

POPULAČNÍ BIOLOGIE OHROŽENÉHO DRUHU

GENTIANA PNEUMONANTHE L.

Jan Š. Lepš
školitel

Zdenka Křenová

Prohlašuji, že jsem předkládanou magisterskou diplomovou práci vypracovala samostatně
pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, 12. prosince 1996.

Zdenka Křenová
Zdenka Křenová

Obsah:

1. Úvod	<i>strana</i>	1
2. Studovaný druh		3
3. Metody		6
3.1. Inventarizace lokalit v regionu jihozápadních Čech		6
3.2. Genetická studie vybraných populací		7
3.2.1. Lokality		7
3.2.2. Genetická variabilita populací		10
3.2.2.1. Úvod		10
3.2.2.2. Sběr materiálu v terénu		11
3.2.2.3. Analýza izoenzymů		11
3.2.2.4. Interpretace izoenzymových patterns na gelech		12
3.3. Reprodukční aktivita v závislosti na typu opylení		12
3.3.1. Lokalita		12
3.3.2. Metodika pokusu		13
4. Výsledky		14
4.1. Výsledky inventarizace lokalit v regionu jihozápadních Čech		14
4.2. Výsledky analýz genetické variability populací		15
4.3. Výsledky pokusu s opylováním		16
5. Diskuse		18
6. Shrnutí		24

Poděkování

Literatura

Přílohy

1. Úvod

V posledních desetiletích přibývá zpráv dokumentujících výrazný úbytek mnoha druhů organismů z přirozených i polopřirozených ekosystémů. K tomuto úbytku druhů dochází v důsledku neustálého rozšiřování území, která jsou člověkem obdělávána, využívána pro těžbu surovin nebo zastavěna rozšiřujícími se sídlišti. Na člověkem po staletí ovlivněných územích dochází k utváření polopřirozených společenstev, která se v mnohých případech stala vysoce hodnotnými součástmi ekosystémů daných oblastí. Připomeňme třeba jen ve světě neopakovatelný fenomén evropských luk a pastvin, pomineme-li alpské louky, říční nivy, nepatrné ostrůvky rašelinišť a poslední nerozorané zbytky stepí, jsou jediným bezlesím středoevropské krajiny. Právě v oblastech s mozaikou přirozených a polopřirozených ekosystémů je možné zaznamenat nejvyšší biodiverzitu. Dokladem vysoké biodiverzity lučních společenstev jsou údaje o 63 druzích vyšších rostlin koexistujících v 1 metru čtverečním na květnatých loukách Estonska (Kull et al. 1991), v České republice bylo zaznamenáno 61-69 druhů vyšších rostlin ve čtvercích o rozloze 2,25 m čtverečních v lučních porostech Bílých Karpat (Klimeš et al. 1995).

Právě v polopřirozených společenstvech s potlačovaným postupem sukcese našly útočiště druhy konkurenčně slabší, jež profitují z takových typů managementu jako je pravidelné kosení, pastva, případně občasné mechanické narušení či narušení ohněm.

V minulosti, kdy takovéto druhy byly běžné, vyskytovaly se v areálech dvou možných typů. Jejich rozšíření mohlo být zcela kontinuální po celém území, a nebo se jednalo o mozaiku malých a častých míst výskytu. Oba typy rozšíření zajišťovaly normální průběh demografických procesů. Byl umožněn stabilní růst populací a migrace mezi populacemi zajišťovala rovnováhu mezi zanikajícími a vznikajícími populacemi (Barret & Kohn 1991). V druhé polovině 20. století můžeme pozorovat rapidní úbytek druhů adaptovaných na polopřirozená společenstva luk a pastvin, především v souvislosti se změnami ve způsobu hospodaření na daných stanovištích i jako následek celkového znečištění půdy, vody i vzduchu. K negativním důsledkům lidské činnosti patří také pokles hladiny podzemní vody, což se projevuje především degradací vlhkomilných společenstev, dále pak v posledních letech často sledovaná fragmentace a izolace biotopů ohrožených druhů (Young et al. 1996). Dříve běžné a nyní ohrožené druhy jsou některými autory nazývány „nové vzácné“ a jsou považovány za více náchylné k veškerým negativním efektům ovlivňujícím malé populace než vždy vzácné druhy organismů (Hueneke 1991). Jedním z druhů české flóry, kterého se

týkají všechny výše uvedené skutečnosti je hořec hořepník (*Gentiana pneumonanthe* L.). Druh provázející mě po celou dobu mého studia na Biologické fakultě JU, druh který mi posloužil jako modelový organismus při pokusech vypracovávaných pro bakalářskou práci a nyní i pro magisterskou diplomovou práci.

Důvody mizení tohoto druhu z české přírody jsou především následující:

1. Mechanické ničení původních biotopů:

Značná část českých lokalit zanikla v důsledku provedených melioračních prací a následného rozorání především v 50. a 70. letech (ústní sdělení Hrouda, Sofron aj.).

2. Opouštění od původního typu hospodaření:

Životaschopnost populace *Gentiana pneumonanthe* je podmíněna vývojem dostatečného množství semenáčků a juvenilních rostlin. Vzhledem k tomu, že byla zjištěna neúspěšnost klíčení a přežívání juvenilních rostlin v hustém travním porostu, vede ukončení kosení či pasení a následný sukcesní vývoj na lokalitách k ohrožení existence daných populací druhu *Gentiana pneumonanthe* L. (Křenová & Lepš 1996).

3. Izolace a zmenšování populací vedoucí ke genetické erozi:

Vlivem genetického driftu a inbreedingu může dojít ke ztrátě genetické variability uvnitř populace, která je fragmentem původní populace. Stejně tak zamezení toku genů (pyl, semena) mezi izolovanými populacemi může omezit adaptibilitu populací na měnící se podmínky prostředí (Barret & Kohn 1991).

Cílem této práce bylo prověřit existence lokalit a zhodnotit stav populací druhu *Gentiana pneumonanthe* v regionu jihozápadních Čech. Na základě získaných dat bylo hlavním cílem najít souvislosti mezi současným způsobem hospodaření, druhovým složením rostlinného společenstva a stavem populací *Gentiana pneumonanthe*. Z finančních důvodů byly pouze na čtyřech vybraných populacích v oblasti Českých Budějovic a Blatné provedeny analýzy genetické variability metodou izoenzymové analýzy a byl také proveden manipulativní pokus s cílem zjistit limitaci reprodukční schopnosti jedinců v závislosti na typu opylení.

2. Studovaný druh

Hořec hořepník (*Gentiana pneumonanthe* L.), čeleď *Gentianaceae*, je vytrvalá bylina přezimující ve formě růžice kořenů a zkrácených prýtů. Zkrácené prýty se vyskytují u rostlin starších jednoho roku (Oostermeijer et al. 1992, 1994 a,b). Někteří autoři vyčleňují hořepník ze široce pojatého druhu *Gentiana*. Pro úplnost uvádím používaná synonyma (Dostál 1989):

Gentiana pneumonanthe L.

Pneumonanthe vulgaris F. W. Schmidt

Tretorhiza pneumonanthe (L.) Á. et D. Love

Dasystephana pneumonanthe (L.) Soják

Rostlina má jednu či více kvetoucích lodyh, dorůstajících výšky 10 - 60 (70) cm.

Na jednotlivých lodyhách rozkvétají koncem června první protoandrické květy, vrchol kvetení nastává v našich zeměpisných oblastech v srpnu až první dekádě září a poslední květy odkvétají v říjnu. Opylování květů zajišťují především čmeláci, jednotlivé druhy nebyly v České republice doposud určeny, z Nizozemí je udáván druh *Bombus pascuorum* (Petanidou et al. 1995). Dalšími opylovači jsou v menší míře můry *Autographa gamma* (L.), byly pozorovány i včely.

Na přelomu září a října začínají dozrávat v tobolkách semena. Semena jsou velmi malá a jejich počet dosahuje 300 - 700 v jedné tobolce (Salisbury 1942). Semena jsou roznášena větrem na nepříliš velké vzdálenosti.

Klíčení semen a přežívání semenáčků probíhá úspěšně pouze na lokalitách s narušeným drnovým pokryvem (Křenová & Lepš 1996). Předpokládá se existence endomykorhizních vztahů (VAM) přítomných i u dalších zástupců čeledi *Gentianaceae* (McGee 1985). Klíčení na sterilní půdě v laboratorních podmínkách je možné (Křenová, nepublikováno).

Životní cyklus jedince druhu *Gentiana pneumonanthe* je rozfázován do následujících stadií: semenáčky, juvenilní rostliny, dospělé nekvetoucí rostliny, dospělé kvetoucí rostliny, dormantní rostliny (Oostermeijer et al. 1994b).

Gentiana pneumonanthe je euroasijský druh, severní hranice rozšíření dosahuje šedesáté rovnoběžky, prochází jižní Skandinávií, přes Estonsko, Karélii a Ural až na Kamčatku.

V Evropě se druh vyskytuje roztroušeně s výjimkou jižních částí Pyrenejského, Apeninského a Balkánského poloostrova. Jižní hranice dále pokračuje východním směrem přes Kavkaz, pohoří střední Asie a oblast Bajkalu až k Tichému oceánu.

Nejedná se o horský druh, maximální nadmořská výška výskytu se pohybuje kolem 1200 m nad mořem (Simmonds 1946). Vhodným biotopem pro druh *Gentiana pneumonanthe* v našich podmínkách jsou podmáčené louky svazu *Molinion*, slatiny, okraje rašelinišť a také bývalé pastviny svazu *Vilion caninae*. V atlantské části Evropy (Anglie, Nizozemí) jsou typickým místem výskytu chudá vnitrozemská vřesoviště (Chapman & Rose 1982).

V minulosti byl tento druh dosti hojný, ale jeho rozšíření bylo vždy roztroušené. V průběhu posledních třiceti let se stával stále vzácnějším, především vlivem radikálních změn ve způsobu hospodaření na jednotlivých lokalitách. V roce 1958 byl Vyhláškou o ochraně rostlin MŠK č. 54/1958 Sb. zapsán mezi chráněné druhy a oceněn na 540 Kč. Ve Vyhlášce MŽP ČR č. 395/1992 Sb. je *Gentiana pneumonanthe* uvedena pod jménem *Pneumonanthe vulgaris* a zařazena do kategorie „druhy silně ohrožené“. Rychlé mizení tohoto druhu bylo zaznamenáno i v dalších zemích, existují podrobné zprávy o vymírání tohoto druhu ve Velké Británii, Nizozemí a Norsku (Chapman et al. 1989, Weeda et al. 1990, Oostermeijer et al. 1995c).

Na rostlinách druhu *Gentiana pneumonanthe* L. bylo zaznamenáno několik fytofágů snižujících vitalitu jedinců a především ovlivňujících reprodukční schopnost druhu. Jedním z nejvýznamnějších se ukazuje býti píďalka (druh doposud neurčen), požírající především semeníky a další části květů. Mechanicky poškozené semeníky jsou následně často postiženy houbovými chorobami. V závislosti na ekologických podmínkách roku může býti píďalkou porušeno až 40% dozrávajících semeníků hořce na lokalitě (vlastní pozorování).

Zajímavým monofágem vyskytujícím se na rostlinách *Gentiana pneumonanthe* je bezesporu modrásek druhu *Maculinea alcon*, druh vzácný a ohrožený v celé Evropě (foto 1). Modrásci tohoto druhu tvoří izolované populace v místě výskytu populací *Gentiana pneumonanthe*, vyznačují se potravní specializací a obligátní vazbou na mravence rodu *Myrmica*.

Samičky modráska kladou vajíčka na poupata a květy hořce (foto 2) v období od konce července do začátku září především v závislosti na klimatických podmínkách. Vylíhlé larvy se živí v semeníku až do pátého, posledního instaru. Po prokousání otvoru ve spodní části semeníku propadnou pod rostlinu a čekají na „adopci“ mravenci rodu *Myrmica*. Larvy používají „kukaččí strategii“: předstírají mravenčí kukly, mravenci je dopraví do mraveniště

a krmí je až do června následujícího roku, kdy se larvy kuklí. K líhnutí dochází v červenci.

Maculinea alcon je jediný druh svého rodu, u kterého je známo více hostitelů. Tyto rozdíly se zdají býti geograficky determinovány: *Myrmica scabrinodis* ve Španělsku, *M. ruginodis* v Nizozemí, *M. rubra* ve Švédsku (Elmes et al. 1994). V České republice nebyl dosud hostitelský druh z rodu *Myrmica* určen.

Populace modráška *Maculinea alcon* na lokalitě Ohrazení, 10 km od Českých Budějovic, byla studována Hančem (1996).

3. Metody

3.1. Inventarizace lokalit v regionu jihozápadních Čech

Informace o existenci lokalit s výskytem *Gentiana pneumonanthe* byly získávány ze starých literálních údajů (Hadač 1968, Vaněček 1969), od laskavých lokálních floristů a vlastní činnosti v terénu.

V průběhu vegetačních sezón v letech 1994 - 1996 byly jednotlivé lokality opakovaně navštíveny a byly zjišťovány následující charakteristiky:

- * rozloha lokality
 - * nadmořská výška lokality
 - * typ ochrany lokality (státem či jinak chráněné území)
 - * typ managementu prováděný na lokalitě
 - * vegetační typ - fytocenologický snímek 2 x 2 m s použitím Braun-Blanquetovy stupnice (Moravec 1994)
 - * odhad celkové pokryvnosti
 - * odhad pokryvnosti mechového patra
 - * počet kvetoucích jedinců *Gentiana pneumonanthe*
 - * popis 15 náhodně vybraných dospělých jedinců
 - změření výšky nejvyššího prýtu
 - určení počtu prýtů
 - určení počtu květů
 - vzdálenost k nejbližšímu kvetoucímu jedinci
- (- zaznamenání přítomnosti či nepřítomnosti vajíček *M. alcon* na květech hořce)
- * stanovení typu populace

V průběhu studia populační biologie *Gentiana pneumonanthe* byly rozlišeny tři populační typy. První z nich „invazní“ či „dynamická“ populace je charakterizována vysokým poměrným zastoupením semenáčků a mladých juvenilních rostlin, v populaci „normální“ či „stabilní“ jsou semenáčky a juvenilní rostliny přítomny, ale převládají dospělé rostliny, „regresivní“ nebo-li „senilní“ populace je tvořena pouze dospělými rostlinami (Oostermeijer et al. 1994b).

Závislosti mezi současným typem hospodaření, velikostí a typem populace *Gentiana pneumonanthe* a druhovým složením rostlinného společenstva na lokalitě byly hodnoceny

s použitím metody CCA (canonical correspondence analysis, ter Break 1990).
Rozdíly mezi průměrným počtem prýtlů, květů a výškou rostlin v závislosti na typu a velikosti populace byly testovány obecnými lineárními modely (ANOVA - GLM, Potvin 1993).
Závislost mezi pokryvností mechového patra (Eo) a velikostí a typem populace byla hodnocena s použitím zobecněných lineárních modelů (S-PLUS, Anonymus 1995a,b).
Také závislost výskytu monofágního modráška *Maculinea alcon* na velikosti populace *Gentiana pneumonanthe* byla testována zobecněnými lineárními modely.
Fytocenologické snímky z jednotlivých lokalit byly podle druhového složení rozděleny do skupin s použitím programu TWINSPAN (Hill 1979).
Z důvodu omezeného rozsahu této práce, s přihlédnutím ke stupni ohrožení jak druhu *Gentiana pneumonanthe*, tak především modráška druhu *Maculinea alcon* a s ohledem na přání těch, kteří mi některé informace o lokalitách sdělili, nejsou v přílohách uvedena primární data týkající se všech doposud známých lokalit.
Nomenklatura podle publikace Rothmaler 1978.

3.2. Genetická studie vybraných populací

3.2.1. Lokality

Jindřichovice

Bývalá pastvina nedaleko obce Jindřichovice ležící 5 km jižně od Blatné. Jedná se o poslední zbytky rozsáhlejšího území s výskytem *Gentiana pneumonanthe*, které byly v minulosti využívány jako pastviny. Od pastvy bylo na většině území upuštěno před více než 10 lety, pouze poslední část byla několikrát přepasena ještě před 4 roky.

Na dříve opuštěných částech došlo k postupu sukcesního vývoje směrem k porostům s dominujícími trávami *Calamagrostis epigeos* a *Deschampsia cespitosa*. Území nejdéle obhospodařované o přibližné rozloze 0,8 ha, kde se vyskytuje *Gentiana pneumonanthe*, je ohraničeno cestou, vzrostlým lesem, intenzívně využívanou loukou a již dříve opuštěnými částmi pastviny. I na této části je možné sledovat postup sukcesního vývoje (fytocenologický snímek č.1).

Přes výše uvedené faktory bylo na lokalitě nalezeno téměř 100 kvetoucích jedinců (r. 1996) druhu *Gentiana pneumonanthe*. V otevřenějších částech vegetačního krytu byly nalezeny semenáčky a juvenilní rostliny. Velmi silná se zdá být populace modráška *Maculinea alcon*, byla zaznamenána přítomnost i dalších vzácných denních motýlů.

Populace *Gentiana pneumonanthe* na lokalitě Jindřichovice byla označena za „stabilní“. V roce 1996 byl podán návrh Referátu životního prostředí Okresního úřadu Strakonice na vyhlášení maloplošného chráněného území na této lokalitě.

Kovašín

Jedná se o pravidelně kosené louky nad horním koncem rybníka Kovašín 10 km jižně od Blatné. Od lokality Jindřichovice je tato vzdálena 7 km. Kosení je prováděno v měsíci září tzv. obročně, což zajišťuje dozrání a vysemenění hořců vždy alespoň u poloviny jedinců druhu *Gentiana pneumonanthe*. Přítomnost hořců byla zaznamenána na ploše 1 ha, především v zamokřenější části louky (fytocenologický snímek č.2). Z dalších zajímavých druhů rostlin byla zaznamenána přítomnost *Parnassia palustris*, *Dactylorhiza majalis*, *Pedicularis palustris*, *Pedicularis sylvaticum*, *Comarum palustre*.

V roce 1996 byla početnost kvetoucích jedinců *Gentiana pneumonanthe* odhadnuta na více jak 300 rostlin. Rostliny v závislosti na typu hospodaření jsou nižšího vzrůstu (20-25 cm), velmi dobře zmlazují a jsou také fenologicky časnější (asi o 10 dní) oproti ostatním lokalitám.

Na lokalitě bylo nalezeno větší množství semenáčků a především juvenilních rostlin. Populace *M.alcon* je silná. Lokalita je součástí Přírodní památky Kovašín

Kaliště

Lokalita Kaliště se nachází 10 km JVV od Českých Budějovic na pravém břehu Kališťského rybníka. Jedná se o zemědělsky využívanou louku o rozloze 1 ha (fytocenologický snímek č.3). Hospodaření na lokalitě je prováděno s ohledem na ekologii druhu *Gentiana pneumonanthe*. Lokalita je vzdálena vzdušnou čarou cca 2 km od lokality Ohrazení 1, přirozená bariéra je však tvořena vzrostlým smrko-borovým lesem.

Populace hořců je tvořena 20 kvetoucími rostlinami (r.1996) a velmi mizivým počtem semenáčků. Rostliny jsou po ploše nerovnoměrně rozptýleny. Jeden se shluků (7 jedinců) je již po několik let situován mimo oblast každoročně kosenou, z tohoto důvodu dochází ke snížení fitness rostlin. V průběhu vegetační sezóny 1995 a 1996 byla na lokalitě zaznamenána přítomnost modráška *Maculinea alcon*.

Na základě několikaletého pozorování byla populace *Gentiana pneumonanthe* na lokalitě Kaliště zařazena do kategorie populace „stabilní“, v budoucnu je možné předpokládat vývoj směrem k populaci „senilní“. Území bylo vyhlášeno za Přírodní památku.

Ohrazení 1

Jedná se o hospodářsky nevyužívanou louku na rozhraní lesa a pole o celkové výměře cca 1.5 ha, 10 km JVV od Českých Budějovic. Území se mírně svažuje směrem jihozápadním. Přirozené hranice území tvoří les, pole a potok s břehovými porosty. Celý prostor je navíc rozdělen borovým 10 - 15 letým porostem *Pinus sylvestris* na dvě nestejně velké části. Kromě *Gentiana pneumonanthe* se na lokalitě vyskytují další zajímavé druhy: *Dactylorhiza majalis*, *Pedicularis sylvestris*^{atjca}, *Eriophorum angustifolium*, *Salix rosmarinifolia*, *Scorzonera humilis*, *Serratula tinctoria*, *Valeriana dioica*, *Carex hartmanni* a *Carex umbrosa*. V nedávné minulosti také *Orchis morio* (Lepš 1991). Vegetačně je možné území zařadit do svazu *Molinion* (fytocenologický snímek č.4).

Populace *Gentiana pneumonanthe* patří mezi nejsilnější populace v jižních Čechách, počet kvetoucích jedinců je odhadován na 500 - 600 rostlin (r.1996). Dochází k úspěšnému zmlazování, přítomnost semenáčků a juvenilních rostlin je častá. Rozptýlení není rovnoměrné, ale je koncentrované do několika míst, ne však izolovaných. Na lokalitě je přítomen modrášek *M. alcon*, jeho populace zde označována za jednu z nejsilnějších v regionu. Ekologie *M. alcon* byla studována právě na této lokalitě, některé výsledky publikoval Hanč (1996).

V posledních pěti letech byly vybrané části lokality pravidelně koseny v podzimním období, v roce 1996 byly vypracován plán hospodaření na lokalitě Ohrazení 1 (Albrechtová 1996). Populace je řazena do kategorie „stabilní“, vzhledem k vývoji v posledním desetiletí je dokonce možné označit ji za „invazní“. Území je chráněno jako Přírodní památka.

Lokality byly vybrány podle následujícího klíče:

2 populace z okolí Českých Budějovic - z toho 1 velká = Ohrazení 1

1 malá = Kaliště

2 populace z okolí Blatné - z toho 1 velká, prosperující = Kovašín

1 malá, ohrožená = Jindřichovice

3.2.2. Genetická variabilita populací

3.2.2.1. Úvod

Kromě měnících se ekologických faktorů je považováno v posledním desetiletí za nezbytné sledovat při studiu biologie ohrožených druhů také jejich populační genetiku (Bowles & Whelan 1994, Soulé 1986, 1987, Young et al. 1996)

S poklesem počtu individuí ohroženého druhu rostlin v populaci může dojít zároveň k poklesu genetické variability uvnitř populace (Barret & Kohn 1991). Především u populací druhů, jejichž areál byl v posledních desetiletích výrazně fragmentován, a jednotlivé populace druhů, velikostně omezené, se dostaly do prostorové izolace (*Gentiana pneumonanthe* je vhodným příkladem), je třeba pozorovat tyto možné geneticky-populační procesy:

* genetický drift

princip: Především u velmi malé populace nebo v případě vzácnějších alel může dojít s dosti velkou pravděpodobností k vymizení určitého genotypu z populace vlivem náhodné změny v průběhu přenosu alel z generace na generaci (Silvertown & Lovett Doust 1993).

následky: V krátkém časovém úseku nemusí dojít k negativnímu vlivu. Po delším časovém období, především dojde-li k určitým změnám prostředí, znamená snížená genetická variabilita populace snížení adaptability, což přináší zvýšení rizika vyhynutí druhu na lokalitě (Beardmore 1983).

* inbreeding

princip: V malých populacích roste pravděpodobnost samoopylení a samooplození u izolovaných jedinců nebo v rámci velmi malé skupiny izolovaných jedinců (Barret & Kohn 1991).

následky: Dochází k přibývání homozygotů v generacích potomků (offspring). Inbreeding bývá spojen se snížením fitness generace potomků, jedná se o tzv. inbreeding depression, přesné důvody k tomuto vedoucí jsou zkoumány (Charlesworth & Charlesworth 1987).

* tok genů

princip: Uskutečňuje se přenosem genetického materiálu (pyl, semena) mezi populacemi.

následky: Vedle mutace jediný známý způsob přísunu nových genů do populace. I velmi malý tok genů může zabránit vlivu genetického driftu (Wright 1948).

Pro studium genetické variability populací ohrožených druhů rostlin bývá často používáno metody analýzy izoenzymů. Tak bylo učiněno i při studiu populací *Gentiana pneumonanthe*.

3.2.2.2. Sběr materiálu v terénu

Na každé ze čtyř studovaných lokalit byly v průběhu jednoho dne v období plné fyziologické aktivity (první polovina září) odebrány vzorky listů z 15 náhodně vybraných dospělých kvetoucích rostlin. V nejkratším možném časovém úseku byly vzorky dopraveny ke zpracování do laboratoře.

Na lokalitě Ohrazení 1 byly vzorky listů rostlin odebírány z předem označených jedinců, jejichž poloha ve studovaném území byla vymapována. U každé z označených rostlin byly měřeny následující charakteristiky : výška nejvyššího prýtu (cm), počet prýtů, počet květů a vzdálenost k nejbližší kvetoucí rostlině (cm).

3.2.2.3. Analýza izoenzymů

Analýza izoenzymů byla provedena v biosystematické laboratoři Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích u Prahy, s použitím metody vertikální separace na polyakrylamidových gelech. Přesné postupy práce jsou popsány v Příručce praktických cvičení (Kirschner et al. 1994). V průběhu analýz byly použity některé modifikace určené speciálně pro práci s *Gentiana pneumonanthe*, které byly získány od pracovníků de Vries Laboratory,

University of Amsterdam. Základy receptů pro detekční barvení byly odvozovány od předpisů uvedených v publikaci Soltis & Soltis (1989).

U vzorků ze všech čtyř populací byla provedena detekce následujících enzymů:

- 6-PGDH - 6-phosphoglukonát dehydrogenáza
- AAT - asparát aminotransferáza
- PGI - glukózofosfát isomeráza
- PGM - glukózofosfát mutáza

U některých populací bylo provedeno barvení i pro další enzymy: NADHDH, LAP, EST, IDH, SHDH, MDH. Výsledky z těchto enzymů nebudou v této práci interpretovány.

Veškeré chemické návody včetně modifikací jsou uvedeny v přílohách.

3.2.2.4. Interpretace isoenzymových patterns na gelech

Interpretace isoenzymových patterns na gelech byla provedena v souladu s běžně používanou metodikou (Hoelzel 1992, Soltis & Soltis 1989). Přesné charakteristiky zpracovaných enzymů včetně katalogových čísel jsou uvedeny v přílohách. Byly detekovány tyto enzymové lokusy: 6PGDH-2, PGI-1 a AAT-2. Lokusy PGM nebyly pro interpretaci použity.

Ke statistickému zpracování získaných dat byl použit program FSTAT 1.2 (Goudet 1994).

Byly sledovány následující genetické faktory:

- frekvence alel v jednotlivých lokusech (p)
- zastoupení heterozygotních alel - pozorovaných (H_o)
- předpokládaných (H_e).

Pro porovnání výsledků analýz variability populací druhu *Gentiana pneumonanthe* uskutečněnými v Nizozemí, Norsku a Velké Británii byly počítány tyto statistické charakteristiky (Swofford & Selander 1981):

- průměrný počet efektivních alel na lokusu (A_p)
- průměr pozorovaných heterozygotních alel (H_o-p)
- průměr předpokládaných heterozygotních alel (H_e-p).

3.3. Reprodukční aktivita v závislosti na typu opylení

3.3.1. Lokalita

Manipulativní pokus byl proveden na lokalitě Ohrazení 1 (viz výše).

3.3.2. Metodika pokusu

Pokus byl prováděn s třiceti náhodně vybranými jedinci *Gentiana pneumonanthe* rozptýlenými po lokalitě Ohrazení 1.

V okolí 15 jedinců byla odstraněna nadzemní biomasa do vzdálenosti 30 cm, v okolí zbývajících 15 rostlin byla vegetace ponechána. Na každé rostlině byly vyčleněny 3 květy pro následující typy zásahů (foto 3):

typ „červený“ - ještě ve fázi poupěte (zaručuje nevyvinutou bliznu) byly odstraněny všechny tyčinky z květu

typ „růžový“ - celý květ byl překryt monofylovým sáčkem zabraňujícím vstupu hmyzu

typ „modrý“ - ponechán bez zásahu = kontrola.

V době dozrání semen byly jednotlivé tobolky sebrány a byl zjišťován počet semen, váha semen a seed set (= poměr semen ku celkovému počtu vajíček v semeníku). Zjišťování klíčivosti a přežívání semenáčků bude provedeno v roce 1997.

Z důvodu velmi vysokého počtu semen a neoplozených vajíček v tobolce byla použita metoda počítání semen a zárodků pouze v poměrné části vzorku, následného zvážení a vypočítání celkového množství.

Příslušným model analýzy variance (ANOVA, split plot design; Potvin 1993), byly testovány hypotézy:

H1: Není rozdíl mezi rostlinami cross-pollinated („červené“), samoopylenými („růžové“) a kontrolními („modré“).

H2: Není rozdíl mezi rostlinami obsekanými a neobsekanými.

V žádoucích případech byla provedena transformace dat (\log_{10} , arcsin).

4. Výsledky

4.1. Výsledky inventarizace lokalit v regionu jihozápadních Čech

V průběhu vegetačních sezón 1994 - 1996 bylo v regionu jihozápadních Čech opakovaně navštíveno a zkoumáno celkem 32 populací ohroženého druhu *Gentiana pneumonanthe*. Více než 1/3 studovaných populací se nachází na lokalitách, o kterých doposud neexistovaly žádné údaje ani v lokálních floristických materiálech, tyto lokality je možné považovat za nově objevené pro českou flóru. Byla také opětovně potvrzena přítomnost druhu *Gentiana pneumonanthe* na některých lokalitách, kde byl tento druh považován za vyhynulý.

Většina nových lokalit byla objevena v roce 1996, především ke konci vegetační sezóny (měsíce září - říjen - listopad). Z tohoto důvodu nebylo možné u některých objevených lokalit provést veškerá potřebná měření a tyto lokality nebyly zahrnuty do následujícího hodnocení.

- Byla zjištěna statisticky průkazná korelace mezi druhovým složením rostlinného společenstva a typem populace *Gentiana pneumonanthe* (invazní, stabilní nebo senilní) na lokalitě (CCA, $p < 0,05$; obr. 1). Rozložení druhů podél první osy odpovídá výskytu druhů na lokalitách s populacemi „stabilními“ a „senilními“. Druhá osa je neomezená.
- Naopak nebyla nalezena statisticky průkazná korelace mezi druhovým složením rostlinného společenstva a velikostí populace *Gentiana pneumonanthe* (obr. 2). Rozložení druhů podél první osy odpovídá výskytu druhů na lokalitách s rostoucí velikostí populací. Druhá osa je neomezená.
- Nebyla zjištěna statisticky průkazná korelace mezi současným typem hospodaření (kosení, pastva nebo občasné narušování vegetačního krytu) a druhovým složením rostlinného společenstva na lokalitě.
- Nebyly nalezeny statisticky průkazné (ANOVA-GLM) rozdíly mezi průměrným počtem prýtlů, květů a výškou rostlin v závislosti na typu ani velikosti populace *Gentiana pneumonanthe*, do které studované rostliny patří.
- Pokryvnost mechového patra na lokalitách (Eo) není možné považovat za dobrý prediktor pro velikost ani pro typ populace *Gentiana pneumonanthe* (Zobecněné lineární modely).

Na základě provedených fytoecnologických snímků byly jednotlivé lokality rozděleny do pěti skupin (obr. 5; TWINSPAN, Hill 1979) podle druhového složení společenstev na lokalitách rostoucích. Ve skupinách se společně objevily jak lokality, na kterých se vyskytují populace *Gentiana pneumonanthe* stabilní, tak lokality s populacemi senilními.

Z celkového počtu 32 studovaných populací *Gentiana pneumonanthe* byla na 14 zaznamenána přítomnost monofágního druhu *Maculinea alcon*, část lokalit tohoto druhu je možné považovat za nově objevené. Hlavním determinantem přítomnosti modráška na lokalitě je velikost populace *Gentiana pneumonanthe* ($p < 0,001$; obr. 4).

Odpověď má binární rozdělení (0 - druh přítomen, 1 - druh nepřítomen). Ze zbývajících variability vysvětluje průkazně výskyt modráška vzdálenost k nejbližší obsazené lokalitě ($p < 0,01$).

4.2. Výsledky analýz genetické variability populací

Pro výsledné zhodnocení genetické variability populací *Gentiana pneumonanthe* na čtyřech lokalitách byly použity interpretace izoenzymových patterns tří následujících lokusů: 6 PGDH-2, PGI-1, AAT-2. Všechny tři lokusy byly polymorfni ve všech čtyřech populacích (tab. 1). Interpretace gelů s barvením na detekci PGM nebyly zcela jednoznačné a z důvodu zachování nejvyšší možné objektivnosti nebyly využity.

Z dalších analýz byla zjištěna polymorfie u lokusů: LAP a EST (populace Kovašín). Jako nepolymorfni se ukázaly lokusy IDH a NADH-DH (pop. Kovašín) a SHDH (pop. Jindřichovice). Protože však detekce těchto lokusů nebyla provedena u vzorků ze všech čtyřech studovaných populací, nebyly tyto gely použity pro další hodnocení populací. Mezi jednotlivými populacemi byly zjištěny částečné rozdíly ve frekvenci alel. Nezávisle na lokalizaci populace a její velikosti se lokusy 6 PGDH-2, PGI-1 a AAT-2 projevíly v bi-alelickém patternu.

Všechny čtyři zkoumané populace se nacházejí v Hardy-Weinbergovské rovnováze. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly (chi-test, $p > 0,05$ pro všechny populace) mezi předpokládaným (H_e) a pozorovaným (H_o) podílem heterozygotů (tab. 2).

Průměrný počet efektivních alel na lokusu (A_p) i hodnoty průměrů pozorovaných (H_o-p) i předpokládaných počtů heterozygotů (H_e-p) byl u českých populací nejvyšší (tab. 3).

4.3. Výsledky pokusu s opylováním

Z celkového počtu 90 označených květů bylo 18 květů různými způsoby poškozeno (plíseň, okus hmyzem ap.), semeníky z těchto květů nebyly použity pro statistické zpracování. Signifikantně odlišný (tab. 4), nejvyšší počet a také nejvyšší procentuální podíl zralých semen byl zjištěn ve skupině semeníků ponechaných bez zásahu - kontrola (sterilizace ani zakrytí nebylo provedeno). Dosažený průměrný podíl semen z celkového počtu vytvořených vajíček v jednom gyneceu byl 58.2%. U několika semeníků byl zaznamenán 100% podíl semen, žádná neoplozená vajíčka nebyla nalezena. Také celková hmotnost biomasy tvořená, jak zralými semeny, tak neoplozenými vajíčky byla nejvyšší u kontrolní skupiny semeníků ponechaných bez zásahu (tab. 4, obr.5).

Naopak nejvyšší průměrný počet neoplozených vajíček byl zaznamenán ve skupině semeníků, u nichž byly na počátku kvetení odstraněny všechny tyčinky. V této skupině byl zjištěn signifikantně nižší průměrný počet zralých semen i procentuální podíl zralých semen z celkového počtu vytvořených vajíček, také byla zaznamenána signifikantně nižší hmotnost celkové biomasy semen a neoplozených vajíček (tab. 5).

Nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi semeníky z rostlin, v jejichž okolí byla odstraněna nadzemní biomasa, a rostlinami v zápoji ($p \gg 0.05$).

5. Diskuse

V letech 1994 - 1996 bylo studováno 32 populací ohroženého druhu *Gentiana pneumonanthe* v regionu jihozápadních Čech, z toho více než 1/3 (12) populací byla nově objevena. Většina nových lokalit s výskytem tohoto druhu se nachází ve Vojenském výcvikovém prostoru Boletice. Právě fakt, že se jedná o území v posledních padesáti letech téměř neprostupně uzavřené pro veřejnost, umožnilo zachování některých druhově zajímavých rostlinných společenstev, ve kterých se vedle *Gentiana pneumonanthe* vyskytují i další vzácné druhy (Pavličko & Vydrová 1996). Kromě téměř úplného zamezení pohybu návštěvníků v tomto prostoru, se na zachování cenných ekosystémů v oblasti podílely následující faktory:

a. V minulosti, do konce 2. světové války, se jednalo o obydlená území, což zvýšilo pestrost biotopů (louky, rybníky, pastviny ap.).

b. V území nebyly v posledních 50 letech provedeny meliorační zásahy, čímž narozdíl od okolní krajiny byla zachována vlhkomilná společenstva typická pro Pošumaví.

c. Jedná se o rozlehlé území. Pouze některé části jsou intenzívně využívány k výcviku vojenských jednotek.

d. Občasná aktivita vojenských jednotek v méně využívaných částech výcvikového prostoru zajišťuje udržování bezlesí. Narušování drnového porostu vojenskou technikou umožňuje klíčení a přežívání juvenilních stadií konkurenčně slabých rostlin - příkladem je právě druh *Gentiana pneumonanthe*.

Nesporný podíl na tom, že většina nových lokalit byla objevena v roce 1996, má vývoj počasí v tomto roce, které mělo atlantičtější ráz (chladněji, více srážek a pozdější nástup léta). Vše nasvědčuje tomu, že tento vývoj počasí druhu *Gentiana pneumonanthe* vyhovuje. Důležitou roli sehrála také skutečnost, že bylo dokončováno floristické mapování pro připravovanou Květenu Šumavy a oblasti VVP Boletice byl poprvé v posledních desetiletích prováděn detailní botanický průzkum.

Nové lokality *Gentiana pneumonanthe* byly objeveny také mimo VVP. K oblastem se zachovalými rostlinnými společenstvy je možné zařadit oblast Blatenska a Plánického hřebenu, kde na bývalých pastvinách a tzv. ladech byly nalezeny vcelku silné a stabilní populace *Gentiana pneumonanthe*, čítající vždy několik set dospělých kvetoucích jedinců. Při ověřování starších literálních údajů často docházelo ke zjištění, že dříve uváděné lokality již zcela zmizely nebo se jedná o populace *Gentiana pneumonanthe* velmi slabé - senilní.

V pěti případech byla na lokalitách uváděných v literatuře nalezena pouze jedna kvetoucí rostlina, na několika dalších se jednalo o poslední zbytky populací tvořené méně než deseti dospělými jedinci ve špatné kondici. U populací nacházejících se v takovémto stavu je možné predikovat vyhynutí druhu na lokalitě do několika let. V některých případech se dokonce jedná o lokality nacházející se v maloplošných chráněných územích, na kterých nebyl zajištěn vhodný typ hospodaření (např. Prameny Klíčavy, V bahnách - okres Rakovník; Hůrky - okres Plzeň sever). Na těchto lokalitách dochází vlivem sukcesního vývoje k vytlačování konkurenčně málo schopných druhů, mezi něž *Gentiana pneumonanthe* patří.

Z pěti vegetačních typů vytvořených na základě fytoecologických snímků z jednotlivých lokalit odpovídají skupiny „D“ a „E“ charakteristice svazu *Vilion-caninae*. Skupiny „A“, „B“ a „C“ je možné přiřadit do svazu *Molinion* (obr. 5; foto 4 a 5; Moravec 1983)

Na lokalitách s těmito typy rostlinných společenstev bylo zjištěno 17 populací *Gentiana pneumonanthe* kategorie „populace senilní“ a 15 populací patřící do kategorie „populace stabilní“. Žádná ze studovaných 32 populací nebyla zařazena do kategorie „invazní populace“. V případě lokality Ohrazení 1 je možné, vzhledem k vývoji v posledním desetiletí, uvažovat o přechodu od „stabilní populace“ k „populaci invazní“. Na lokalitě se vlivem pravidelného kosení zvyšuje poměrné zastoupení semenáčků a juvenilních rostlin a dochází ke zmlazování v gapech vzniklých při obhospodařování (koleje od traktoru, zarytá kosa ap.). U několika populací vzhledem k současným změnám ve způsobu hospodaření je možné očekávat přechod z jednoho populačního typu do druhého. Dlouholeté sledování populací je pro stanovení a případné predikování změn zcela nezbytné.

Byla zjištěna statisticky průkazná korelace mezi druhovým složením rostlinného společenstva a typem populace *Gentiana pneumonanthe* (CCA, $p < 0.05$; obr. 1), což odpovídá i výsledkům pozorování prováděných na vřesovištních i lučních lokalitách v Nizozemí (Oostermeijer et al. 1994b, 1996b). Charakteristiky druhového složení společenstva i typu hospodaření na lokalitách s výskytem „senilních populací“ jak na vřesovištních, tak v lučních společenstvech v Nizozemí, jsou zcela shodné se stavem lokalit tohoto populačního typu v České republice. Jedná se o lokality v pokročilém stadiu sukcesního vývoje s hustou vegetací zabraňující zmlazování *Gentiana pneumonanthe*.

Lokality, na kterých se vyskytují populace z kategorie „normální populace“, jsou v Nizozemí běžnější v lučních společenstvech, pravidelně kosených nebo pasených.

Na vřesovištích se tento populační typ vyskytuje v místech, kde v minulosti probíhala těžba povrchové vrstvy zeminy (tzv. sod cutting - materiál na stavbu hrází, střech a zemina

do zahrádek), a dále pak v místech pravidelně narušovaných pastvou a zimními záplavami, které potlačují postup sukcese.

Za analogickou k lokalitám holandských vřesovišť je možné označit tu skupinu českých lokalit, která je řazena do svazu *Vilion-caninae* (obr. 5 - skup. „D“ a „E“). Jedná se především o bývalé obecní pastviny a kamenité okraje lesů nebo polí. Druhově jsou lokality z „českých vřesovišť“ bohatší (10 - 15 druhů vyšších rostlin v Holandsku vers. 25 - 30 druhů v Čechách). Luční společenstva zařazená do svazu *Molinion* jsou srovnatelná s lučními společenstvy v Nizozemí, kde je jako dominanta uváděn druh *Molinia coerulea* a dále pak druhy *Festuca ovina*, *Nardus stricta*. U této skupiny lokalit v Holandsku má větší význam pokryvnost mechového patra, která se vlivem vlhčího atlantského podnebí a vyšší acidifikace půdy na loukách pohybuje v rozmezí 10 - 96%, což velmi negativně ovlivňuje klíčení semen a přežívání semenáčků. Při hodnocení dat z lokalit v jihozápadním regionu České republiky nebyla zjištěna statisticky průkazná závislost mezi pokryvností Eo (pokryvnost Eo se pohybuje mezi 1-20%, u dvou lokalit dosáhla 40%) a typem ani velikostí populace *Gentiana pneumonanthe*.

Populační typ „invazní populace“, do kterého nebyla zařazena žádná ze studovaných 32 populací v České republice, se vyskytuje v Nizozemí téměř výhradně na vřesovištích v mladších sukcesních stadiích a v místech se sekundární sukcesí probíhající po určitém radikálním mechanickém narušení (sod cutting v nedávné minulosti, silný požár ap.). Na českých lokalitách je možný podobný vývoj pouze v místech s intenzivním typem hospodaření spojeným s drobným narušováním drnu a nebo v místech, kde došlo k velmi radikálnímu porušení společenstva a zároveň byla zachována reprodukčně silná část populace *Gentiana pneumonanthe* v těsném sousedství (např. omezený pohyb těžké techniky ve VVP Boletice). V takovýchto situacích je možné předpokládat změnu poměrného zastoupení věkových kategorií v populaci ve prospěch juvenilních rostlin alespoň v částech populací, případně v subpopulacích rozlehlejších populací/metapopulací.

Narozdíl od průkazné korelace mezi druhovým složením rostlinného společenstva a typem populace nebyla zjištěna statisticky průkazná korelace mezi druhovým složením a velikostí populace *Gentiana pneumonanthe*. Důvodem je skutečnost, že některé relativně početné populace (až 50 dospělých kvetoucích jedinců) vzhledem k naprosté absenci semenáčků a juvenilních rostlin patří do kategorie „senilní populace“.

Mnohé takovéto populace *Gentiana pneumonanthe* mohou přežívat desítky let s ohledem na to, že dospělí jedinci žijí více než 30 let (Oostermeijer 1992), což umožňuje přetrvávání populace, ačkoliv nedochází ke zmlazování. Při matematickém modelování přežívání populace *Gentiana pneumonanthe* na dříve pravidelně vypalovaném vřesovišti v jižní Anglii, kde vlivem ukončení tohoto typu hospodaření dochází k sukcesním změnám (zahušťování vegetace, přibývání travních druhů atd.), bylo odhadnuto přežívání populace *Gentiana pneumonanthe* po dobu dalších 30 - 50 let (Chapman & Rose 1982, Chapman et al. 1989).

Přestože nebyla zjištěna statisticky průkazná závislost mezi současným typem hospodaření a druhovým složením rostlinného společenstva na lokalitě, neznamená to, že zde není žádná závislost. Jednalo se o slabý test díky relativně nízkému počtu velmi heterogenních lokalit. Je zcela nezbytné zajištění přiměřeného typu hospodaření ze strany státní správy a majitelů soukromých pozemků s ohledem na zachování dostatečně početných a stabilních populací *Gentiana pneumonanthe*. Pouze vhodný typ hospodaření je schopen zabrzdit sukcesní vývoj, což zajistí úspěšné přežívání populací konkurenčně slabých druhů, mezi než *Gentiana pneumonanthe* patří. Návrh vhodného managementu na jednotlivých lokalitách je v současné době vypracováván ve spolupráci s příslušnými úředníky státní správy a bude publikován samostatně.

Z celkového počtu 32 studovaných populací *Gentiana pneumonanthe* byla na 14 lokalitách zaznamenána přítomnost ohroženého monofágního druhu motýla *Maculinea alcon*. Hlavním determinantem přítomnosti modráška na lokalitě je velikost populace *Gentiana pneumonanthe* ($p < 0.001$, obr. 4). Pouze na jedné početné populaci *Gentiana pneumonanthe* (400 kvetoucích jedinců), nebyla přes opětovné snahy zaznamenána přítomnost *Maculinea alcon*. Důvody mohou být různé - určitá izolovanost populace, lidský faktor, vliv pesticidů aplikovaných v okolí nebo nepřítomnost hostitelského druhu mravence z rodu *Myrmica*.

K určení skutečných příčin je třeba dalších studií.

Ze zbývajících variability vysvětluje statisticky průkazně výskyt modráška vzdálenost k nejbližší modráškem obsazené lokalitě ($p < 0.01$). Přítomnost modráška byla zaznamenána jak na několika lokalitách se silnými populacemi *Gentiana pneumonanthe* vzdálených desítky kilometrů od nejbližší obsazené lokality, tak na evidentně zbytkových lokalitách s populacemi tvořených pouze nízkým počtem dospělých kvetoucích jedinců, nacházejících se nepříliš daleko od jiných obsazených lokalit.

Studium migračních schopností *Maculinea alcon* mezi jednotlivými populacemi *Gentiana pneumonanthe*, by se mělo stát součástí připravovaného projektu.

Při hodnocení výsledků genetických analýz populací metodou izoenzymové analýzy je třeba přihlídnout ke skutečnosti, že byly zpracovávány vzorky pouze ze 4 lokalit a byly použity výsledky pouze 3 lokusů (6 PGDH-2, PGI-1 a AAT-2; PGM byl nejasně interpretovatelný). Tyto lokusy byly zvoleny na základě dřívějších zkušeností laboratoře Botanického ústavu v Průhoncích i laboratoře de Vries v Amsterdamu. Byla předpokládána vysoká polymorfie u všech populací, která se také potvrdila (tab. 1). U žádného lokusu nebyly pozorovány více než 2 alely, jedná se o tzv. bi-alelický pattern.

Zaznamenaný podíl efektivních alel na polymorfních lokusech ($A_p = 1,38$) byl u českých populací nejvyšší ze všech porovnávaných údajů (tab. 3). Nejnižší hodnota byla zjištěna ve Velké Británii ($A_p = 1,07$). Použitá data ukazují, že u českých populací existuje nejvyšší genetická variabilita. Také průměrné hodnoty pozorovaných (H_o-p) i předpokládaných podílů heterozygotů (H_e-p) byly nejvyšší u českých populací. Úroveň heterozygotičnosti byla extrémně nízká u populací *Gentiana pneumonanthe* ve Velké Británii a Norsku (tab. 3). Toto může být důsledkem skutečnosti, že vzorky pro analýzy britských populací byly odebrány z vypěstovaných rostlin ve skleníku. Zároveň však není možné vyloučit vliv inbreedingu, který byl pozorován v Norsku (Oostermeijer et al. 1995c). Význam může mít také skutečnost, že lokality ve Velké Británii i Norsku se nacházejí na okraji areálu rozšíření druhu *Gentiana pneumonanthe*.

Po testování rozdílů mezi pozorovanými (H_o) a předpokládanými (H_e) podíly heterozygotů v populaci bylo zjištěno, že všechny čtyři zkoumané populace *Gentiana pneumonanthe* se nacházejí v Hardy-Weinbergovské rovnováze. Nebyly zjištěny signifikantní odchylky (chi-test, $p > 0,05$). Nebyly zjištěny také rozdíly mezi populacemi malými a velkými, ani mezi populacemi z okolí Českých Budějovic a Blatné.

Celkově je možné po genetické stránce hodnotit stav českých populací *Gentiana pneumonanthe* jako uspokojivý. S ohledem na velmi nízký počet studovaných populací i použitých lokusů není samozřejmě možné získané výsledky zobecnit na všechny populace v České republice. Pro objektivní posouzení genetické variability populací *Gentiana pneumonanthe* v Čechách bude nezbytné provést další analýzy.

Na základě pokusu s opylováním je možné konstatovat, že k nejvyšší produkci zralých semen, jež byla zaznamenána u semeníků z kontrolní skupiny (tyčinky nebyly odstraněny,

květ nebyl překrytý monofilem), dochází u květů za podmínek shodných se stavem v přírodě. Je možné předpokládat následující průběh opylení a oplození: Jedná se o druh protoandrický (foto 6 a-d) s dosti dlouhým časovým rozestupem dozrávání tyčinek a rozevřením blizny (5-6 týdnů). Proto za normálních podmínek dojde k vyprášení semeníků v období, kdy ještě blizna není zralá. Na bliznu pak v patřičném období opylovači donesou pyl jiného jedince. Tímto způsobem je zajištěno opylení křížem (cross-pollination). Jestliže z jakýchkoliv důvodů (počasí, izolace jedinců, nepřítomnost opylovačů ap.) neproběhne tento typ opylení, dojde k dalšímu vychlípění částí blizny a k opylení vlastním pylem, jenž ulpěl na květních částech, především gyneceu.

Skutečnost, že nejnižší počet zralých semen a také celková hmotnost biomasy tvořená zralými semeny a neoplozenými vajíčky byla zaznamenána ve skupině semeníků z květů *Gentiana pneumonanthe*, ze kterých byly odstraněny před začátkem kvetení tyčinky, může být výsledkem různých faktorů. Tento typ zásahu se snažil zajistit opylení květu pylem z jiné rostliny a zabránit samoopylení. Není zcela možné vyloučit, že přes veškerou opatrnost, byly květy částečně poškozeny, což mělo vliv na jejich vitalitu. Protože dosud není jasné, zda-li u druhu *Gentiana pneumonanthe* dochází k samoopylení pouze při úplné absenci opylení cizím pylem, a nebo zda je toto možné i v jiných případech, může být zjištěný deficit zralých semen v semeníku výsledkem absence dodatečného samoopylení.

Ve skupině zakrytých květů byl zaznamenán vývoj semen ve všech pozorovaných semenících - došlo k úspěšné samoopylení. Fenologicky bylo zrání semeníků z této skupiny poněkud opožděné, což mohlo být zapříčiněno jak fyzickým překrytím květů, tak opožděným opylením, oplozením a následným procesem zrání.

Průměrný počet zralých semen v semenících se pohyboval v rozmezí 500 - 800 semen.

U skupiny květů, z nichž byly odstraněny tyčinky, byl počet zralých semen nižší ((60)100 - 200). Protože se jedná o produkci semen z jednoho semeníku a dospělé kvetoucí rostliny na lokalitě Ohrazení 1 mívají průměrně 7-15 květů, je možné takovouto produkci zralých semen označit za dostatečnou.

S přihlédnutím k 25-30% klíčivosti semen (nepublikovaná data) a nízkému přežívání semenáček v prvním roce života, které se pohybuje v následujících hodnotách: 12,6% na kosených plochách, 42,9% na plochách vypálených (ale pouze 8% počáteční klíčivost) a 33,6% na plochách, kde byl odstraněn drn (Křenová & Lepš 1996), docházíme k nízkým hodnotám potencionálně vzniklých mladých jedinců.

S ohledem na tuto skutečnost může být nízká produkce semen v semenících z květů s odstraněnými tyčinkami již limitující. Počty semen vzniklých v kontrolní skupině bez zásahu (odpovídá přirozeným podmínkám) nejsou limitujícím faktorem pro reprodukci druhu *Gentiana pneumonanthe*.

Signifikantní rozdíly v produkci semen nebyly zjištěny mezi rostlinami, v jejichž okolí byla odstraněna nadzemní biomasa, a rostlinami v zápoji ($p \gg 0,05$). Toto odpovídá zjištěním ze studií prováděných na vřesovišti Heidebloem v Holandsku (Petanidou et al. 1995).

Zde nebyly zjištěny rozdíly v produkci semen mezi rostlinami rostoucími v rostlinných společenstvech s dominantním druhem *Erica tetralix* a rostlinami ze společenstva s kodominancí *Erica tetralix* a *Calluna vulgaris*. Nižší produkce zralých semen byla zaznamenána na jedincích rostoucích v hustých porostech *Molinia coerulea* ($p < 0,05$).

U těchto rostlin byla zaznamenána vyšší produkce vajíček. Vysvětlení je možné hledat ve vyšší hodnotách dusičnanů v oblastech vřesoviště s dominantní *Molinia coerulea* (Petanidou et al. 1995).

Další informace o limitaci reprodukčních schopností *Gentiana pneumonanthe* přinesou pokusy s klíčivostí semen, která dozrála ve květech opylených různými způsoby (samoopylení, crossing pollination a kontrola, viz výše), a přežíváním semenáčků, které budou provedeny na jaře 1997.

Produkce semen při různém typu opylování, ani výška nadzemní biomasy vegetace v okolí dospělých kvetoucích rostlin (Křenová & Lepš 1996) nejsou limitujícím faktorem pro regeneraci a přežívání populací ohroženého druhu *Gentiana pneumonanthe*.

Za rozhodující je možné označit typ hospodaření na lokalitě, protože pouze vhodný management (kosení, pastva a narušování drnu) může zajistit vhodnou regenerační niku pro druh *Gentiana pneumonanthe*.

6. Shrnutí

V regionu jihozápadních Čech bylo studováno 32 populací ohroženého druhu *Gentiana pneumonanthe*. 17 populací bylo zařazeno do kategorie „populace senilní“ a 15 do kategorie „populace stabilní“. Žádná ze studovaných populací nebyla zařazena do kategorie „populace invazní“. (Oostermeijer 1994b).

- Byla zjištěna statisticky průkazná korelace mezi druhovým složením rostlinného společenstva a typem populace *Gentiana pneumonanthe* (CCA, $p < 0,05$).
- Naopak nebyla zjištěna statisticky průkazná korelace mezi druhovým složením společenstva a velikostí populace ani současným typem hospodaření.
- Nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly mezi průměrným počtem prýtlů, květů a výškou rostlin v závislosti na typu ani velikosti populace *Gentiana pneumonanthe*.
- Pokryvnost mechového patra (Eo) není možné označit za dobrý prediktor pro velikost ani typ populace *Gentiana pneumonanthe*.

Druhové složení rostlinného společenstva na lokalitě je přímo závislé na postupu sukcesního vývoje rostlinného společenstva, jenž je ovlivňován typem hospodaření. Druhy konkurenčně slabé, mezi něž *Gentiana pneumonanthe* patří, mohou na lokalitách koexistovat pouze při dodržování klasických typů hospodaření (pravidelné kosení, pastva, narušování drnu).

Na 14 lokalitách s výskytem *Gentiana pneumonanthe* byla zaznamenána přítomnost silně ohroženého monofágního modráška *Maculinea alcon*. Hlavním determinanem přítomnosti modráška na lokalitě je velikost populace *Gentiana pneumonanthe* ($p < 0,001$). Určitou roli hraje také vzdálenost k nejbližší obsazené lokalitě ($p < 0,01$).

Na vzorcích z lokalit Jindřichovice, Kovašín, Kaliště a Ohrazení 1 byly zjištěny tři následující izoenzymové lokusy jako polymorfni: 6 PGDH-2, PGI-1, AAT - 2.

Všechny čtyři zkoumané populace se nacházejí v Hardy-Weinbergovské rovnováze. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi (chi-test, $p > 0,05$ pro všechny populace) mezi předpokládaným (H_e) a pozorovaným (H_o) podílem heterozygotů.

Při manipulativním pokusu s opylováním, signifikantně odlišný, nejvyšší počet a také procentuálně nejvyšší podíl zralých semen byl zaznamenán ve skupině semeníků ponechaných bez zásahu - kontrola, přirozený typ opylování.

Nejvyšší počet neoplozených vajíček byl zjištěn ve skupině semeníků, u nichž byly na počátku kvetení odstraněny všechny tyčinky, čímž bylo zabráněno samoopylení.

U semeníků z této skupiny byl zaznamenán signifikantně nižší průměrný počet zralých semen i procentuální podíl zralých semen z celkového počtu vytvořených vajíček. Také hmotnost celkové biomasy semen a neoplozených vajíček byla signifikantně nižší u této skupiny semeníků. Nebyly zjištěny rozdíly mezi semeníky z rostlin, v jejichž okolí byla odstraněna nadzemní biomasa, a rostlinami v zápoji ($p \gg 0,05$).

Typ opylení není limitujícím faktorem přežívání populací ohroženého druhu *Gentiana pneumonanthe*, stejně jako výška nadzemní biomasy v okolí dospělých rostlin.

Nejdůležitějším faktorem, který rozhoduje o přežívání dostatečně početné a stabilní populace druhu *Gentiana pneumonanthe*, je typ hospodaření prováděný na lokalitě. Pouze kosení nebo pastva společně s narušováním drnového krytu mohou zajistit existenci rostlin s dobrým fitness a úspěšné klíčení a následné přežívání semenáčků (Křenová & Lepš 1996) konkurenčně slabého druhu, jakým je *Gentiana pneumonanthe*.

Závěrem bych chtěla poděkovat především dr. Janu Š. Lepšovi, za podnětné rady a veškerou pomoc, kterou mi po celou dobu studia ochotně poskytoval.

Mé poděkování patří také dr. Janu Štěpánkovi, dr. Janu Kirschnerovi a paní laborantce Karin Kotové z Botanického ústavu v Příhonicích. Bez jejich laskavé pomoci by nebylo možné udělat genetické analýzy populací.

*Lojzovi Pavlíčkovi z Prachatic mnohokrát děkuji nejenom za to, že mi ukázal mnoho nových lokalit *Gentiana pneumonanthe*, ale především za to, že díky němu jsem měla možnost poznat kouzlo Boleticka.*

Ráda bych poděkovala i všem ostatním přátelům a kamarádům, kteří dobrou radou nebo pomocnou rukou přispěli k dokončení této práce. Děkuji na tomto místě především Aleně Vydrové, Ivě Špačkové, Martinovi Konvičkovi a Martinovi Dresslerovi, jehož staré autíčko z vrakoviště nám několikrát posloužilo jako nezbytné přiblížovací vozadlo. Děkuji také všem lokálním floristům a pracovníkům okresních muzeí, kteří mi laskavě poskytli informace o lokalitách.

Mnohokrát děkuji Sojkovi a jeho nerozlučnému kamarádovi Bundáškoví, kteří mne častokrát doprovázeli do nedostupných končin Země České a poskytovali mi psychickou útěchu, když jsem zoufala nad marností konání svého.

Sice zcela na konci avšak nejvíce bych chtěla poděkovat celé své rodině za jejich péči a starostlivost, kterou mě obklopovali po celou dobu studia.

Milovníkům jazyka českého se hluboce omlouvám za používání anglických terminů, které jsem použila v zájmu zachování jednoznačnosti a výstižnosti tam, kde jsem to považovala za potřebné.

Literatura:

- Anon. Statistical Sciences. 1995a. S-PLUS Guide to Statistical and Mathematical Analysis, Version 3.3. for Windows. StatSci, a division of Mathsoft, Inc., Seattle, Washington, USA.
- Anon. Statistical Sciences. 1995b. User's manual, Version 3.3. for Windows. StatSci, a division of Mathsoft, Inc., Seattle, Washington, USA.
- Albrechtová, V. 1996. Návrh managementu na lokalitě Ohrazení. *Agentura pro ochranu přírody. České Budějovice.*
- Barret, S.C.H. & J.R. Kohn. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. Pp. 3-30 in: D.A. Falk & K.E. Holsinger [ed.] *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press. NY.
- Barret, S.C.H. & D. Charlesworth. 1991. Effects of a change in the level of inbreeding on the genetic load. *Nature*. 352: 522-524.
- Bowles, M.L. & Ch.J. Whelan [ed.]. 1994. *Restoration of endangered species*. Cambridge University Press.
- Chapman, S.B. & R. J. Rose. 1982. Ecological studies on the marsh gentian (*Gentiana pneumonanthe*). Institute of Terrestrial Ecology Annual Report for 1982: 74-78.
- Chapman, S.B., R.J. Rose & R.T. Clarke. 1989. The behaviour of populations of the marsh gentian (*Gentiana pneumonanthe*): modeling approach. *Journal of Applied Ecology*. 26:1059-1079.
- Charlesworth, D. & B. Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18:237-268.
- Charlesworth, D. 1991. The apparent selection on neutral marker loci in partially inbreeding populations. *Genetical Research*. 57:159-175.
- Dostál, J. 1989 *Nová květena ČSSR* Academia. Praha.
- Elmes, G.W., J.A. Thomas & O. Hammarstedt. 1994. Differences in host-ant specificity between Spanish, Dutch and Swedish populations of the endangered butterfly *Maculinea alcon* (Schiff)(Lepidoptera). *Zoological Memoirs*. 48:55-68.
- Goudet, J. 1994. FSTAT, a program for IBM PC compatibles to calculate F-statistics. Dorigny. Switzerland.
- Hadač, E., J. Sofron & M. Vondráček. 1968. *Květena Plzeňska*. Plzeň.
- Hanč, Z. 1996. Bakalářská práce. Biolog. fak. JČU.

- Hill, M.O. 1973. TWINSpan - A FORTRAN program for arranging multivariate data in an ordered two-way table by classification of the individuals and attributes. Ecology and Systematics, Cornell University Ithaca, NY.
- Hoelzel, A.R. 1992. [ed.] *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*. Oxford University Press. Oxford.
- Huenneke, L.F. 1991. Ecological implications of genetical variation in plant populations. Pp 31-44 in: D.A. Falk & K.E. Holsinger [ed.] *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press. New York.
- Kirschner, J., L.Kirschnerová, J.Štěpánek & M.Tichý. 1994. *Analýza izoenzymů v populační biologii rostlin*. Průhonice.
- Klimeš, L., J.W. Jongepier & I. Jongepierová. 1995. Variability in species richness and guild structure in two species-rich grasslands. *Folia geobotanica & phytotaxonomica*. 2:243-253
- Křenová, Z. & J. Lepš. 1996. Regeneration of a *Gentiana pneumonanthe* population in an oligotrophic meadow. *Journal Vegetation Science* 7:107-112.
- Kull, K. & M. Zobel. 1991. High species richness in an Estonian wooded meadow. *Journal Vegetation Science*. 5:715-718.
- Lepš, J. Š. 1991. Zpráva o botanickém průzkumu lokalit vlhkých luk severovýchodně od obce Ohrazení. [MS:- pro vnitřní potřebu OÚ České Budějovice].
- McGee, P.A. 1985. Lack of spread of endomycorrhizas of *Centaureum* (Gentianaceae). *New Phytologist*. 101: 451-458.
- Moravec, J. 1983. Rostlinná společenstva České socialistické republiky a jejich ohrožení. *Severočeská příroda*. Litoměřice. 14. app.1:1-110.
- Moravec, J. 1994. *Fytocenologie*. Akademie. Praha.
- Oostermeijer, J.G.B., J.C.M. den Nijs, L.E.L. Raijmann & S.B.J. Menken. 1992. Population biology and management of marsh gentian (*Gentiana pneumonanthe* L.), a rare species in The Netherlands. *Botanical Journal of Linnean Society*. 108: 117-130.
- Oostermeijer, J.G.B., M.W. van Eijck & J.C.M. den Nijs. 1994a. Offspring fitness in relation to population size and genetical variation in the rare perennial species *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae). *Oecologia*. 97:289-296.
- Oostermeijer, J.G.B., J.C.M. den Nijs & S.B.J. Menken. 1994b. Population structure of rare, long-lived perennial *Gentiana pneumonanthe* L. in relation to vegetation and management in The Netherlands. *Journal of Applied Ecology*. 31: 428-438.
- Oostermeijer, J.G.B., M.W. van Eijck, N.C. van Leeuwen & J.C.M. den Nijs. 1995a. Analysis of relationship between allozyme heterozygosity and fitness in the rare *Gentiana pneumonanthe* L. *Journal of Evolutionary Biology*. 8: 739-759.

- Oostermeijer, J.G.B. & J.C.M. den Nijs. 1995b. Effects of outcrossing distance and selfing on fitness components in the rare *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae). *Acte Botanica Neerlandica*. 44:258-268.
- Oostermeijer, J.G.B., H.Hvatum, J.C.M. den Nijs & L.Borgen. 1995c. Genetic variation, plant growth strategy and population structure of the rare, disjunctly distributed *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae) in Norway. *Acta Univ.Ups. Symb.Bot.Ups.* 31:3, 185-203.
- Oostermeijer, J.G.B., M.L. Brugman, E.R. de Boer & J.C.M. den Nijs. 1996a. Temporal and spatial variation in the demography of a rare perennial, *Gentiana pneumonanthe*. *Journal of Ecology*. 84, in press
- Oostermeijer, J.G.B., S.H. Luijten, Z.V. Křenová & J.C.M. den Nijs. 1996b. Population and habitat characteristics limit reproductive success of the rare *Gentiana pneumonanthe* L. to be submitted to *Conservation Biology*.
- Pavličko, A. & A.Vydrová. 1996. Zajímavé druhy VVP Boletice - nepublikováno.
- Petanidou, T., J.C.M. den Nijs, J.G.B. Oostermeijer & A.C.Ellis-Adam. 1995. Pollination ecology and patch-dependent reproductive success of the rare perennial *Gentiana pneumonanthe* L. *New Phytologist*. 129: 155-163.
- Potvin, C. 1993. ANOVA: experiments in controlled environments. Pp. 46-48 In: Schneider, S/M. and J. Gurevitch [ed.] Design and analysis of ecological experiments. Chapman and Hall, NY.
- Raijmann, L.E.L., N.C.van Leeuwen, R.Kersten, J.G.B.Oostermeijer, J.C.M. den Nijs & S.B.J.Menken. 1994. Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L. *Conservation Biology*. 8: 1014-1026.
- Rothmaler, W. 1978. *Exkursionflora*. Volk und Wissen Volkseigener Verlag. Berlin.
- Salisbury, E.J.1942. *The Reproductive Capacity of Plants*. Bell. London.
- Silvertown, J.W. & J.L. Doust. 1983. *Introduction to Plant population Biology*. Blackwell. Oxford.
- Simmonds, N.W. 1946. *Biological Flora of the British Isles. Gentiana pneumonanthe* L. *Journal of Ecology*. 33: 295-307.
- Soltis, D.E. & P.S. Soltis [eds.] 1989. *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press. Portland (Oregon).
- Soulé, M.E. 1986 The fitness and viability of populations. Pp. 13-116 in: M.E. Soulé [ed.] *Conservation Biology*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Soulé, M.E. 1987. *Viable population for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Swofford, D.L. & R.B. Selander. 1981. A computer program for analysis of allelic variation in genetics. *J. Hered.* 72: 281-283.
- ter. Braak, C.J.F. 1990. CANOCO - A FORTRAN program for CANONical Community Ordination by [partial] [detrended][canonical] correspondence analysis, principal components analysis and redundancy analysis, version 3.10. Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA.
- Thomas, J.A. 1995. The ecology and conservation of *Maculinea alcon* and the other European species of large blue butterfly. In: Pullin A.S. [ed.] *Ecology and conservation of butterflies*. Chapman and Hall. London.
- Vaněček, J. 1969. *Květena Horažďovicka*. Plzeň.
- Weeda, E.J., R. van der Meijden & P.A. Bakker. 1990. Floron red data list 1990. Red data list of the extinct, endangered and vulnerable plants in The Netherlands in the period 1980-1990. *Gorteria*. 16:1-26.
- Wright, S. 1948. On the roles of directed and random changes in gene frequency in the genetics of populations. *Evolution* 2: 279-295.
- Young, A., T.Boyle & T.Brown. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *TREE*. 11: 413-418.

Přílohy

tabulky

obrázky

fytoceologické snímky

extrakční pufry

barvení izoenzymů

fotografie

apendix

Tabulka 1.

Frekvence alel polymorfních allozymových lokusů ze 4 studovaných populací *Gentiana pneumonanthe*. „F“ představuje rychleji migrující a „S“ pomaleji migrující alely.

populace/alela	vzorek	6 PGDH-2		PGI-1		AAT-2	
		F	S	F	S	F	S
Jindřichovice	15	0,667	0,333	0,633	0,367	0,333	0,667
Kovašín	14	0,643	0,357	0,536	0,464	0,286	0,714
Kaliště	15	0,5	0,5	0,733	0,267	0,433	0,567
Ohrazení 1	15	0,667	0,333	0,367	0,633	0,367	0,633
total	59	0,619	0,381	0,568	0,432	0,356	0,644

Tabulka 2.

Pozorovaný (H_o) a předpokládaný (H_e) podíl heterozygotů u jednotlivých polymorfních allozymových lokusů ze 4 studovaných populací.

populace	vzorek	6 PGDH-2		PGI-1		AAT-2	
		H_o	H_e	H_o	H_e	H_o	H_e
Jindřichovice	15	0,533	0,466	0,467	0,48	0,4	0,46
Kovašín	14	0,571	0,476	0,5	0,516	0,286	0,423
Kaliště	15	0,6	0,517	0,4	0,405	0,333	0,508
Ohrazení 1	15	0,533	0,46	0,467	0,48	0,333	0,48

Tabulka 3.

Rozdíly v genetické variabilitě populací *Gentiana pneumonanthe* v různých zemích Evropy. A_p = průměrný počet efektivních alel na lokusu, H_o-p a H_e-p = průměr pozorovaných a předpokládaných počtů heterozygotů.

	poč. popul.	poč. lokusů	A_p	H_o-p	H_e-p
Česká republika	4	3	1,38	0,452	0,473
Nizozemí *	25	16	1,21	0,119	0,133
Norsko **	14	6	1,15	0,042	0,046
Velká Británie ***	5	12	1,07	0,011	0,017

* Rajjman et al. 1994, ** Oostermeijer et al. 1995c, *** Mulder - nepublikovaná data

Tabulka 4.

Průměrný počet zralých semen a neoplozených vajíček, průměrná celková hmotnost jednotlivých semeníků a procentuální podíl zralých semen z celkového počtu vytvořených vajíček v semeníku.

Typ zásahu: 1 - kontrola, 2 - květ zakrytý, zajišťuje samopylení, 3 - v květu odstraněny tyčinky, zabránění samopylení.

typ zásahu	počet semen	počet vajíček	hmotnost [mg]	podíl semen [%]
M 1	369,5	259,8	23,3	58,2
S 2	322,4	301,0	17,9	49,0
C 3	212,0	369,0	13,3	36,1

Tabulka 5.

Analýza variance, split plot design. Vliv opylování květů (ZASAH) a obsekání rostlin (SEKANI) na reprodukční schopnosti *Gentiana pneumonanthe* L., vegetační sezóna 1996, lokalita Ohrazení 1.

A. %podíl semen z celkového počtu vajíček v semeníku (arcsin)

DEP VAR: ARPODIL N: 72 MULTIPLE R: 0.786 SQUARED MULTIPLE R: 0.618

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
SEKANI	0.089	1	0.089	0.556	0.470
SEKANI					
*ZASAH	0.518	2	0.259	2.817	0.072
ZASAH	1.385	2	0.692	7.524	0.002
ROSTLINA					
{SEKANI}	4.307	27	0.160	1.733	0.057
ERROR	3.589	39	0.092		

B. hmotnost celkové biomasy semen a neoplozených semeníků (log 10)

DEP VAR: LOVHC N: 72 MULTIPLE R: 0.793 SQUARED MULTIPLE R: 0.629

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
SEKANI	0.036	1	0.036	0.196	0.666
SEKANI					
*ZASAH	0.206	2	0.103	1.047	0.361
ZASAH	1.018	2	0.509	5.185	0.010
ROSTLINA					
{SEKANI}	4.957	27	0.184	1.871	0.036
ERROR	3.826	39	0.098		

C. počet zralých semen v semeníku (log 10)

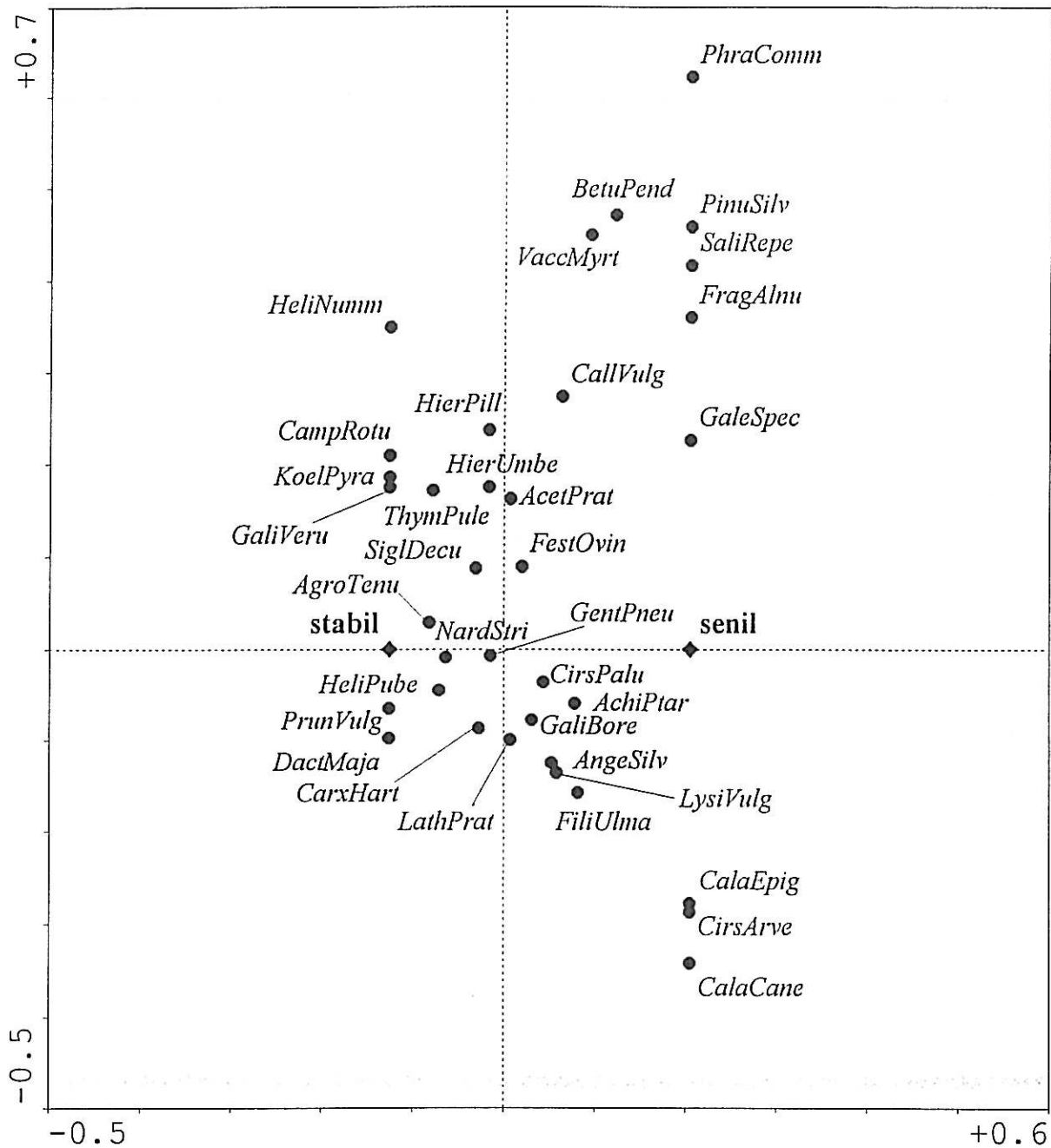
DEP VAR: LOCEV N: 72 MULTIPLE R: 0.818 SQUARED MULTIPLE R: 0.670

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
SEKANI	0.310	1	0.310	0.534	0.479
SEKANI					
*ZASAH	1.322	2	0.661	2.555	0.091
ZASAH	3.122	2	1.561	6.032	0.005
ROSTLINA					
{SEKANI}	15.995	27	0.592	2.289	0.009
ERROR	10.093	39	0.259		

D. počet neoplozených vajíček v semeníku (log 10)

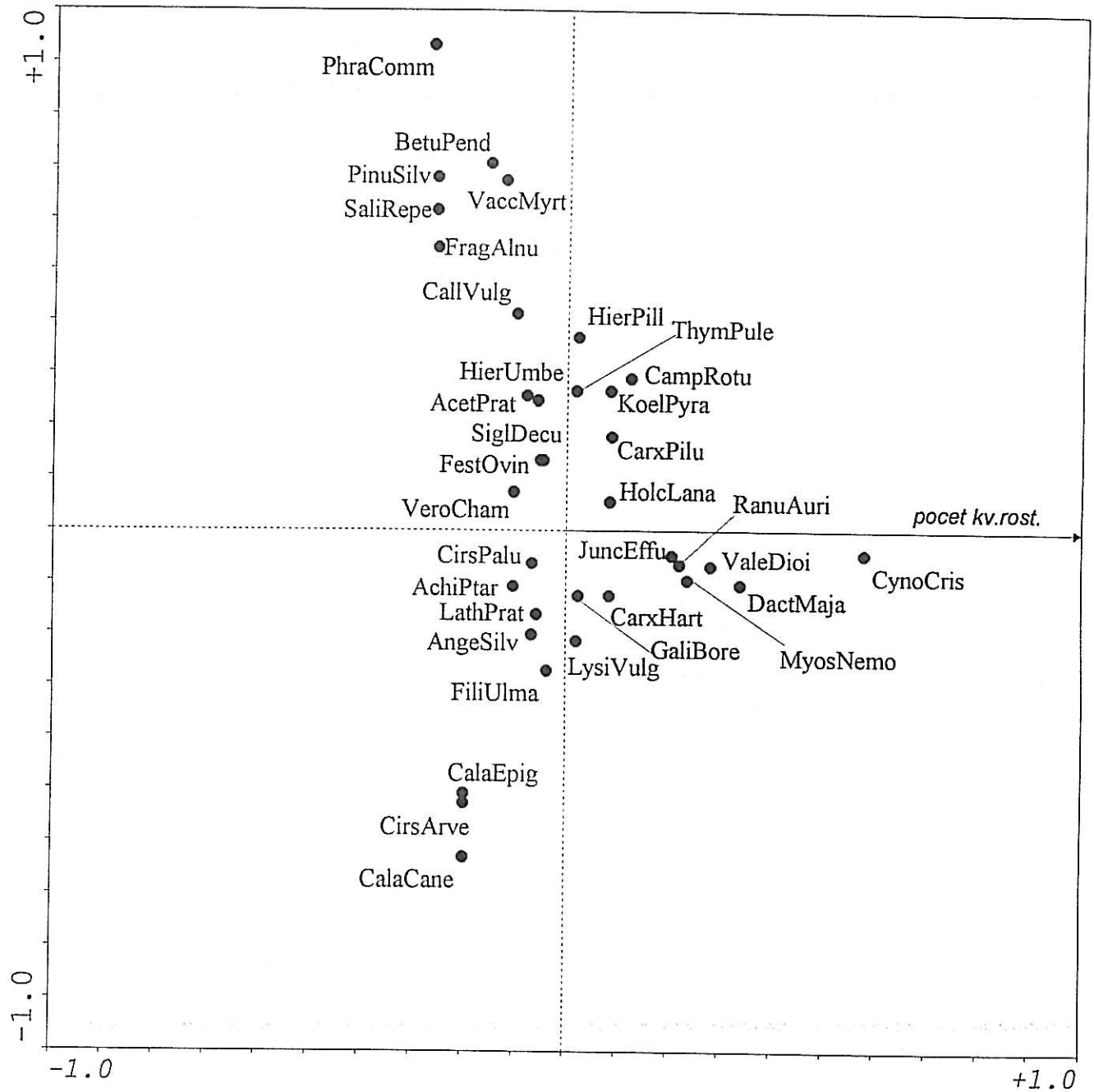
DEP VAR: LOCEM N: 72 MULTIPLE R: 0.755 SQUARED MULTIPLE R: 0.570

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
SEKANI	0.009	1	0.009	0.029	0.868
SEKANI					
*ZASAH	0.472	2	0.236	1.281	0.289
ZASAH	1.486	2	0.743	4.030	0.026
ROSTLINA					
{SEKANI}	8.189	27	0.303	1.646	0.076
ERROR	7.187	39	0.184		



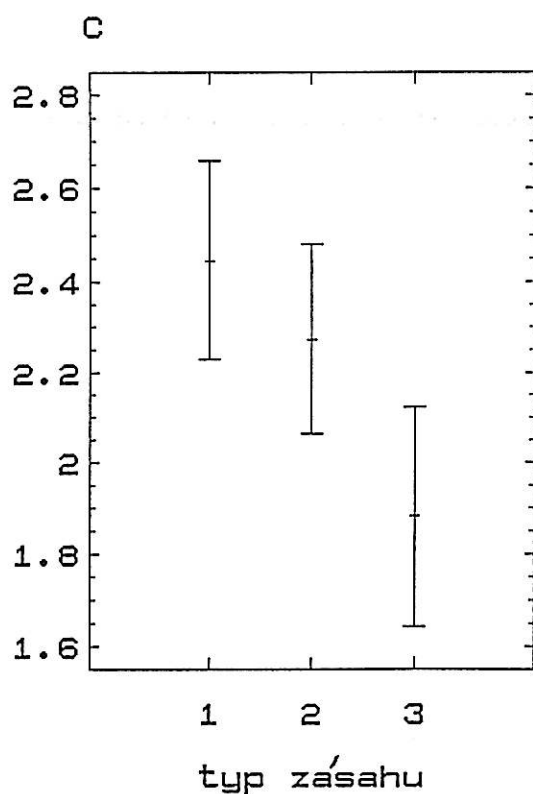
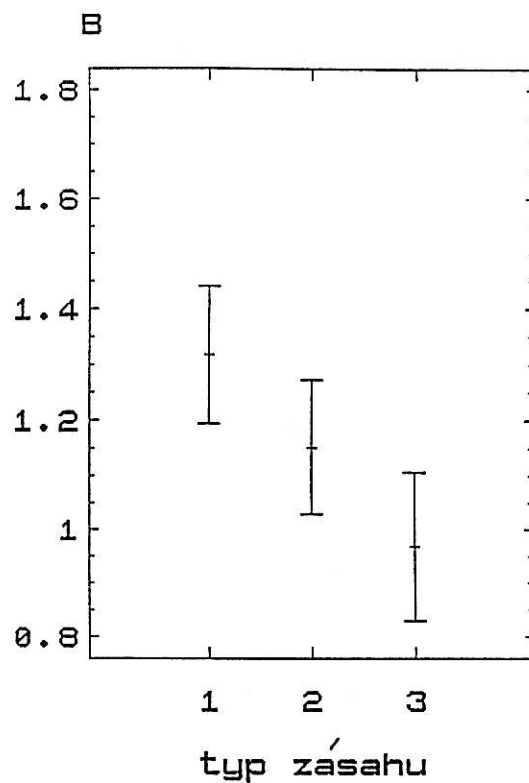
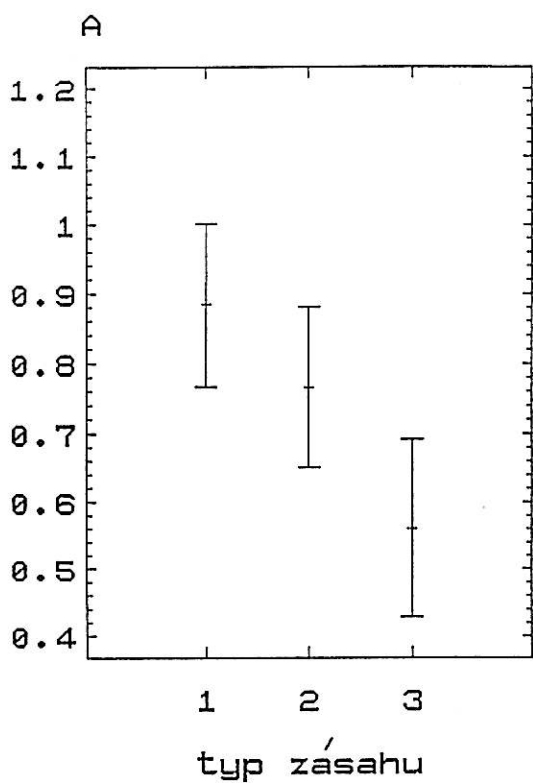
Obrázek 1.

Výsledky analýzy CCA: „biplot“ druhových složení rostlinného společenstva a lokalit s výskytem populace *Gentiana pneumonanthe*. Vztah je statisticky průkazný ($p < 0,05$). Rozložení druhů podle první osy odpovídá výskytu druhů, na lokalitách se stabilními a senilními populacemi *Gentiana pneumonanthe*. Druhá osa je neomezená.



Obrázek 2.

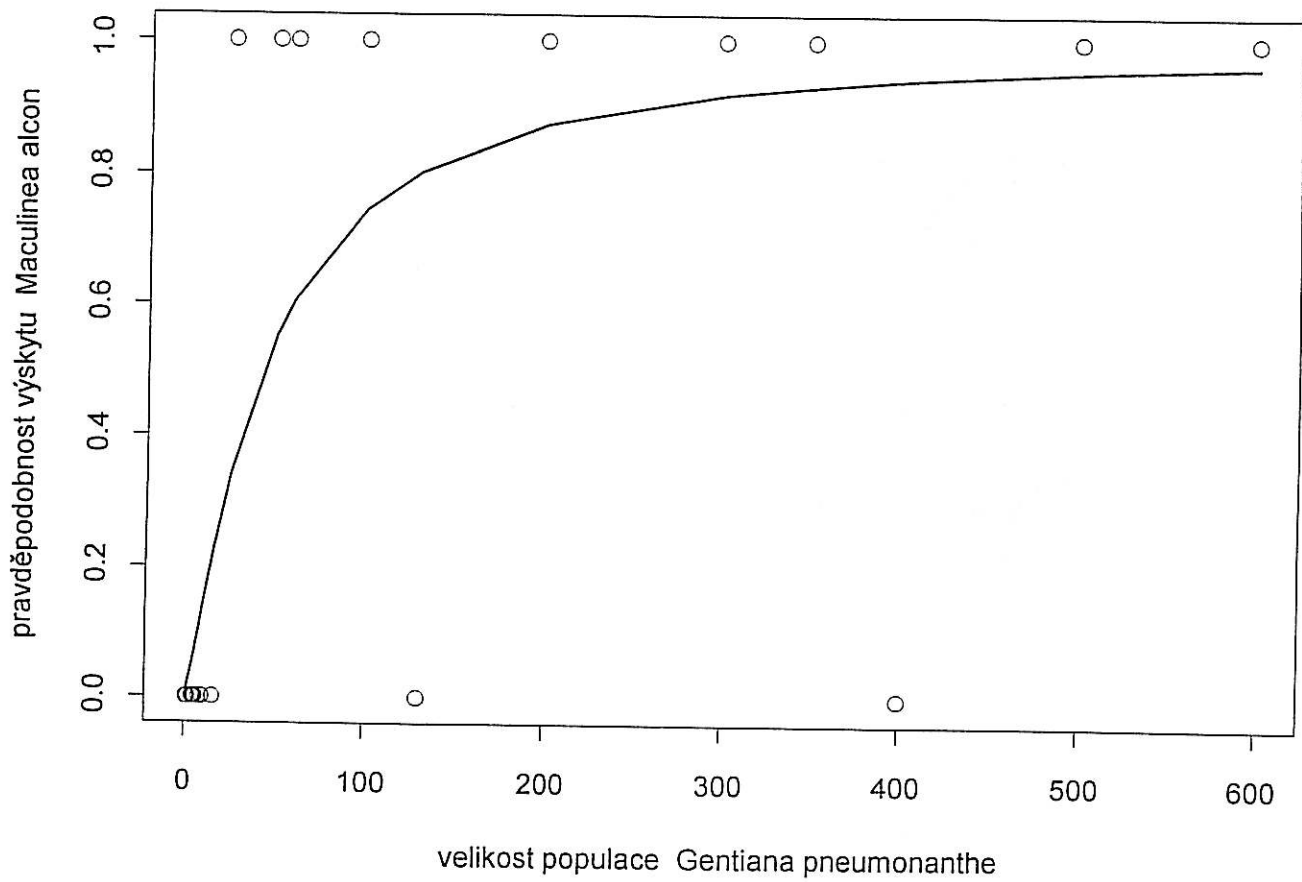
Výsledky analýzy CCA: „biplot“ druhových složení rostlinného společenstva na lokalitách a velikostí populace *Gentiana pneumonanthe* (statisticky neprůkazné). Rozložení druhů podle první osy zleva doprava odpovídá výskytu druhů na lokalitách s rostoucí početností populací *Gentiana pneumonanthe*. Druhá osa je neomezená.



Obrázek 3.
Závislost charakteristik plodnosti na typu zásahu - různé typy opylování květů *Gentiana pneumonanthe*. Zobrazeny jsou průměry a Tukeyho HSD intervaly - zásahy jsou rozdílné pokud se intervaly nepřekrývají.

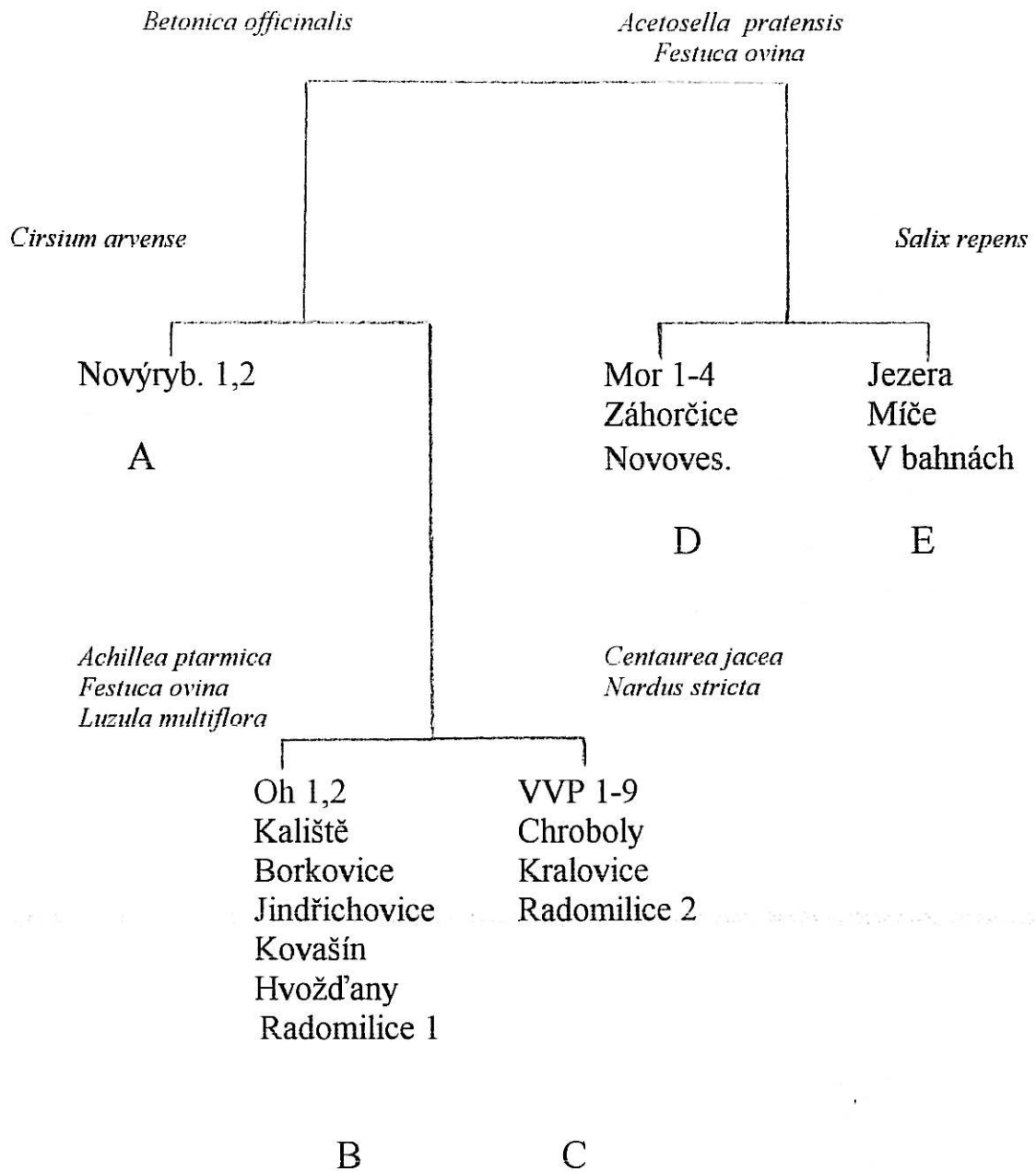
„A“ - %podíl semen z celkového počtu vajíček v semeníku (arcsin), „B“ - hmotnost celkové biomasy semen a neoplozených vajíček (log (+1)), „C“ - počet zralých semen v semeníku (log (+1)).

Typy zásahů: 1 - kontrola, 2 - květy překryté = samoopylení, 3 - květy s odstraněnými tyčinkami = cross pollination.



Obrázek 4.

Závislost pravděpodobnosti výskytu *Maculinea alcon* na velikosti populace *Gentiana pneumonanthe*. Jednotlivé body jsou jednotlivé lokality (0 - druh přítomen, 1 - druh nepřítomen). Křivka určuje odhad pravděpodobnost výskytu modráska na lokalitě s populací *Gentiana pneumonanthe* dané velikosti (Zobecněné lineární modely, lineárním prediktorem je logaritmus velikosti populace).



Obrázek 5.
Rozdělení lokalit s výskytem *Gentiana pneumonanthe* na základě druhového složení společenstev s uvedením indikačních druhů (TWINSPAN).

Fytocenologické snímky

číslo lok.	8	10	13	18
lokality	Ohrazení-1	Kaliště	Jindřichovice	Kovašín
E%	93	90	98	97
Eo%	3	10	3	13
<i>Achillea millefolium</i>	.	+	.	.
<i>Achillea ptarmica</i>	.	1	.	.
<i>Angelica sylvestris</i>	.	.	.	2
<i>Betonica officinalis</i>	1	.	2	r
<i>Cardamine pratensis</i>	.	.	.	+
<i>Centaurea jacea</i>	.	.	.	r
<i>Cerastium holosteoides</i>	.	.	.	r
<i>Cirsium palustre</i>	+	1	+	1
<i>Comarum palustre</i>	.	.	.	r
<i>Dactylorhiza majalis</i>	+	.	.	+
<i>Dianthus deltoides</i>	.	.	+	.
<i>Epilobium adenocaulon</i>	.	.	+	.
<i>Epilobium palustre</i>	.	.	+	+
<i>Eriophorum angustifolium</i>	.	.	.	+
<i>Galium boreale</i>	2	+	.	.
<i>Galium palustre</i>	.	.	.	+
<i>Galium uliginosum</i>	.	.	1	1
<i>Galium verum</i>	.	.	1	.
<i>Genista tinctoria</i>	.	.	+	.
<i>Gentiana pneumonanthe</i>	+	.	1	+
<i>Lathyrus pratensis</i>	.	.	r	+
<i>Leontodon hispidus</i>	1	.	.	.
<i>Leucanthemum vulgare</i>	r	.	+	.
<i>Linum catharticum</i>	.	.	.	+
<i>Lotus corniculatus</i>	.	+	.	.
<i>Lychnis flos-cuculi</i>	1	.	+	+
<i>Lysimachia vulgaris</i>	+	.	.	+
<i>Mentha arvensis</i>	.	.	.	+
<i>Menyanthes trifoliata</i>	.	.	.	r
<i>Myosotis palustris</i>	+	.	r	r
<i>Parnassia palustris</i>	.	.	.	+
<i>Pedicularis palustris</i>	.	.	.	+
<i>Pedicularis sylvatica</i>	.	.	.	r
<i>Plantago lanceolata</i>	+	.	+	.
<i>Potentilla erecta</i>	1	1	2	+
<i>Prunella vulgaris</i>	.	+	.	1
<i>Ranunculus acris</i>	+	.	1	1
<i>Ranunculus auricomus</i>	1	.	.	.
<i>Ranunculus flammula</i>	.	.	.	r
<i>Ranunculus nemorosus</i>	+	+	.	.
<i>Rhinanthus minor</i>	+	.	.	.
<i>Rumex acetosa</i>	.	.	+	.
<i>Rumex acetosella</i>	.	+	.	.

Sanguisorba officinalis	.	1	.	.
Scorsonera humilis	+	+	.	+
Selinum carvifolia	2	+	+	.
Senecio rivularis	.	+	.	.
Serratula tinctoria	+	.	.	.
Succisa pratensis	1	1	1	1
Trifolium aureum	.	+	.	1
Valeriana dioica	1	.	.	+
Veronica chamaedrys	.	.	1	.
Vicia cracca	.	r	.	.
Viola canina	1	.	.	.
Agrostis canina	.	.	.	+
Agrostis capillaris	.	r	2	.
Anthoxanthum odoratum	2	.	+	1
Avenula pubescens	1	.	1	+
Briza media	2	.	1	1
Carex echinata	.	.	.	+
Carex flava	+	.	.	.
Carex hartmanni	1	.	.	1
Carex leporina	+	+	+	.
Carex nigra	1	+	+	1
Carex pallescens	1	1	.	.
Carex paniculata	.	+	1	2
Carex pilulifera	1	.	+	.
Carex pulicaris	+	+	.	1
Carex vesicaria	.	+	.	.
Cynosurus cristatus	1	.	.	.
Danthonia decumbens	.	+	+	.
Deschampsia cespitosa	.	.	.	1
Festuca ovina	.	.	1	1
Festuca pratensis	.	.	+	+
Festuca rubra	2	+	1	1
Holcus lanatus	1	.	.	1
Holcus mollis	.	.	+	.
Juncus articulatus	.	.	.	1
Juncus effusus	1	.	+	+
Luzula multiflora	1	+	+	+
Molinia caerulea	2	1	2	2
Nardus stricta	2	+	2	+
Poa pratensis	.	+	+	+

Extrakční pufrA: originální pufr pro *Gentiana pneumonanthe*:

0.1 M Tris.....	120 mg
1 % glutathion, red.form.....	100 mg
10 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O.....	20 mg
5 % sacharoza.....	500 mg

rozpusit v 10 ml dest. vody, pH upravit na 8.3

B: pufr používaný pro extrakci z orchideí, pro hořce použit s úspěchem:

A + 10 mM DTE	16 mg
1 % DOWEX (Cl forma).....	100 mg
beta-Mercaptoethanol.....	10 µl

rozpusit v 10 ml dest. vody, pH upravit na 7.5

Barvení6 PGDH (Kirschner 1994)

6 Phosphogluconic acid.....	10 mg
Tris-HCl pH 8.4.....	30 ml
NADP.....	5 mg
MgCl ₂	30 mg
MTT.....	5 mg
PMS.....	1 mg

Inkubovat ve tmě při teplotě 30 st.C po dobu cca 20 min. Po té reakci přerušit a gel opláchnout vodou.

AAT (Kirschner 1994)

A: Aspartic acid.....	240 mg
Tris-HCl pH 8.4.....	40 ml
alfa-ketoglutaric acid.....	40 mg
B. Pyridoxal-5-P.....	25 mg
Fast Blue BB salt.....	50 mg
Fast Violet B.....	50 mg

Roztok A připravíme asi 15 min. před aplikací s polovinou pufru pH 8.4. Gel propláchneme ve studené vodě a poté v roztoku pufru 7. Roztok B připravíme těsně před aplikací s druhou polovinou pufru pH 8.4. Roztoky A a B smícháme a ihned ve tmě aplikujeme na gel. Meziprodukt je fotosensitivní, nutno inkubovat ve tmě při 30 st.C po dobu cca 1 hodiny. Poté roztok odstraníme, gel opláchneme a fixujeme glycerolem. Rámování je vhodné provádět ještě týž den, jinak dochází k přílišnému vymývání proužků.

PGI (Soltis & Soltis 1989, modif. Hugo de Vries Lab.)

50 mM Tris-HCl pH 8.0.....	50 ml
NADP.....	10 mg
Fructose-6-phosphate, Na ₂ -salt.....	20 mg
Glucose-6- phosphate dehydr.(NADP.....	20 units
MTT.....	10 mg
PMS.....	2 mg
MgCl ₂ .H ₂ O.....	50 mg

PGM (Soltis & Soltis 1989, modif. Hugo de Vries Lab.)

50 mM Tris-HCl pH 8.5.....	50 ml
MgCl ₂ .H ₂ O.....	50 mg
Glucose-6- phosphate Na ₂ -salt.....	50 mg
NADP.....	10 mg
Glucose-6-phosphate dehydr.(NADP).....	20 units
MTT.....	10 mg
PMS.....	2 mg

Jméno, zkratka, katalogové číslo podle IUBNC (26) a počet podjednotek polymerních izoenzymů použitých pro analýzy variability populací.

jméno enzymu	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Aspartate aminotransferase	Glucosephosphate isomerase	Phosphogluco- mutase
zkratka	6 GPDH	AAT	PGI	PGM
katalogové číslo IUBNC	1.1.1.49	2.6.1.1	5.3.1.9	5.4.2.2
počet podjednotek	2	2	2	1



foto č. 1: Samec a samice silně ohroženého monofágního modráška *Maculinea alcon*.
č.2: Vajíčka modráška *Maculinea alcon* nakladená na květ *Gentiana pneumonanthe*.



foto č.3: Rostlina *Gentiana pneumonanthe* s květy po třech typech zásahů pro pokus s různými typy opylování: růžový sáček = zakrytý květ, selfpollination; červený kroužek = odstraněny tyčinky, crossing pollination; modrý kroužek = kontrola.



foto č.4: Příklad lokality s druhovým složením rostlinného společenstva odpovídajícím charakteristice svazu *Vilion-canae* (Novoveská draha, 1996).

foto č.5: Příklad lokality s druhovým složením rostlinného společenstva odpovídajícím charakteristice svazu *Molinion* (Radomilické mokřady, 1996).



foto č.4: Příklad lokality s druhovým složením rostlinného společenstva odpovídajícím charakteristice svazu *Vilion-cantiae* (Novoveská draha, 1996).

foto č.5: Příklad lokality s druhovým složením rostlinného společenstva odpovídajícím charakteristice svazu *Molinion* (Radomilické mokřady, 1996).



foto č.6: Vývojová stádia květu protoandrického druhu *Gentiana pneumonanthe*.

Apendix 1: Zkratky použité v obrázcích 1 a 2.

AcetPrat	<i>Acetosella pratensis</i>
AchiPtarm	<i>Achillea ptarmica</i>
AngeSilv	<i>Angelica sylvestris</i>
BetuPend	<i>Betula pendula</i>
CallVulg	<i>Calluna vulgaris</i>
CampRotu	<i>Campanula rotundifolia</i>
CirsArve	<i>Cirsium arvense</i>
CirsPalu	<i>Cirsium palustre</i>
DactMaja	<i>Dactylorhiza majalis</i>
FiliUlma	<i>Filipendula ulmarina</i>
FragAlnu	<i>Frangula alnus</i>
GaleSpec	<i>Galeopsis speciosa</i>
GaliBore	<i>Galium boreale</i>
GaliVeru	<i>Galium verum</i>
GentPneu	<i>Gentiana pneumonanthe</i>
HeliNumm	<i>Helianthemum nummularium</i>
HierPill	<i>Hieracium pilosella</i>
HierUmbe	<i>Hieracium umbellatum</i>
LathPrat	<i>Lathyrus pratensis</i>
LysiVulg	<i>Lysimachia vulgaris</i>
MyosNemo	<i>Myosotis nemorosis</i>
PinuSilv	<i>Pinus sylvestris</i>
PrunVulg	<i>Prunella vulgaris</i>
RanuAuri	<i>Ranunculus auricomus</i>
SaliRepe	<i>Salix repens</i>
ThymPule	<i>Thymus pulegioides</i>
VaccMyrt	<i>Vaccinium myrtillum</i>
ValeDioi	<i>Valeriana dioica</i>
VeruCham	<i>Veronica chamaedrys</i>
AgroTenu	<i>Agrostis tenuis</i>
CalaCane	<i>Calamagrostis canescens</i>
CalaEpig	<i>Calamagrostis epigeos</i>
CarxHart	<i>Carex hartmanni</i>
CarxPilu	<i>Carex pilulifera</i>
CynoCris	<i>Cynosurus cristatus</i>
FestOvin	<i>Festuca ovina</i>
HeliPube	<i>Helianthemum pubescens</i>
HolcLana	<i>Holcus lanatus</i>
JuncEffu	<i>Juncus effusus</i>
KoelPyra	<i>Koeleria pyramidata</i>
NardStri	<i>Nardus stricta</i>
PhraComm	<i>Phragmites communis</i>
SiglDecu	<i>Danthonia decumbens</i>