalezena žádná významná rozdílnost mezi šumavskými a alpskými populacemi. Odlišnost populací

z oblasti Šumavských plání je pravděpodobně důsledkem prudkého poklesu populačních početností způsobeného zalesněním v průběhu holocénu. Vzhledem k omezenému výskytu a velikosti otevřených ploch v této oblasti Šumavy zde mohl přežít pouze nepatrný vzorek původních populací.

7. Nejvyšší míra vnitropopulační genetické variability byla zaznamenána v alpských populacích vyskytujících se v centru areálu studovaného druhu. V rámci Šumavy byla vyšší genetická variabilita zjištěna na stanovištích, která pravděpodobně sloužila jako refugia v zalesněném období holocénu, a kde byla zaznamenána úspěšná generativní reprodukce. V populacích na sekundárních horských loukách v oblasti Šumavských plání byla genetická variabilita velmi nízká. Na genetické struktuře těchto populací se zřejmě významněji projevil prudký pokles populačních početností v souvislosti se zalesněním v holocénu, a poté vliv efektu zakladatele při zpětné kolonizaci odlesněných území. Nespornou úlohu lze přisoudit také preferenci klonálnímu růstu na tomto typu stanovišť.

Zjištěné výsledky naznačují, že vitalita populací *G. pannonica* na Šumavě není v současnosti významně limitována jejich relativní izolovaností a v některých případech nízkou vnitropopulační variabilitou. A to i přes všeobecně uznávanou skutečnost, že více náchylné ke ztrátě genetické variability a různým projevům genetické eroze jsou druhy, jejichž rozšíření se několikrát měnilo vlivem historických změn (HUENNEKE 1991). Redukce fitness potomstva (semen) vlivem nízké genetické variability lze předpokládat pouze v případě malé a značně izolované populace, kde významnou roli mohlo hrát i nedostatečné opylení. Je sice pravdou, že u vytrvalých druhů nemusí být negativní důsledky malé populační velikosti a izolace zřejmě po dlouhou dobu vzhledem k jejich často velmi nízké úmrtnosti (TAMM 1972), přesto ztráta genetické variability může vést ke snížení schopnosti populace reagovat na změnu podmínek prostředí, a snižuje tak možnost úspěšného přežití (BARRET & KOHN 1991).

V současnosti není nutné se o osud *G. pannonica* na Šumavě nijak zvlášť obávat a volit pro její populace zvláštní management. Studovaný druh má v této oblasti jasně definovaná, zachovalá primární stanoviště, kde přežívá a rozmnožuje se nezávisle na činnosti člověka po dlouhá období. Také na druhotně bezlesých stanovištích úspěšně přežíval a šířil se bez přímé asistence lidské činnosti. Nelze ho tedy srovnávat s řadou jiných vzácných a ohrožených druhů, jejichž výskyt byl a je zcela závislý na vytváření dostatečného množství vhodných stanovišť člověkem. V dlouhodobém měřítku je na druhotných stanovištích pouze nutností zabránit spontánnímu zalesnění území, které by vedlo k významnému poklesu jeho populačních početností.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- ADLER W., OSWALD K. & FISCHER R. (1994): Exkursionsflora von Österreich, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, Wien.
- ANONYMUS (1972): Kolektiv pracovníků Jihočeské pobočky ČBS. – Atlas rozšíření rostlin v jižní části Čech, Sborník Jihočeského muzea v Českých Budějovicích – Přírodní vědy – XII – supplementum 3: 24–29.
- ANONYMUS (1998): STATISTICA for Windows. – [Computer program manual], Statsoft, Tulsa.
- ANONYMUS (2001): STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Statsoft, Tulsa.
- ARCHIBOLD O. W. (1995): Ecology of world vegetation. – Chapman & Hall, London.
- BAKER J. A. [ed.] (2000): Molecular Methods in Ecology. – Blackwell Science Ltd., Oxford. [non vidi]
- BARRETT S. C. H. & KOHN J. R. (1991): Genetics and evolutionary consequences of small population size in plants: implication for conservation, pp. 3–30. – In: Falk D. A. & Holsinger K. E. [eds.]: Genetics and Conservation of Rare Plants, Oxford University Press, New York.
- BAUERT M. R., KÄLIN M., BALTISBERGER M. & EDWARDS P. J. (1998): No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers. – Molecular Ecology 7: 1519–1527.
- BENEŠ J. (1996): Les a bezlesí. Vývoj synantropizace české části Šumavy. – Zlatá stezka 2: 11–33.
- BRIGGS D. & WALTERS S. M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. – Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- BYERS D. L. (1995): Pollen quantity and quality as explanations for low seed set in small populations exemplified by *Eupatorium* (*Asteraceae*). – American Journal of Botany 82: 1000–1006.
- DOSTÁL J. (1989): Nová květena ČSSR 2. – Academia, Praha.
- ELLSTRAND N. C. & ELAM D. R. (1993): Population genetic consequences of small population size: Implications for Plant Conservation. – Annual Review of Ecology and Systematics. 24: 217–242.
- ERIKSSON O. (1989): Seedling dynamics and life histories in clonal plants. – Oikos 55: 231–238.
- ERIKSSON O. (1993): Dynamics of Genets in Clonal Plants. – Tree 8 (9): 313–316.
- EXCOFFIER L., SMOUSE P. E. et QUATTRO J. M. (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. – Genetics 131: 479–491.
- FISCHER M & MATTHIES D. (1997): Mating structure, inbreeding depression and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (*Gentianaceae*). – American Journal of Botany 82: 1685–1692.
- FISCHER M. & MATTHIES D. (1998a): RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (*Gentianaceae*). – American Journal of Botany 85 (6): 811–819.

- FISCHER M. & MATTHIES D. (1998b): Experimental demography of the rare *Gentianella germanica*: seed bank formation and microsite effects on seedling establishment. – *Ecography* 21: 269–278.
- FISCHER M., VAN KLEUNEN M. & SCHMID B. (2000): Genetic Allee effects on performance, plasticity and developmental stability in a clonal plant. – *Ecology Letters* 3: 530–539.
- GABRIELSEN T. M., BACHMANN K., JAKOBSEN K. S. & BROCHMANN C. (1997): Glacial survival does not matter: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga oppositifolia*. – *Molecular Ecology* 6: 831–842.
- GABRIELSEN T. M. & BROCHMANN C. (1998): Sex after all: high level of diversity detected in the arctic clonal plant *Saxifraga cernua* using RAPD markers. – *Molecular Ecology* 7: 1701–1708.
- GRUBB P. J. (1977): The maintenance of species richness in plant communities: the importance of the regeneration niche. – *Biological Reviews* 52: 107–145.
- HAMRICK J. L., GODT M. J. W., MURAWSKI D. A. & LOVELESS M. D. (1991): Correlations between species traits and allozyme diversity: Implications for conservation biology, pp. 87–98. – In: Falk D. A. & Holsinger K. E. [eds.]: *Genetics and Conservation of Rare Plants*, Oxford University Press, New York.
- HAMRICK J. L. & GODT M. J. W. (1996): Effect of life history traits on genetic diversity in plant species. – *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B.* 351: 1291–1298. [non vidi]
- HARAŠTOVÁ M. (2003): Application of genetic markers in wild plant population. – Ms. [PhD Thesis, depon in. Zemědělská fakulta JU, České Budějovice].
- HARPER J. L. (1977): *Population Biology of Plants*. – Academic Press, London.
- HEGI G. (1975): *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, band V, teil 3. – Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- HENRICK P. W. (1983): *Genetics of populations*. – Science Books International, Boston.
- HERBEN T. & MÜNZBERGOVÁ Z. (2002): Zpracování geobotanických dat v příkladech., Část I. Data o druhovém složení. – Skriptum, Přírodovědecká fakulta Karlovy univerzity, Praha.
- HILITZER A. (1935): Nezbytná ochrana hořce šumavského (*Gentiana pannonica* SCOP.). – Krása našeho domova 27: 116.
- HOFHANZLOVÁ E. (2002): Reprodukční a opylovací strategie druhu *Gentiana pannonica* SCOP. – Ms. [Bc. Thesis, depon in. Biologická fakulta JU, České Budějovice].
- HOFHANZLOVÁ E. & KŘENOVÁ Z. (2004): Opylovací strategie a reprodukční úspěšnost hořce šumavského (*Gentiana pannonica* SCOP.), pp. 137–142. – In: Dvořák L., Šuster P. [eds.], Aktuality šumavského výzkumu II, Správa NP a CHKO Šumava, Vimperk.
- HOLDEREGGER R. & SCHNELLER J. J. (1994): Are small isolated populations of *Asplenium septentrionale* variable? – *Biological Journal of the Linnean Society* 51: 377–385.
- HOLUB J. & PROCHÁZKA F. (2000): Red list of vascular plants of the Czech Republic – 2000. *Preslia* 72: 187–230.
- HUENNEKE L. F. (1991): Ecological Implications of Genetic Variation in Plant Population, pp. 31 – 44. In: – Falk D. A. & Holsinger K. E. [eds.]: *Genetics and Conservation of Rare Plants*, Oxford University Press, New York.

- HUFF D. R., PEAKALL R. & SMOUSE P. E. (1993): RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm]. – *Theoretical and Applied Genetics* 86: 927–934.
- CHAMBERS J. C. (1993): Seed and vegetation dynamics in an alpine herb field: effects of disturbance type. – *Canadian Journal of Botany* 71: 471–485. [non vidi]
- CHARLESWORTH D. & CHARLESWORTH B. (1987): Inbreeding depression and its evolutionary consequences. – *Annual Review of Ecology and Systematic* 18: 237–268.
- JACQUEMYN H., BRYS R. & HERMY M. (2001): Within and Between Plant Variation in Seed Number, Seed Mass and Germinability of *Primula elatior*: Effect of Population Size. – *Plant Biology* 3: 561–568.
- JANKOVSKÁ V. (2004): Plešné jezero – archiv informací o holocenním a svrchněpleistocenním charakteru vegetace, krajiny a jezerního biotopu (první výsledky) pp. 158–163. – In: Dvořák L., Šuster P. [eds.], *Aktuality šumavského výzkumu II*, Správa NP a CHKO Šumava, Vimperk.
- JENÍK J. (1961): Alpinská vegetace Krkonoš, Kralického sněžníku a Hrubého Jeseníku, teorie anemo-orografických systémů. – Nakladatelství Československé akademie věd, Praha.
- JIMÉNEZ J. F., SÁNCHEZ-GOMEZ P., GÜEMES J., WERNWR O. & ROSELLÓ J. A. (2002): Genetic variability in a narrow endemic snapdragon (*Antirrhinum subbaeticum*, Scrophulariaceae) using RAPD markers. – *Heridity* 89: 387–393.
- KARRON J. D. (1991): Patterns of Genetic Variation and Breeding Systems in Rare Plant Species, pp. 87–98p. – In: Falk D. A. & Holsinger K. E. [eds.]: *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York.
- KÉRY M., MATTHIES D. & SPILLMANN H. H. (2000): Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*. – *Journal of Ecology* 88: 17–30.
- KIRSCHNER J. & KIRSCHNEROVÁ L. (2000): *Gentianaceae* Juss. – hořcovité, pp. 72–110. – In: Slavík B. [ed.]: *Květena ČR* 6, Academia, Praha.
- KLÁŠTERSKÝ I. (1961): Florogenetické prvky Československa (*Erica carnea*, *Chamaebuxus alpestris*, *Cirsium acaule*, *Gentiana pannonica*, *G. asclepiacea*, *Willemetia stipitata*). – *Sborník národního muzea*, Praha, ser. B, 17: 129–157.
- KLOUDA Z. (1996): Regenerační strategie chráněného druhu *Gentiana pannonica* SCOP. – Ms., [Bc. Thesis, depon. in Biologická fakulta JU, České Budějovice.]
- KOČÍ M. (2001): Subalpine tall-forb vegetation (*Mulgedio-Aconitetea*) in the Czech Republic: syntaxonomical revision. – *Preslia* 73: 289–331.
- KREITMAN M. (1993): Nukleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. – *Nature* 304: 412–417. [non vidi]
- KRIST V. (1933): Hořce Československé republiky. – *Sborník Klubu přírodovědeckého v Brně* 16: 60–139.
- KŘENOVÁ Z. & LEPŠ J. (1996): Regeneration of a *Gentiana pneumonanthe* population in an oligotrophic wet meadow. – *Journal of Vegetation Science* 7: 107–112.
- KUBÁT K., HROUDA L., CHRTEK J. jun., KAPLAN Z., KIRSCHNER J. & ŠTĚPÁNEK J. [eds.] (2002): *Klíč ke květeně České republiky*. – Academia, Praha.
- KWAK M. M. (1988): Pollination ecology and seed set in the rare annual species *Melampyrum arvense* L. – *Acta Botanica Neerlandica* 37: 153–163.

- KWAK M. M. & JENNERSTEN O. (1991): Bumblebee visitation and seed-set in *Melampyrum pratense* and *Viscaria vulgaris*: heterospecific pollen and pollen limitation. – *Oecologia* 86: 99–104.
- KWAK M. M., VELTEROP O. & VAN ANDEL J. (1998): Pollen and gene flow in fragmented habitats. – *Applied Vegetation Science* 1: 37–54.
- LANG G. (1994): Quartäre Vegetationsgeschichte Europas: Methoden und Ergebnisse, mit 54 Tabellen / Gerhard Lang. – Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York.
- LEPŠ J. & ŠMILAUER P. (2003): Multivariate Analysis of Ecological Data using CANOCO. Cambridge University Press, Cambridge.
- LEVI A., ROWLAND L. J. & HARTUNG J. S. (1993): Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants. – *Horticultural Science* 28: 1188–1190. [non vidi]
- LIENERT J. & FISCHER M. (2004): Experimental inbreeding reduces seed production and germination independent of fragmentation of populations of *Swertia perennis*. – *Basic and Applied Ecology* 5: 43–52.
- LOŽEK V. (1973): Příroda ve čtvrtohorách. – Acadamia, Praha.
- LOŽEK V. (2001): Geologie, pp. 18–19. – In: Neuhäuslová Z. [ed.]: *Silva Gabreta*, Supplementum 1, Správa Národního parku Šumava, Vimperk.
- LUIJTEN S. H., DIERICK A., OSTERMEIJER J. G. B., RAIJMAN L. E. L. & DEN NIJS H. C. M. (2000): Population Size, Genetic Variation, and Reproductive Success in a Rapidly Declining, Self-incompatible Perennial (*Arnica montana*) in The Netherlands. – *Conservation Biology* 14: 1776 – 1787.
- LYNCH M. & MILLIGAN B. G. (1994): Analysis of population genetic structure with RAPD markers. – *Molecular Biology* 3: 91–99.
- MALO J. E. & BAONZA J. (2002): Are there predictable clines in plant-pollinator interactions along altitudinal gradients ? The example of *Cytisus scoparius* (L.) Link in the Sierra de Guadarrana (Central Spain). – *Biodiversity research* 8: 365–371.
- MAVRAGANIS K. & ECKERT C. G. (2001): Effects of population size and isolation on reproductive output in *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae). – *Oikos* 95: 300–310.
- MAYR E. (1963): Animal Species and Evolution. – Harvard University Press, Cambridge. [non vidi]
- MORAVEC J. (1964): Vegetační poměry Šumavy. – *Ochrana přírody* 19: 66–69.
- MORAVEC J. [ed.]. (1995): Rostlinná společenstva České republiky a jejich ohrožení, 2. ed. – Severočeskou přírodou, Litoměřice.
- NIKLFELD H. (1971): Bericht über die Kartierung der Flora Mitteleuropas. – *Taxon* 20: 545–571.
- OSTERMEIJER J. G. B., DEN NIJS J. C. M., RAIJMAN L. E. L. & MENKEN S. B. J. (1992): Population biology and management of the marsh gentian (*Gentiana pneumonanthe* L.), a rare species in The Netherlands. – *Botanical Journal of Linnean Society*. 108: 117–130.
- OSTERMEIJER J. G. B., VAN 'T VEER R. & DEN NIJS J. C. M (1994): Population structure of the rare, long-lived perennial *Gentiana pneumonanthe* in relation to vegetation and management in The Netherlands. – *Journal of Applied Ecology* 31: 428–438.

- PEAKALL R. & SMOUSE P. E. (2001): GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. – Australian National University, Canberra.
- PERÉZ T., ALBORNOZ J. & DOMINGUEZ A. (1998): An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. – Molecular Ecology 7: 1347–1357. [non vidi]
- PETANIDOU TH., DEN NIJS J. C. M. & OSTERMEIJER J. G. B. (1995): Pollination ecology and constraints on seed set of the rare perennial *Gentiana cruciata* L. in The Netherlands. – Acta Botanica Neerlandica 44 (1): 55–74.
- PRACH K., Štech M. & Beneš J. (1996): Druhotné bezlesí – opomíjená složka biodiverzity Šumavy. – Silva Gabreta 1: 243–247.
- PROCHÁZKA F. (1961): *Gentiana pannonica* SCOP. v ČSSR. – Preslia 33: 268–276.
- PROCHÁZKA F. (1999): *Gentiana pannonica* (L.) SCOP., pp. 167 – In.: Čeřovský J., Feráková V., Holub J., Maglocký Š. & Procházka F.: Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů ČR a SR Vol. 5. Vyšší rostliny, Príroda, Bratislava.
- PROCHÁZKA F. & ŠTECH M. [eds.] (2002): Komentovaný černý a červený seznam cévnatých rostlin české Šumavy, Správa NP a CHKO Šumava & Eko-Agency KOPR, Vimperk.
- ROSE R. J., CLARKE R. T. & CHAPMAN S. B. (1998): Individual variation and the effects of weather, age and flowering history on survival and flowering of the long-lived perennial *Gentiana pneumonanthe*. – Ecography 21: 317–326.
- RUKAVIČKA J. (1926): Naše neoficielní drogy. – Věda přír. 7: 213–220.
- RYBNÍČKOVÁ E. & RYBNÍČEK K. (1996): Původ a vývoj naší travinné vegetace. – Zprávy České Botanické Společnosti 13: 47–54.
- SÁDLO J. & BUFKOVÁ I. (2002): Vegetace vltavského luhu na Šumavě a problém reliktních praluk. – Preslia 74: 67 – 83.
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F. & MANIATIS T. (1989): Molecular Cloning a Laboratory Manual. – Cold Spring Harbor Laboratory Press. [non vidi].
- SEGARRA-MORAGUES J. G. & CATALÁN P. (2003): Life history variation between species of the relictual genus *Borderea* (*Dioscoreaceae*): phylogeography, genetic diversity, and population genetic structure assessed by RAPD markers. – Biological Journal of the Linnean Society 80: 483–498.
- SCHEMSKE D. W. & LANDE R. (1985a): The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. – Evolution 39 (1): 24–40.
- SCHEMSKE D. W. & LANDE R. (1985b): The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. – Evolution 39 (1): 24–40.
- SCHMIDT K. & JENSEN K. (2000): Genetic structure nad AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (*Scrophulariaceae*) and its relation to population size and reproductive components. – American Journal of Botany 87 (5): 678–689.
- SKALICKÝ V. (1988): Regionálně fytogeografické členění, pp. 103–121. – In: Hejný S. & Slavík B. [eds.]: Květena ČSR. 1., Academia, Praha.
- SKALICKÝ V. (1998). Fytogeografický rozbor květeny Šumavy a přilehlých území. Zprávy České Botanické společnosti 32: 117–121.
- SOFRON J. & ŠTĚPÁN J. (1971): Vegetace šumavských karů. – Rozpravy Československé akademie věd 81(1): 1–57.

- SPIRA T. P. & POLLAK O. D. (1986): Comparative reproductive biology of alpine biennial and perennial gentians (*Gentiana*: *Gentianaceae*) in California. – American Journal of Botany 73 (1): 39–47.
- STEHLIK J., BLATTNER F. R., HOLDERECKER R. & BACHMANN K. (2002): Nunatak survival of the high Alpine plant *Eritrichium nanum* (L.) GAUDIN in the central Alps during the ice ages. – Molecular Ecology 11: 2027–2036.
- ŠOUREK J. (1963): *Gentiana pannonica* SCOP. v Krkonoších. – Preslia 35: 18–22.
- ŠULA B. (1957): Hořec pannonský v Jeseníkách. – Zpr. KMV (SLUKO) Olomouc 72: 76.
- TAMM C. O. (1972): Survival and flowering of perennial herbs. III. The behaviour of *Primula veris* on permanent plots. – Oikos 23: 159–166.
- TER BRAAK C. J. F. & ŠMILAUER P. (2002): CANOCO Reference manual and CanoDraw for Windows User's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). – microcomputer Power (Ithaca, NY, USA).
- VACKOVÁ H. (1997): Ekologie porostů *Carex brizoides* v oblasti vrcholové Šumavy. – Ms., [Master thesis, depon. in Biologická fakulta JU, České Budějovice].
- VANDVIK V. & VANGE V. (2003): Germination ecology of the clonal herb *Knautia arvensis*: Regeneration strategy and geographic variation. – Journal of Vegetation Science 14: 591–600.
- WELLING P. & LAINE K. (2000a): Charakteristics of the seedling flora in alpine vegetation, subarctic Finland, I. Seedlings densities in 15 plant communities. – Annales Botanici Fennici 37: 69–76.
- WELLING P. & LAINE K. (2000b): Charakteristics of the seedling flora in alpine vegetation, subarctic Finland, II. Floristic similarity between seedling flora and mature vegetation. – Annales Botanici Fennici 37: 133–147.
- VERGEER P., RENGELINK R., COPAL A. & OUBORG N. J. (2003): The interacting effects of genetic variation, habitat quality and population size on performance of *Succisa pratensis*. – Journal of Ecology 91: 18–26.
- WIED A. & GALEN C. (1998): Plant parental care: Conspecific nurse effects in *Frasera speciosa* and *Cirsium scopulorum*. – Ecology 79 (5): 1657–1668.
- WILLIAMS J. G. K., KUBELÍK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A. & TINGEY S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. – Nucleic Acids Research 18: 6531–6535.
- WOLFF K., ROGSTAD S. H. & SHAAL B. A. (1994): Population and species variation of minisatellite DNA in *Plantago*. – Theoretical and Applied Genetics 87: 733–740. [non vidi]
- ZAHREDDINE H., CLUBBE C., BAALBAKI R., GHALAYINI A. & TALHOUK S. N. (2004): Status of native species in threatened Mediterranean habitats: The case of *Pancratium maritimum* L. (sea daffodil) in Lebanon. – Biological Conservation 120: 11–18.

# PŘÍLOHY

**Příloha 1:** Doplňující charakteristiky studovaných populací

**Příloha 2:** Přehled získaných RAPD markerů

**Příloha 3:** Fytocenologické snímky

**Příloha 4:** Ukázky studovaných lokalit druhu  
*G.pannonica*

# Příloha 1

Doplňující charakteristiky studovaných populací

Charakteristiky studovaných populací. Přesná lokalizace je uvedena v kapitole Metodika (2.2.1, viz tab. 2.1)

Lokalita (zkratka)	Počet trsů <sup>1</sup>	Izolovanost <sup>2</sup> [km]	Nadm. výška [m n. m.]	Typ stanoviště
Plešné jezero (P)	60	7	1170 – 1200	primární
Černé jezero (C)	100	2,5	1184 – 1200	primární
Modravský potok (MP)	0,1	0,1	1085	primární
Rokytká (R)	0,6	0,6	1090	sekundární
Slunečná (S)	8,5	8,5	870	sekundární
Horská Kvilda (HK)	0,2	0,2	1084	sekundární
Globucken See (GS)	> 400	–	1780 – 1935	primární
Alois Günther H. (A)	> 70	–	1749	primární

### Poznámka:

<sup>1</sup> Počet trsů byl na méně početných lokalitách spočítán a na větších lokalitách přibližně odhadnut. V případě populací na alpských lokalitách se jedná vzhledem k omezené znalosti území pouze o velmi přibližný odhad.

<sup>2</sup> Izolovanost populací byla vyjádřena pomocí vzdálenosti k nejbližší jiné známé populaci. Není uvedeno v případě alpských lokalit z důvodů neznalosti území

# Příloha 2

## Přehled RAPD markerů

### **Poznámka:**

- Klon označuje stejným číslem (1–7) vzorky se shodným spektrem RAPD markerů.
- Jednotlivé studované lokality jsou označeny následujícími zkratkami:  
A – Alois Günther Hause, GS – Globucken See, P – Plešné jezero, C – Černé jezero,  
MP – Modravský potok, R – Rokytnka, S – Slunečná, HK – Horská Kvilda

### Přehled získaných RAPD markerů

# Příloha 3

## Fytocenologické snímky

### **Poznámka:**

- Přesná lokalizace snímků resp. transektů je uvedena v kapitole Metodika (2.2.1, viz tab. 2.1)
- Označení lokality (např. 1C1, 1MP) uvádí na prvním místě číslo snímku v transektu, na druhém je uvedena zkratka lokality a na třetím místě číslo transektu (pokud jich bylo na dané lokalitě provedeno více).

Tabulka fytocenologických snímků

# Příloha 4

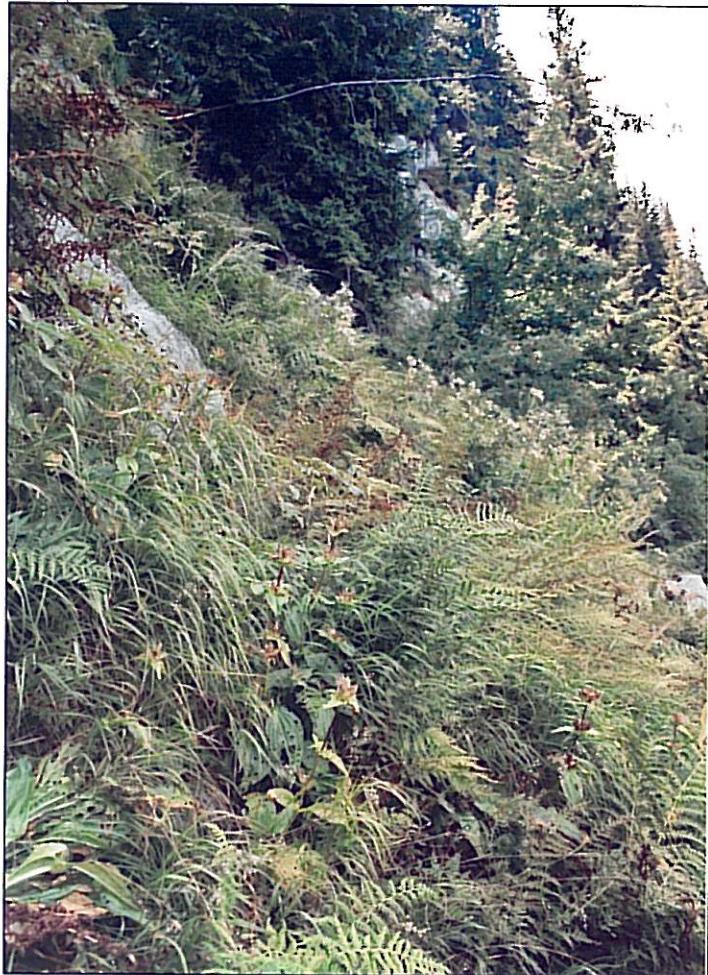
Ukázky studovaných lokalit druhu  
*G.pannonica*



Obr. 1: Rottenmanner Tauern: lokalita *G. pannonica* v karu jezera Globucken See.



Obr. 2: Fischbacher Alpen: lokalita *G. pannonica* na luční enklávě v porostech *Pinus mugo* nedaleko od horské chaty Alois Günther Hause.



Obr. 2: Šumava: *G. pannonica* součástí vysokobylinných porostů v karu Plešného jezera.



Obr. 3: Šumava: Primární bezlesí v karu Černého jezera s výskytem *G. pannonica*.



Obr. 4: Šumava: výskyt *G. pannonica* na drobné loučce v meandru Modravského potoka.



Obr. 5: Šumava, výskyt *G. pannonica* na horské louce sv. *Violion caninae* v blízkosti vrchu Slunečná nedaleko obce Prášily



Obr. 6: Šumava, výskyt *G. pannonica* na lokalitě s charakterem částečně degradovaného vřesoviště na severozápadním okraji obce Horská Kvilda.



Obr. 7: Šumava, výskyt *G. pannonica* na břehu potoka Rokytnka na relativně izolované luční enklávě (Weitfällerská louka) v oblasti Modravských slatí.