

## Popis projektu

**Žadatel:** Botanický ústav AV ČR, v. v. i.

**Název projektu:** Sběr odborných podkladů pro aktualizaci Záchraného programu pro hořeček mnohotvarý český (*Gentianella praecox* subsp. *bohemica*)

**OBLAST PODPORY I „Realizace schválených záchranných programů a programů péče pro zvláště chráněné druhy rostlin a živočichů“.**

### 1. Zaměření projektu (max. 6 bodů, viz kritérium 1)

Účelem této části popisu projektu je shrnout k jakým ZPZCHD/PPZCHD se žádost vztahuje, definovat, zda řeší program jako celek nebo naopak řeší jen část programu (jednotlivá opatření či jejich dílčí aktivity).

Předkládaný projekt je zaměřen na část Záchraného programu pro hořeček mnohotvarý český (*Gentianella praecox* subsp. *bohemica*) a to zejména na oblast 3.4 Výzkum směřující k naplnění alespoň dvou střednědobých cílů – 1) doplnění informací o biologii a ekologii druhu v ČR, které by taktéž mělo napomoci k 2) vytvoření seznamu potenciálních zdrojových lokalit pro repatriace druhu. Projekt se bude věnovat jedné ze třech hlavních oblastí Výzkumu uvedených v Záchraném programu, které stále zůstávají nedostatečně prozkoumány a zasluhují si větší pozornost vzhledem k ochraně druhu a to konkrétně části „Studium genetické variability populací *Gentianella praecox* subsp. *bohemica* a jejich genetické příbuznosti k dalším taxonům rodu“ a s ní související „Výchovou a osvětou“. Studium by tak mělo pomoci potvrdit či vyvrátit efekt inbreedingu na snižování životaschopnosti populací a identifikovat nejcennější populace zasluhující ochranu. Také by mělo pomoci navrhnout jiné, efektivnější, metody pro posilování stávajících populací a identifikovat vhodné zdrojové populace pro přenos, repatriaci či zakládání nových populací.

### 2. Priority navržených opatření v rámci ZPZCHD/PPZCHD (max. 9 bodů, viz kritérium 2)

Účelem této části popisu projektu je přiřadit priority navrženým opatřením, které stanoví schválené ZPZCHD/PPZCHD, případně jsou uvedeny v textu výzvy.

Opatření navrhovaná v rámci předkládaného projektu spadají do oblasti „Výzkum“, kde jsou v rámci záchraného programu pouze navrhovány určité okruhy výzkumu, které je vhodné doplnit, avšak nebyla k nim přiřazena konkrétní priorita. Předkládaný projekt však svými zjištěními bude přesahovat i do dalších částí Záchraného programu, které prioritu stanovenou mají. Jedná se o oblast 3.2 Péče o druh, konkrétně o opatření, 3.2.2 Podpora stávajících populací – s nejvyšší prioritou (1), 3.2.3 Repatriace druhu a 3.2.4 Zakládání nových lokalit – s prioritou střední (2) a 3.2.5 Uchování rostlin v genobance – bez stanovené priority. Dále také budou v rámci předkládaného projektu využity údaje zjištěné v rámci opatření 3.3 Monitoring, konkrétně 3.3.1 Extenzivní monitoring populací – s nejvyšší prioritou (1) a 3.3.4 Monitoring stavu rostlin (tzv. intenzivní monitoring) – s prioritou střední (2) a některá opatření v oblasti 3.5 Výchova a osvěta – 3.5.3 Odborná publikace shrnující výsledky výzkumu druhu – s prioritou střední (2), 3.5.4 Spuštění webových stránek druhu a jeho záchraného programu – s prioritou střední (2) a 3.5.5 Další možnosti osvěty pro širokou veřejnost (zahrnující tematické vedené exkurze na lokality) – s prioritou nejnižší (3).

**3. Aktuálnost a potřebnost realizace navržených opatření (max. 15 bodů, viz kritérium 3)**

Účelem této části popisu projektu je stručný souhrn všech typů opatření a zdůvodnění proč jsou tato pro záchranu druhu (resp. pro úspěšnou realizaci ZPZCHD/PPZCHD) v tuto chvíli aktuální a potřebná. Žadatel by měl popsat význam navržených aktivit s ohledem na dosavadní průběh daného ZPZCHD/PPZCHD a jeho aktuální stav.

*Gentianella praecox* (A. et J. Kerner) E. Mayer subsp. *bohemica* (Skalický) Holub je endemitem Českého masivu a subendemitem České republiky. Jeho rozšíření zahrnuje Českou republiku, německou část Šumavy, severní část Rakouska a jižní část Polska. Jedná se o striktně dvouletý druh, jehož populace v poslední době zažily velmi silný pokles (BRABEC 2005c, 2009, ENGLEDER 2006, 2010, GERŽA & ČEPA 2007, GOŁAB 2004, RÖSLER 2005, ZIPP 2009).

V rámci předchozího projektu „Příprava záchranného programu pro hořeček český (*Gentianella praecox* subsp. *bohemica*)“ číslo 003/2 realizovaného za finanční podpory grantem z Islandu, Lichtenštejnska a Norska v rámci Finančního mechanismu EHP a Norského finančního mechanismu jsme detailně prostudovali populační dynamiku hořečku českého, zhodnotili vliv alternativních způsobů obhospodařování na přežívání různě velkých populací a zhodnotili význam semenné banky pro dynamiku tohoto druhu (Bucharová et al. 2012). Též jsme se věnovali předpokládané reakci druhu na očekávané klimatické změny a možnostem obnovy populací druhu ze semenné banky (Bucharová et al. 2012). Zatímco výsledky tohoto projektu přinesli řadu užitečných poznatků a byly pak využity při přípravě záchranného programu pro tento druh, pro jeho řádnou ochranu existuje stále řada neznámých.

Vzhledem k tomu, že je stále mnoho neznámých v oblasti biologie a ekologie druhu, je doposud jako jedna z hlavních příčin ohrožení druhu považováno nesprávné nebo nedostatečné obhospodařování jeho lokalit a dále také omezené možnosti druhu obsazovat za stávající situace další příhodná stanoviště. Proto také většina opatření v rámci Záchranného programu se zaměřuje právě na management lokalit. Avšak i při samotné péči o biotop a plánování vhodného managementu lokalit *G. praecox* subsp. *bohemica* (jak je uvedeno v kap. 3.1 ZP) je zapotřebí vždy stanovit priority a nejvhodnější typ managementu pro každou z lokalit zvlášť. Nutné je tedy na každé lokalitě, kromě jiného, zohlednit například to, že vzhledem ke značnému snížení počtu a velikosti populací taxonu a zároveň k zásadním změnám ve struktuře a obhospodařování krajiny došlo v uplynulých letech k výrazné fragmentaci a izolaci populací (kap. 3.1 ZP). Malé populace čelí negativním důsledkům rostoucího inbreedingu, dochází ke ztrátě genetické variability uvnitř populací a k nárůstu mezipopulační genetické rozrůzněnosti v důsledku genetického driftu i sníženého genového toku a k akumulaci škodlivých mutací (Jacquemyn et al. 2002, Leimu et al. 2006). Z dlouhodobého hlediska se tak snižuje evoluční potenciál těchto druhů a tedy schopnost adaptovat se na měnící se podmínky prostředí, z krátkodobého hlediska pak v malých populacích klesá fitness jedinců, a to konkrétně jejich přežívání a reprodukce (Lienert 2004). Snížení fitness může vést k dalšímu poklesu populační velikosti a tak vyššímu riziku extinkce celé populace (i v důsledku náhodných procesů) (Fischer et Matthies 1998). Kromě genetických mechanismů se zde však uplatňují také mechanismy ekologické, jako je např. nedostatek opylovačů, což opět snižuje fitness jedinců v malých populacích (Groom 2001, Leimu et al. 2006). Větší populace se stávají více atraktivní pro opylovače, kteří vydrží delší dobu v jedné velké populaci a tak zajistí lepší reprodukční úspěch rostlin tím, že přenesou za poměrně krátkou dobu velké množství kompatibilního a přitom cizího pylu na bliznu. Rostliny zde vyprodukují více semen a plodů, což zajišťuje dlouhodobě stabilní velikost populace (Aguilar et al. 2006, Dauber et al. 2010). Naopak izolované populace jsou méně nápadné a často příliš vzdálené od původní velké populace, díky

čemuž se stávají snadno přehlédnutelné a jejich reprodukce je limitována dostupností opylovačů i vhodného pylu (Groom 2001). Výsledkem je, že v malých a izolovaných populacích se vyprodukuje malé množství semen i plodů a tak je zde snížen reprodukční úspěch. Pro *Gentianella praecox subsp. bohemica* však dosud nebyli opylovači zkoumáni a proto nelze stanovit do jaké míry může jejich nedostatek ovlivňovat životaschopnost jejich populací (kap. 1.3.2 a 1.4 ZP). Kromě toho je také třeba mít na paměti, že byla u druhu prokázána endotrofní mykorrhiza, která taktéž může značně ovlivnit usazování a přežívání druhu na lokalitách, avšak její význam ani specifita nebyly taktéž dosud podrobněji zkoumány na žádném taxonu rodu *Gentianella* (kap. 1.4 a 3.1 ZP). Z těchto bodů vyplývá, že ani relativně ideální management nemusí vést k stabilitě populace (kap. 3.1 ZP) a proto je nutné tyto dílčí aspekty biologie a ekologie druhu podrobně prozkoumat (kap. 3.4 ZP).

Cílem předkládaného projektu je se podrobně zabývat jedním z opatření v oblasti 3.4 Výzkum, které by měly přispět ke komplexnímu pohledu na životaschopnost populací sledovaného taxonu *Gentianella praecox subsp. bohemica*:

### **Studium genetické variability populací *Gentianella praecox subsp. bohemica* a jejich genetické příbuznosti k dalším taxonům rodu.**

Hlavním faktorem omezujícím interpretaci předchozích výsledků je neznalost genetické diversity populací druhu *Gentianella praecox subsp. bohemica*. Dostatečná genetická diversita je přitom klíčovým faktorem pro dlouhodobé přžití populací a jejich schopnost se přizpůsobit měnícím se podmínkám prostředí. Veškeré dosavadní předpovědi vlivu velikosti populace na přežívání populací modelového druhu jsou ale založeny na předpokladu, že se jednotlivé populace neliší ve své genetické diversitě a/nebo, že neexistují rozdíly ve fitness jedinců z malých a velkých populací. To je zcela jistě předpoklad chybný, a může znamenat, že malé populace druhu jsou více ohrožené, než se dosud předpokládá. Také výsledky předpokládající možnost obnovy populace ze semenné banky jsou založené na dosud neověřeném předpokladu o dostatečné genetické diversitě v semenné bance v malých populacích. Realnost tohoto předpokladu je též nutno otestovat. Cílem předkládaného projektu je tedy prostudovat genetickou diversitu populací druhu *Gentianella praecox subsp. bohemica*, zjistit význam genetické diversity pro vitalitu těchto populací a identifikovat nejcenější populace zasluhující ochranu. U populací s extrémně nízkou genetickou diversitou pak zhodnotit možnosti jejich posílení a identifikovat vhodné zdrojové populace pro přenos. Navíc také bude posouzena genetická příbuznost *Gentianella praecox subsp. bohemica* s dalšími ohroženými taxony rodu – konkrétně s *G. amarella subsp. amarella* a *G. obtusifolia subsp. sturmiana*, kterým je jinak věnován jiný samostatný projekt. Všechna naše zjištění tak mohou být cenným podkladem a významně přispět k realizaci opatření týkajících se kap. 3.2 Péče o druh a to zejm. 3.2.2 Podpora stávajících populací, 3.2.3 Repatriace druhu, 3.2.4 Zakládání nových lokalit, 3.2.5 Uchování rostlin v genobance.

Konkrétními cíli projektu pak jsou:

- Zhodnotit genetickou diversitu stávajících populací hořečku českého v České republice.
- Prostudovat genetické vztahy populací v České republice s populacemi ve zbytku areálu.
- Prostudovat vliv velikosti populace na její genetickou variabilitu
- Prostudovat vztah mezi produkcí vyvinutých semen, velikostí populace a genetickou diversitou a zjistit tak význam genetické diversity pro fitness rostliny.

- U vybraných populací prostudovat genetickou diversitu rostlin v semenné bance a zhodnotit tak možnosti obnovy populace ze semenné banky.
- Posoudit genetickou příbuznost *Gentianella praecox* subsp. *bohemica* s dalšími ohroženými taxony rodu – konkrétně s *G. amarella* subsp. *amarella* a *G. obtusifolia* subsp. *sturmiana*.

#### 4. Metodika navržených opatření (max. 30 bodů, viz kritérium 4)

Tato část popisu projektu slouží jako prostor pro shrnutí všech aktivit projektu formou tabulky (viz níže) a jejich konkretizaci v textové části s uvedením použité metodiky. Metodika by se měla zaměřit na technické i metodické detaily navržených aktivit (jakou technikou se bude sekat, jak velké rostliny se vysadí, jak pro ně musí být připravena plocha atd.). Zde by měla být vylišena opatření, jejichž metodiku přesně definuje ZPZCHD/PPZCHD (zejména opatření v rámci péče o druh, péče o biotop a opatření spočívající v monitoringu) i opatření, jejichž metodiku bude nutné navrhnout (především v rámci výzkumu, osvěty a ostatních opatření) a jejíž vhodnost bude posouzena v rámci hodnocení projektu (viz. Kritéria posouzení).

### 3.4 Výzkum

Text ZP:

Motivace

V rámci nedávno publikovaných a souběžně se Záchranným programem dokončovaných studií je *Gentianella praecox* subsp. *bohemica* relativně dobře prozkoumaným taxonem co se týče životního cyklu, stavu lokalit a možností ovlivnění populací způsobem obhospodařování lokalit. Nedostatečně prozkoumány zůstávají některé dílčí aspekty biologie a ekologie druhu (např. mykorrhizní symbiózy, reprodukce a reprodukční ekologie druhu, genetická variabilita).

Náplň opatření

Ke komplexnímu pohledu na životaschopnost populací sledovaného taxonu je vhodné doplnit následující studie:

Projekt:

#### 1) Studium genetické variability populací *Gentianella praecox* subsp. *bohemica* a jejich genetické příbuznosti k dalším taxonům rodu.

Předchozí studie věnující se genetice modelového druhu (Königer et al. 2012) ukázala velkou míru izolovanosti jednotlivých populací a silnou korelaci mezi velikostí populace a její genetickou diversitou. Z pohledu závěrů pro praktickou ochranu tohoto druhu je však tato studie nedostatečná, neboť studovala pouze 10 populací a z toho pouze 4 v České republice. Studie tak přináší obecné poznatky o genetické diferenciaci populací a vztahu velikosti a genetické diversity. Stále nám však chybí znalosti o rozložení genetické diversity v rámci českých populací a znalosti jejich genetické příbuznosti, vztahu mezi genetickou diversitou a fitness a posouzení genetické diversity v semenné bance. Jako molekulární marker využila studie Königer et al. (2012) analýzu AFLP. Ačkoliv je tato metoda běžně užívaná, je její velkým problémem nemožnost dodatečného rozšíření datového souboru (potvrzuje i spoluautor studie prof. Greimler). Proto bohužel není možné přímo navázat na předchozí studii. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli zvolit alternativní genetický marker, mikrosatelity. Mikrosatelitové markery vykazují podobně vysokou variabilitu jako AFLP. Jejich velkou výhodou je jejich kodominantní povaha (umožňující snadno detekovat heterozygoty) a také

jejich lepší replikovatelnost. Ta zaručuje možnost postupného rozšiřování získaného datového souboru. Nevýhodou mikrosatelitových markerů je nutnost jejich specifického navržení pro každý další druh. S touto prací však máme předchozí zkušenosti a v současné době již máme seznam 373 možných mikrosatelitových markerů navržených pro tento druh. V rámci projektu plánujeme otestovat variabilitu jednotlivých markerů a vybrat tak optimální markery pro použití v naší studii. Následně pak tyto markery aplikujeme na studované populace, jak je popsáno níže.

V rámci předkládaného projektu konkrétně plánujeme tyto práce:

### 1.1 Terénní sběr dat

V České republice je známo 73 lokalit, na kterých se hořeček český vyskytl alespoň jedenkrát v letech 2000 až 2013. Pro všechny lokality jsou k dispozici data o velikosti populací měřené jako počet kvetoucích rostlin od roku 2000 (popř. od doby jejich nálezů po roce 2000) do současnosti. Na cca 30 lokalitách jsou navíc k dispozici pro vybrané exempláře některé jejich populačně-biologické údaje (viz dále). Ve vybraných 25-35 populacích (zejména na prioritních lokalitách a lokalitách, na nichž byly zaznamenávány populačně-biologické údaje rostlin hořečku českého), pocházejících ze všech 5 hlavních oblastí výskytu druhu a lišících se svou velikostí (počtem kvetoucích jedinců), bude sebráno vždy 30-40 vzorků listového materiálu (popř. méně, nebude-li to vzhledem k počtu kvetoucích exemplářů možné). Jednotlivé lokality se ve svých velikostech velmi liší, proto jako minimální počet jedinců na lokalitě, kde budou vzorky ještě odebrány, jsme stanovili na 10. Taktéž budou na 10 lokalitách výskytu odebrány 1-3 listové vzorky *Gentianella amarella* subsp. *amarella* a *Gentianella obtusifolia* subsp. *sturmiana* pro možnost porovnání genetické příbuznosti s námi studovaným druhem, *G. praecox* subsp. *bohemica*. Listové vzorky budou uskladněny do silikagelu a dopraveny do Laboratoře analýzy DNA Botanického ústavu k dalšímu zpracování. Vzorky budou odebrány již v průběhu září 2014, aby bylo možné začít realizovat genetické analýzy ihned po zahájení řešení projektu. K dispozici budou v rámci Monitoringu (3.3.1 Extenzivní monitoring populací, který však bude realizován v rámci jiného samostatného projektu) počty kvetoucích jedinců na všech zkoumaných lokalitách z roku 2014 i 2015, které spolu s údaji z předchozích let budou použity při vyhodnocení výsledků. Současně je také domluvena spolupráce s prof. Greimlerem (spoluauditor dříve provedené studie Königer et al. (2012) – viz výše), který nám poskytne další vzorky hořečku českého z 5 populací (asi 20 vzorků na populaci) ze sousedního Německa a Rakouska, které budou taktéž dopraveny do Laboratoře analýzy DNA Botanického ústavu k dalšímu zpracování. O příslušná povolení pro odběr listového materiálu již bylo požádáno na příslušné Správy CHKO.

### 1.2 Data o fitness jedinců

Na cca 30 lokalitách jsou k dispozici pro vybrané exempláře (při populační hustotě do 30 exemplářů u všech; při vyšší populační hustotě pak u 30 standardizovaně vybraných jedinců) následující populačně-biologické údaje:

- 1) zda je rostlina posečena, ukousnuta či jinak poškozena,
- 2) celková výška rostliny a počet internodií (u posečených či ukousnutých rostlin se zaznamenává celková výška a výška posečení, ukousnutí či poškození,
- 3) celkový počet květů (respektive plodů) a odhadem procento květů (plodů), která pravděpodobně nepřinesou semena,
- 4) počet vyvinutých a nevyvinutých semen v jedné až 7 tobolkách na rostlinu (dle velikosti rostliny), standardně je odebírán vždy jeden terminální semeník s každého lichého "patra" rostliny směrem shora dolů.

Populačně biologické údaje jsou k dispozici z více než 10 sezón, často kontinuálně od roku 2000 až do roku 2013, a byly sebrány J. Brabcem. Část těchto dat v současné době čeká na přepsání a

kompletaci, část stále čeká na vyhodnocení. Na všech takto zkoumaných lokalitách budou též získány populačně biologické údaje uvedené v bodech 1 až 4 také za rok 2014 a 2015. Body 1 až 3 jsou součástí Monitoringu (3.3.4 Monitoring stavu rostlin, tzv. intenzivní monitoring), který bude realizován v rámci jiného samostatného projektu. Bod 4 bude realizován v rámci námi předkládaného projektu. Stejně jako v předchozích letech, bude u 30 standardizovaně vybraných jedinců na jednotlivých lokalitách (nebo všech jedinců na lokalitě, pokud jich bude méně) odebráno několik tobolek (1-7) (dle popisu výše) a v nich bude následně stanoven počet vyvinutých a nevyvinutých semen. Tato získaná data bychom následně rádi zkompletovali a použili k vyhodnocení jak dat samotných, tak zejména ve vztahu s dalšími zjištěnými údaji o genetické diverzitě a velikosti populací. Příslušná povolení pro sběr populačně-biologických dat jsou součástí již probíhajícího povolení J. Brabce, který bude sběry realizovat.

### 1.3 Zjišťování genetické diversity v semenné bance

Je doloženo, že semena hořčku českého se vyznačují značnou dlouhověkostí a mohou vydržet v semenné bance alespoň 9 let (kap. 1.3.3 ZP, Bucharová et al. 2012). Neví se však, jaký potenciál v sobě semenná banka ukrývá a zda je schopna zajistit dostatečnou genetickou variabilitu pro obnovu různě velkých a různě, v současné době, prosperujících populací. Z tohoto důvodu budou odebrány půdní vzorky ve 3 v současné době velkých a prosperujících populacích a také ve 3 historicky velkých populacích, které však v současné době doznaly značného poklesu. Cílem je totiž zjistit, zda i tyto malé populace mají dostatečný potenciál v semenné bance či již genetickou diversitu ztratily. Bude se předběžně jednat o tyto lokality: Ve dvou až třech oblastech, vždy dvojice – Šumava (Onšovice – Horosedly; Chvalšiny – Polná), Vysočina (Lavičky – Číchov).

Na každé takto vybrané lokalitě bude časně zjara (v roce 2015) odebráno pomocí Kopeckého válečku 200 vzorků obsahující půdní vrstvu z 0-5 cm hloubky a 100 vzorků obsahující půdní vrstvu z 5-15 cm hloubky. Celkem tedy bude odebráno 6 x 300, tj. 1800 vzorků (tj. 3+3 lokality x 200+100 vzorků na každé lokalitě), což odpovídá 0,24 m<sup>3</sup> půdy. Jelikož celkově očekáváme ne příliš velkou klíčivost semen, bude odebráno dvojnásobné množství vzorků ze svrchní vrstvy půdy (0-5 cm), kde lze očekávat větší úspěšnost vyklíčení. Vzorky z hloubky 5-15 cm budou mít spíše informační charakter, jelikož klíčivost s hloubkou uložení (což pravděpodobně koreluje s věkem semen) klesá, a budou sloužit ke zjištění, zda jsou zde uložena ještě vůbec nějaká živá semena (v kladném případě však budou i tyto vzorky dále použity). Tyto půdní vzorky budou posléze rozloženy do 1 cm vrstvy půdy na plata (tzv. minipařeniště) a uloženy ve skleníku v Botanickém ústavu, kde budou osvětlovány a pravidelně bude odečítáno jejich klíčení. Odběr vzorků bude realizován v průběhu března až dubna 2015, aby se tak zajistila teplotní stratifikace a podpořilo tím klíčení semen. Pro další podporu klíčení semen bude v průběhu pokusu také aplikována kyselina Gibberelová na půdu. Předpokládáme, že přibližně ve 180 vzorcích nějaká semena vyklíčí. Z těchto klíčících rostlinek posléze vypěstujeme mladé rostlinky, z nichž budou odebrány listové vzorky na genetické analýzy. Tím, že budeme klíčit a pěstovat rostliny, bude naplněno také opatření 3.2.1 Kultivace ex situ dle ZP. Pro odběr půdních vzorků bude potřeba zajistit souhlas vlastníků pozemků, což v současné době začínáme řešit.

### 1.4 Genetické analýzy

#### *Identifikace sekvencí repetitivních oblastí*

K analýze genetické příbuznosti jedinců *Gentianella praecox subsp. bohemica* za pomoci mikrosatelitů bylo potřeba *de novo* identifikovat druhově specifické mikrosatelitní sekvence. Ve spolupráci s komerční firmou Genoscreen bylo pomocí „next generation sekvenování“ (454 sekvenování) identifikováno 373 mikrosatelitních lokusů bohatých na varianty v sekvenčních motivech. Ke každému z lokusů bylo navrženo průměrně 9 variant primerů k designu následných,

co nejkompexnějších, PCR reakcí a fragmentačních analýz. Tato část je tedy již hotová a navržené primery jsou k dispozici pro další práci, která proběhne již v rámci navrhovaného projektu.

#### *Optimalizace a provedení fragmentačních analýz vybraných jedinců*

V předcházející části jsme tedy získali poměrně rozsáhlý seznam primerů ohraničujících zjištěné repetitivní sekvence. Proces optimalizace v prvním kroku zahrnuje identifikaci podmínek PCR pro konzistentní amplifikaci u každého z páru primerů. V tomto případě a stejně i pro celou tuto experimentální část budeme používat komerčně dodávaný Multiplex PCR Kit (Qiagen), který zaručuje uniformnost, opakovatelnost reakcí a byl úspěšně použit už v předcházejících experimentech (Münzbergová et al. 2013). K PCR amplifikaci budou použity Mastercyclerly pro S (Eppendorf). V případě, že nedojde k amplifikaci, příslušný pár primerů bude vyřazen z dalších analýz. V tomto případě a stejně i pro celou tuto část projektu bude vytváření PCR produktu detekované pomocí 1,5 % agarozového gelu za použití GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

Druhou částí optimalizace bude zjištění variability jednotlivých lokusů a určení vhodných kombinací primerů amplifikujících tyto lokusy pro multiplex PCR. K provedení fragmentační analýzy je potřeba fluorescenčně označit každý forward primer (komerční firmou), amplifikovat příslušné úseky a elektroforeticky (pomocí kapilárního sekvenátoru) rozdělit vzniklé PCR produkty. Fluorescenční značení je poměrně nákladný krok a označit všechny potencionálně vhodné primery je neekonomické. Proto k 5' konci každého forward primeru bude přidán M13 úsek, díky kterému dojde k fluorescenčnímu značení (např. FAM) během amplifikace (Schuelke 2000). Každá PCR směs bude obsahovat kromě specifických primerů i M13 fluorescenčně značený primer. Amplifikované fragmenty budou analyzovány na sekvenátoru ABI3130 (Life Technologies). Variabilita bude testována na 10-20 jedincích ze širokého spektra populací. Přítomnost alel a jejich velikost bude vyhodnocena programem Gene Mapper (Life Technologies). Tímto krokem vyselektujeme páry primerů amplifikující variabilní lokusy. Následně Sangerovým sekvenováním poskytnutým komerční firmou (SEQme) potvrdíme, že amplifikované fragmenty obsahují repetitivní sekvence a nadesignujeme multiplexové PCR, jejichž produkty se nebudou překrývat v rozsahu velikostí. Očekáváme minimálně 20 mikrosatelitních markerů, vhodných k charakterizaci polymorfních lokusů u *Gentianella praecox subsp. bohemica*.

Vyhodnocení výsledků fragmentační analýzy proběhne automaticky pomocí funkce Panel, který je implementovaný v programu Gene Mapper. Elektroforetogramy s nekonzistentními profily budou vyhodnoceny manuálně. Takto získáme charakteristiky polymorfních lokusů pro každého zkoumaného jedince.

### **1.5 Vyhodnocení získaných genetických dat**

K testu nulových alel bude použit program MICRO-CHECKER 2.2.3. Vzhledem k tomu, že mikrosatelity jsou kodominantní marker, bude v první fázi možné vyhodnotit heterozygotnost každého jedince. Na základě této informace spočítáme pozorovanou a očekávanou heterozygositu jedince a jejich srovnáním též míru inbreedingu. Kromě toho spočteme též celkovou genetickou diversitu populace.

Další důležitou informací, kterou získáme z genetických dat, bude množství unikátních alel v jednotlivých populacích. Tím získáme představu o unikátnosti některých populací. Další cenou informací bude identifikace minimálního množství populací k ochraně maximální genetické diversity druhu (Neel and Cummings 2003). Tím identifikujeme soubor populací, které si zaslouží prioritní ochranu a které by měli zaručit, že veškerá genetická diversita druhu zůstane zachována i při zničení všech ostatních populací.

Informace o stupni heterozygoty, míře inbreedingu a genetické diversitě populací též srovnáme s velikostí těchto populací – jak současnou, tak historickou a vztáhneme ji též k proporci

vyvinutých semen v jednotlivých populacích. Tím bude možné zhodnotit, zda malé populace trpí významnou ztrátou genetické diversity i posoudit, zda ztráta genetické diversity vede ke ztrátě fitness druhu. Vzhledem k tomu, že budeme mít k dispozici také data o genetické diversitě několika populací v dalších středoevropských zemích s výskytem druhu, bude možné provést i mezinárodní srovnání.

Data o genetické diversitě v semenné bance budou srovnána s daty o genetické diversitě rostlin v nadzemí. Toto srovnání nám umožní posoudit význam semenné banky jako rezervoár genetické diversity druhu.

Taktéž bude srovnána genetická příbuznost námi studovaného druhu, *Gentianella praecox* subsp. *bohemica* s dalšími ohroženými taxony tohoto rodu - *G. amarella* subsp. *amarella* a *G. obtusifolia* subsp. *sturmiana*. Tato analýza by měla přinést první pohled na příbuzenské vztahy mezi jednotlivými taxony. Vzhledem k malému počtu vzorků dalších taxonů bude mít tato analýza pouze informační charakter a může sloužit jako podklad pro další rozsáhlejší analýzy v budoucnu. Jejím významem bude též otestování funkce užitých markerů na dané druhy a provedení případných nutných optimalizací, které zaručí jejich bezproblémové fungování.

Dále bychom chtěli zahrnout data o vlivu genetické diversity a velikosti populace na produkci nevyvinutých semen do našeho předchozího modelu populační dynamiky druhu (Bucharová et al. 2012) a predikovat tak očekávaný vývoj populací druhu za předpokladu různé velikosti a genetické diversity. Za tímto účelem nahradíme vybrané části životního cyklu (produkce semen, přežívání semenáčků) v existujícím maticovém modelu popisujícím dynamiku populací rovnicemi popisujícími vztah mezi danou částí životního cyklu a genetickou diversitou populace či její velikostí. Díky tomuto budeme schopni predikovat růst a pravděpodobné přežití populací při různé míře genetické diversity či různé aktuální velikosti.

Námi zjištěná data o genetické diversitě taktéž využijeme k identifikaci populací s největší genetickou diversitou zasluhující prioritní ochranu a k vytipování souboru populací, jejichž ochrana zaručí zachování maxima genetické diversity druhu, čímž přispějeme k stanovení zdrojových populací pro 3.2.2 Podporu stávajících populací, 3.2.3 Repatriaci druhu, 3.2.4 Zakládání nových lokalit, 3.2.5 Uchování rostlin v genobance. Současně pak na základě dat o genetické diversitě identifikujeme populace s velmi sníženou genetickou diversitou a zhodnotíme a navrhujeme možnost jejich posílení z jiných populací.

### 3.5 Výchova a osvěta

#### 3.5.3 Odborná publikace shrnující výsledky výzkumu druhu

##### Text ZP:

##### Motivace

Zpřístupnit širší odborné a ochranářské veřejnosti výsledky experimentálního výzkumu vlivu obhospodařování na jednotlivé fáze životního cyklu dvouletých taxonů rodu *Gentianella* (viz BUCHAROVÁ, BRABEC & ŠTEFÁNEK – in prep), vlivu velikosti populací na jejich životaschopnost (viz BRABEC, BUCHAROVÁ & ŠTEFÁNEK – in prep.), dlouholetého monitoringu taxonu a průzkumu abiotických podmínek a vegetačního krytu recentních lokalit (BRABEC, KŘENOVÁ & RÖSLER – in prep.).

##### Náplň opatření

Publikace výstupů výzkumu taxonu *G. praecox* subsp. *bohemica* v ČR a v přilehlých zemích v češtině. Zejména výstupy, které objasňují životní cyklus taxonu, principy z nichž vychází záchranný program a další studie využitelné pro management lokalit. Ideálně jako vlastní sborník nebo rozsáhlejší odborný text ve vhodném periodiku.

#### Projekt:

Jelikož byla dosud zpracována a publikována pouze jedna studie (BUCHAROVÁ, BRABEC & ŠTEFÁNEK – *in prep*, ve skutečné podobě jako Bucharová, Brabec et Münzbergová 2012) ze všech plánovaných v Záchranném programu pro hořeček mnohotvarý český, je naším cílem připravit (a následně publikovat) další odborné články věnující se problematice studované v rámci tohoto projektu. Konkrétně plánujeme připravit rukopis věnující se vlivu genetické variability a velikosti populací *Gentianella praecox* subsp. *bohemica* na jejich životaschopnost, kde budou využity námi zjištěné údaje spolu s údaji poskytnutými J. Brabcem o fitness jedinců druhu. Předběžně je plánováno připravit 1 rukopis článku do zahraničního odborného časopisu věnující se studované problematice a dále také 1 shrnující článek do popularizačního českého periodika, jako je Živa, Ochrana přírody apod., který by měl vyzdvihnout nově zjištěné poznatky v oblasti biologie a ekologie druhu ve vztahu k cílené ochraně druhu a významně tak přispět k realizaci opatření týkajících se kap. 3.2 Péče o druh a to zejm. 3.2.2 Podpora stávajících populací, 3.2.3 Repatriace druhu, 3.2.4 Zakládání nových lokalit, 3.2.5 Uchování rostlin v genobance.

### 3.5.4 Spuštění webových stránek druhu a jeho záchranného programu

#### Text ZP:

##### Motivace

*Vytvořit samostatnou webovou prezentaci, kde bude možné nalézt kompletní informace jak o vlastním taxonu *G. praecox* subsp. *bohemica*, tak o jeho ochraně a aktuálním stavu lokalit v ČR.*

##### Náplň opatření

*Vytvořit a udržovat webové stránky na webu záchranných programů AOPK ČR, kde bude možno nalézt:*

- *odborné informace o *G. praecox* subsp. *bohemica* (citace odborných studií, tam kde to půjde pdf článků nebo alespoň abstrakty);*
- *vlastní záchranný program *G. praecox* subsp. *bohemica* včetně příloh;*
- *ochranářské publikace a studie (viz např. kap. 3.5.2);*
- *aktuální údaje o stavu lokalit *G. praecox* subsp. *bohemica* v ČR (např. výsledky monitoringu);*
- *představení taxonu jako zástupce vzácných „pastevních druhů“ široké veřejnosti (viz též kap. 3.5.5 Další možnosti osvěty pro širokou veřejnost)*

#### Projekt:

V rámci požadavků na povinné nástroje publicity předloženého projektu budou spuštěny a pravidelně aktualizovány webové stránky v českém a anglickém jazyce, které budou poskytovat aktuální informace o obsahu, postupu a výsledcích projektu, jakož i veškeré relevantní informace o druhu a jeho Záchranném programu, spolu s informacemi o bilaterální spolupráci a kontaktech. Současně zde budou uvedeny citace odborných studií o druhu a jejich abstrakty a také informace o dalších možnostech osvěty pro širokou veřejnost.

### 3.5.5 Další možnosti osvěty pro širokou veřejnost

Text ZP:

*Motivace*

*Taxon G. praecox subsp. bohemica je vhodným modelovým druhem pro ekologicko-environmentální vzdělávání široké veřejnosti. Taxon je vzhledově atraktivní, endemitem českého masivu (tj. jeho ochrana je primárně záležitostí České republiky), celoevropsky chráněným druhem a představitelem celé skupiny tzv. pastevních druhů, z nichž mnohé dnes patří mezi ubývající, vzácné či vymírající apod.*

*Náplň opatření*

*Podporovat snahu regionálních institucí (např. muzeí, správ CHKO apod.) a neziskových organizací o cílenou propagaci biologie a ochrany *Gentianella praecox subsp. bohemica* a ekologicky podobných druhů. Vhodné jsou zejména tematické vedené exkurze na jednotlivé lokality taxonu s ukázkou obhospodařování a vlivu hospodaření na vegetaci a vlastní hořeček mnohotvarý český. Vítané jsou též odborněji laděné přednášky, případně tematické putovní výstavy (např. výstava o pastevních druzích, pro niž by byl *Gentianella praecox subsp. bohemica* jakýmsi vlajkovým druhem). Ideální je zajistit putování výstavy po muzeích a dalších organizacích v regionu výskytu taxonu.*

Projekt:

V rámci předkládaného projektu bychom také rádi seznámili širokou veřejnost s kriticky ohroženým hořečkem mnohotvarým českým a jeho přirozeným prostředím a to prostřednictvím tematických vedených exkurzí. Konkrétně plánujeme realizovat 2 exkurze v průběhu podzimu 2015, kdy hořeček kvete. Jednu do jižních Čech na lokalitu Chvalšiny a druhou na Šumavu na lokality v oblasti Onšovic nebo případně Vlkoníc. Všechny tyto lokality hostí v současné době stále ještě dostatečně početné a prosperující populace hořečku mnohotvarého českého. Navíc jsou tyto lokality rozděleny do několika částí, na nichž probíhá odlišný management a je tedy možné zde demonstrovat, jak působí odlišný způsob obhospodařování i vliv samotného hospodaření na vegetaci a vlastní hořeček mnohotvarý český. Účastníci exkurze si budou moci nejen zblízka prohlédnout volně rostoucí jedince, ale také sami zhodnotit a porovnat úspěšnost jejich růstu a reprodukce (kvetení) v rámci různých částí lokality (v případě účasti na obou exkurzích, mezi jednotlivými lokalitami v 2 oblastech). Exkurze budou probíhat pod vedením Jiřího Brabce, který účastníky exkurze seznámí nejen s biologií a ekologií druhu, ale také s výsledky probíhajícího výzkumu na hořečku mnohotvarém českém realizovaném v rámci námi předkládaného projektu.

#### **Citovaná literatura**

- Aguilar R., Ashworth L., Galetto L., Aizen M. A. (2006): Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters* **9**: 968–980.
- Bucharová A., Brabec J. et Münzbergová Z. (2012): Effect of land use and climate change on future fate of populations of an endemic species of central Europe. *Biological Conservation* **145**: 39–47.
- Dauber J., Biesmeijer J.C., Gabriel D., Kunin W.E., Lamborn E. et al. (2010): Effects of patch size and density on lower visitation and seed set of wild plants: a pan-European approach. *Journal of Ecology* **98**: 188–196.

- Fischer M., Matthies D. (1998): Effect of population size on performance in the rare plant *Gentianella germanica*. *Journal of Ecology* 86: 195–204.
- Grime JP, Mackey JML, Hillier SH, Read DJ (1987) Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. *Nature*, **328(6129)**, 420–422. doi:10.1038/328420a0
- Groom M. J. (2001): Consequences of subpopulation isolation for pollination, herbivory, and population growth in *Clarkia concinna concinna* (Onagraceae). *Biological Conservation*, **100**, 55–63.
- Groom, M. J. (1998) Allee effects limit population viability of an annual plant. *American Naturalist*, **151**, 487–496.
- Jacquemyn H., Brys R., Hermy M. (2002): Patch occupancy, population size and reproductive success of a forest herb (*Primula elatior*) in a fragmented landscape. *Oecologia*, **130**, 617–625.
- Königer J., Rebernig C. A., Brabec J., Kiel K. et Greimler J. (2012): Spatial and temporal determinants of genetic structure in *Gentianella bohemica*. *Ecology and Evolution*, **2**, 636–648.
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüssler A. 2009. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 183: 212–223.
- Leimu R., Mutikainen P., Koricheva J., Fischer M. (2006): How general are positive relationships between population size, fitness and genetic variation? *Journal of Ecology*, **94**, 942–952.
- Lienert J. (2004): Habitat fragmentation effects on fitness of plant populations – a review. *Journal for Nature Conservation*, **12**, 53–72.
- Münzbergová Z, Surinova M, Castro S. (2013): Absence of gene flow between diploids and hexaploids of *Aster amellus* at multiple spatial scales. *Heredity*, **110**, 123–130.
- Neel MC, Cummings MP (2003) Effectiveness of conservation targets in capturing genetic diversity. *Conservation Biology* 17:219–229. doi: 10.1046/j.1523-1739.2003.01352.x