

a zániku jednotlivých lokálních populací (Junker a kol. 2020).

Překotné výkyvy početnosti v populacích hnědásků bývají sváděny na parazitoidy z řádů blanokřídlí (Hymenoptera) a dvoukřídlí (Diptera). Molekulárními metodami byla sledována míra napadení parazitoidy napříč výběrem lokalit. Pravděpodobnost, že housenka bude napadena (obr. 14), je 30–40 %. Míra napadení jednotlivých hnědů se v koloniích pohybuje mezi 0–100 % (Konvičková a kol. 2024) a procento takových hnědů v kolonii koreluje s počtem hnědů v předchozím roce, což napovídá, že parazitoidy jsou příčinou lokálního propadu početnosti.

Nejsou však příčinou jedinou. Proměny vegetace na místech výskytu hnědů ukázaly na postupnou eutrofizaci, s níž jdou ruku v ruce úbytek světlomilnějších a vzestup vlhkomilnějších rostlin (Tájek a kol. 2023). To je pro hnědů, který obývá sušší partie vlhkých luk, potenciálním nebezpečím. Během dvou dekád, kdy se motýl stal

středem pozornosti, se pro většinu lokalit podařilo zajistit cílenou péči (obr. 18), sestávající z mozaikové nebo pásové seče (dnes na 172 ha, na 56 ha cílená péče chybí). Odpovídající péči lze snáze provádět na územně chráněných lokalitách. Někaké formě územní ochrany se dnes těší 185 ha lokalit, zatímco 43 ha chráněno není.

Asi nejdůležitějším výsledkem soustavného monitoringu je, že celkové počty larválních hnědů, vzor meziročním výkyvům, mírně rostou. Růst je tažen východním shlukem kolonií, tedy Slavkovským lesem a jeho okolím. Současně však meziročně klesá počet obsazených kolonií. Většina ztrát jde na vrub drobným lokalitům na periferii oblasti výskytu, mimo chráněná území. Znamená to, že cílenou péčí o chráněné lokality se podařilo zvýšit jejich „kapacitu“, ale nedaří se vracet hnědů chřastavcového do širší krajiny, potažmo rozšiřovat rozlohu jeho prostředí. To představuje potenciální hrozbu. I velké kolonie totiž mohou někdy vyhnout. Přezítí celého metapopu-

lačního systému pak závisí na rekolonizacích, o nichž rozhoduje vzájemná propojenost (konektivita), kterou si můžeme představit jako hustotu obsazených kolonií v okolí (John a kol., v recenzním řízení).

V posledních letech zahájila Správa CHKO pokusy se zvýšením konektivity metapopulace hnědů. Sestávají z výsevů živné rostliny na vhodná místa se strženým drnem a z vyhledávání dalších mikrolokalit živné rostliny, pro něž by měl být upraven režim hospodaření. Komplexní ochranu hnědů na úrovni celé krajiny, včetně klíčového zvýšení propojenosti lokalit, by měl zajistit Regionální akční plán, který začíná přípravou Agentura ochrany přírody a krajiny ČR.

Kolektiv spoluautorů: Václav John, Zdeněk Faltýnek Fric, Kamil Zimmermann, Vladimír Hula, Pavla Tájková a Přemysl Tájek

Použitá literatura uvedena na webu Živy.

Milan Vrtílek, Matej Polačik, Radim Blažek, Jakub Žák

Laboratorní ryby z vysychajících tůní 3. Přezítí sucha a diapauza

Extrémní podmínky vyžadují extrémní řešení. Pravidelné vysychání tůní anuálních halančíků představuje obrovskou výzvu. Dospělci bez vody umírají a jejich potomstvo uvnitř jikry čelí vyschnutí. O to více překvapí, že nejde o jednotlivou monofyletickou skupinu ryb. „Anuálnost“, podobně jako živorodost, vznikla v rámci řádu Cyprinodontiformes několikrát nezávisle. Dlouhodobé přezítí populací těchto ryb v dočasném habitatu je umožněno řadou evolučních přizpůsobení. Zásadní není jen schopnost vydržet kompletní vyschnutí tůně, ale i způsob nakládání s omezenou zásobou energie během několikaměsíčního období sucha. V tomto dílu si představíme především embryonální vývoj afrického anuálního halančíka tyrkysového (*Nothobranchius furzeri*, blíže předchozí díly), ale i vějířovek rodu *Austrolebias* z Jižní Ameriky.

Dlouhodobé přezítí nehostinných podmínek, jako nedostatku kyslíku (hypoxie) a sucha, umožňuje anuálním halančíkům schopnost vstoupit do klidového stadia – embryonální vývojové pauzy. Ve skutečnosti jde o unikátní kombinaci tří vývojových stadií (viz dále), kdy k tomuto zastavení může dojít. Substrát dna tůně, do něhož kladou jikry, se totiž dynamicky mění. Jednotlivé fáze stanoviště představují různé nároky na vyvíjející se embrya a vyžadují odlišná přizpůsobení. Z jemného bahna s relativně stabilní teplotou, ale nízkou dostupností kyslíku na dně tůně se postupně stává vyschlá rozpraskaná půda (obr. 1 a 2). K embryím se sice dostane vzduch, ale nastává problém s odparem. Pokud embrya suchou fází přežijí, přichází kritická závěrečná fáze období sucha,

kdy se tůň se silícími srážkami opět plní vodou. V tomto období je zásadní vyvážit setrvání v klidu vzhledem k načasování vhodné chvíle k vylíhnutí. Embrya připravená k vylíhnutí už nejsou tak odolná k obnově hypoxie a spotřebovávají víc a víc energie. Tůň může ale za několik týdnů zase vyschnout, a to dříve, než se halančíci vylíhnou, dospějí a nakladou nové jikry.

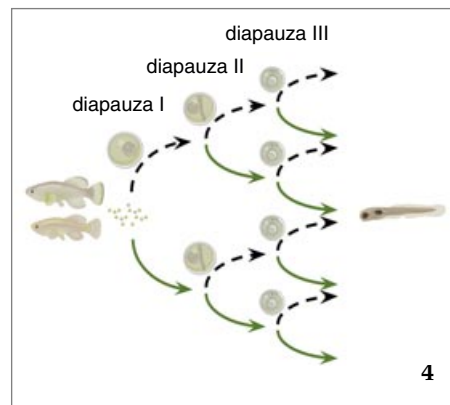
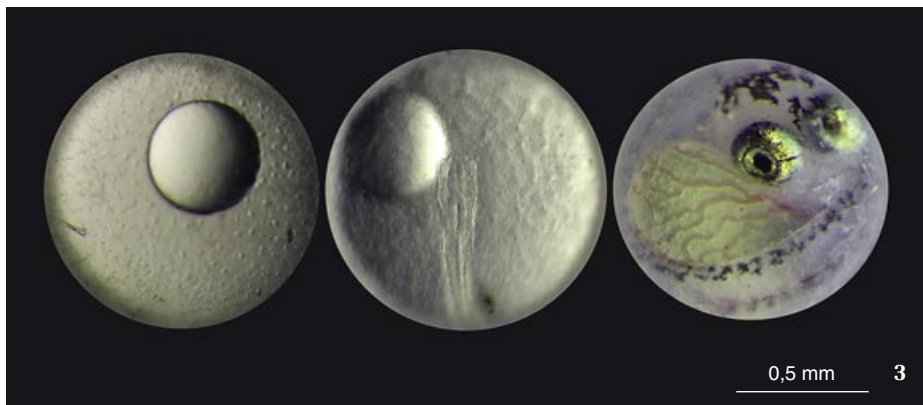
Utlumení metabolismu umožňuje embryím nejen šetřit omezenou energií, ale také vhodně načasovat kritické vývojové fáze a lépe čelit nehostinným podmínkám. Obecně byla popsána tři morfologická stadia, kdy mohou anuální halančíci vývoj zastavit. Bývají označována jako diapauza I, II a III (obr. 3). Zastavení vývoje v diapauze I je iniciováno především nedostatkem

kyslíku, jenž panuje v substrátu tůní po naklazení jiker. Jde o tzv. rozptýlenou fázi vývoje (dispersed stage), při níž se buňky embrya rovnoměrně rozprostou po povrchu žloutku. Vývoj pokračuje až ve chvíli, kdy bahno vysychá a koncentrace kyslíku v okolí embrya vzroste. V diapauze II má již embryo vytvořenou tělní osu s rudimentární hlavou, která nese základy očí, a je už patrně velice pomalu bijící srdce. Diapauza II je nejintenzivnější prozkoumaná. V tomto stadiu embrya stráví většinu vývoje, a i přes relativně pokročilou morfologii dokážou velmi výrazně utlumit energetický výdej. To je patrné právě i na zpomaleném srdečním rytmu. Diapauzu II zpravidla opouštějí se zvýšením vlhkosti a teploty na lokalitě a dokončí vývoj. V tuto chvíli mohou vstoupit do poslední diapauzy III. Nevíme zatím přesně, co ji spouští, ale zdá se, že embrya v ní čekají na další či silnější signál, kterým mohou být opakované deště. Fáze DII a DIII jsou také pravděpodobně zodpovědné za asynchronní líhnutí anuálních halančíků v akvarijních chovech.

Průchod diapauzou není pro zdárný vývoj absolutně nutný. Mohou se stále vyvíjet přímo, tedy bez klidového stadia, stejně jako jim příbuzné anuální druhy. Plasticita všech tří diapauz ale otevírá širokou možnost vývojových drah, kterými se embrya mohou vydat (v základu jde o 8 různých kombinací, a to jen v závislosti na vstoupení do diapauzy, obr. 4). Jednotlivé diapauzy tak představují vývojové křižovatky, které jsou základem pro rozmanitost vývoje anuálních halančíků. Ta je zásadní v proměnlivých a občas těžko předvídatelných podmínkách vysychajících tůní, především v oblastech s opakovaně slabými srážkami.

Zdroje rozmanitosti embryonálního vývoje anuálních halančíků

Začneme od konce embryonální fáze – líhnutí. V akvaristice jsou anuální halančíci známi jako „instantní“ ryby. Líhnou se po zalití suchého substrátu s jikrami vodou a po rozplavání vylíhnutých halančíků,



1 a 2 Sediment dna dočasné tůně anuálních halančíků rodu *Nothobranchius* v jižním Mosambiku, na kterém jsou stále patrné zbytky vody a mokré bahno (obr. 1), kdežto později už lze vidět rozpraskaný povrch vysychajícího dna (2). Patrné jsou i stopy místního dobytka, který substrát částečně promíchává.

3 Embrya anuálních halančíků mohou vstoupit do klidové fáze vývoje (diapauzy) ve třech stádiích. Diapauzu I (vlevo) charakterizují embryonální buňky volně rozprostřené po povrchu žloutku. Při diapauze II (uprostřed) má embryo patrnou tělní osa, hlavu se základy očí a somity. V diapauze III (vpravo) je již embryo víceméně připraveno k líhnutí.

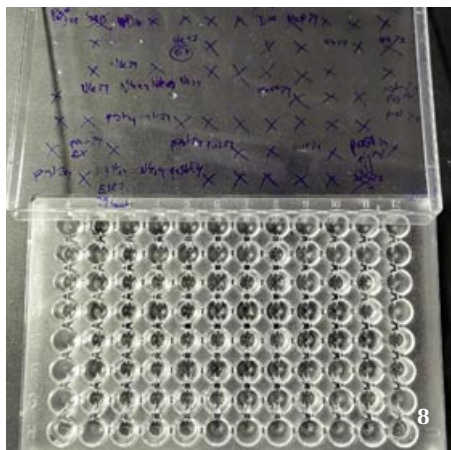
4 Násobící efekt fakultativnosti tří diapauz anuálních halančíků. Možnost vstoupit, nebo nevstoupit do diapauzy vytváří škálu kombinací zárodečného vývoje. Přerušovaná černá šipka označuje vstup do diapauzy a zelená přímý vývoj. Upraveno podle: J. P. Wourms (1972), s pomocí aplikace BioRender

5 až 7 Získávání živých embryí ze sedimentu přírodních tůň anuálních halančíků. Kopání ztvrdlého substrátu (obr. 5), jeho plavení (6) a následné prosívání a hledání zachycených jiker v sítu (7). Foto J. E. Podrabsky (obr. 7)

které trvá několik hodin, přijímají ihned potravu. Část embryí ale zůstane nevyvíhnutá. Některá se líhnou se zpožděním a jiná i přes opakované zalití zůstávají v diapauze III (embryo už je plně vyvinuto). Najdou se ovšem i taková, která neopustí ani diapauzu II. Odpovídá to ale přírodě? Líhnutí v přírodních populacích jsme studovali nepřímo stanovením stáří halančíků v konkrétních tůňích. U ryb lze věk odečíst z pravidelných přírůstků např. šupin, ploutevních paprsků nebo obratlů, podobně jako z letokruhů u stromů. V našem případě jsme využili k určení věku otolithy, drobné kuličkovité útvary tvořené uhličitánem vápenatým, uložené ve středním uchu. U anuálních halančíků z nich lze číst denní přírůstky, a to především prvních

několik týdnů po vylíhnutí, kdy tyto ryby rostou opravdu rychle (více v příštím dílu). Z našeho výzkumu vyplynulo, že v přírodě danou populaci tvoří stejně staří jedinci, vylíhnutí víceméně synchronně (v řádu 1–3 dní) po zaplavení tůně (Polačik a kol. 2011, Reichard a kol. 2017). Kolik embryí ale zůstává v zaplaveném sedimentu nevyvíhnutých, nevíme.

Embryonální vývoj anuálních halančíků byl donedávna zkoumán převážně v laboratoři. Průlomem ve studiu embryí v přírodě se stala optimalizace metody plavení substrátu, jež umožnila poměrně spolehlivě získat vzorek jiker ze suchého nebo bahnitého sedimentu. Základem je rozpouštění hrud suchého substrátu po dobu několika hodin v nádobě s vodou. Sediment tůň tvoří tmavá těžká vertisolová naplaveninová půda, která se zcela rozpustí na jemné bahno. Toto bahno je natolik kapalné, že ho lze v dávkách přelévát přes síto, v němž jsou následně zachyceny jikry spolu s drobnými zbytky sedimentu (obr. 5–7). Výsledky těchto výzkumů



v Mosambiku, Tanzanii, Zambii (výskyt rodu *Nothobranchius*) a Uruguayi (věřovky rodu *Austrolebias*) dokládají, že embryonální vývoj probíhá v populacích anuálních halančíků synchronně, bez ohledu na druhovou příslušnost a kontinent. V přírodě koresponduje setrvání v jednotlivých diapauzách s uvedeným hrubým schématem přeměny dna tůně. Experimentální manipulace, ať už jiker z přírody vykopaných, nebo vytřených v zajetí a uložených do sedimentu přirozené tůně, ukazují na citlivost embrya k podmínkám prostředí. S příchodem dešťů na konci období sucha dochází k opouštění diapauzy II a synchronita vývoje se vytrácí – jednotlivá embrya se vydávají na různé vývojové dráhy. Příčiny této různorodosti přesně neznáme. Může jimi být mikroklima v okolí konkrétní jikry, ale i jiné vlivy popsané níže, jež byly zatím studované pouze v kontrolovaných laboratorních podmínkách.

Variabilita se zdá být charakteristickým znakem embryonálního vývoje anuálních halančíků, a to i ve společných laboratorních podmínkách. Náš výzkum je zaměřen především na diapauzu II, ve které embrya obvykle stráví několik měsíců období sucha. Různorodost vstupu a trvání diapauzy umožňuje testovat zdroje a vlivy, které ji regulují. V následujícím textu budeme pro jednoduchost označovat embrya vstupující do diapauzy II jako diapauzující a ta, která se diapauze II vyhnou, jako přímo se vyvíjející.

Do jaké míry je sklon k diapauze vrozený? Z hlediska už zmíněné adaptivnosti určité vývojové dráhy nás zajímal rozdíl mezi populacemi *N. furzeri* a *N. kadlecii* z regionů s odlišnými úhrny a pravidelností srážek. Na vzorku 8 populací napříč srážkovým gradientem s přibližně 800 embryi jsme sledovali, zda za daných laboratorních podmínek spíše diapauzují, nebo se vyvíjejí přímo. Populace ze sušších oblastí měly v kontrolovaných podmínkách větší sklon k přímému vývoji a populace z vlhkých regionů spíše diapauzují (Polačik a kol. 2018). To může souviset s nepravděpodobnějšími srážkami v suchých regionech a vyschnutím tůně ještě v rámci období dešťů. Tyto výsledky naznačují, že alespoň částečně je podíl diapauzujících embryí v snůškách anuálních halančíků daný geneticky.

Embryonální vývoj anuálních halančíků je citlivý k řadě faktorů prostředí – hlavními jsou kyslík, vlhkost, teplota. V rámci

8 až 10 Různé způsoby inkubace pro studium vývoje a dlouhodobé uchování embryí. Inkubační komůrková miska (obr. 8) je vhodná pro sledování jednotlivých embryí v manipulovaných podmínkách (např. při zvýšené teplotě). Před líhnutím ale nutně musejí embrya projít suchou fází – inkubací na vlhčeném filtračním papíře (9). Dlouhodobě (měsíce až roky) uchováváme jikry ve vlhké rašelině při snížené teplotě 18 °C (10). Snímky M. Vrtílka, není-li uvedeno jinak

jedné populace dochází k výraznému rozrůznění vývoje, které může mít několik zdrojů. Může jít o drobné odlišnosti v podmínkách snůšek i jednotlivých embryí, genetické a negenetické vrozené vlivy. Když si vezmeme např. vliv teploty na embrya intenzivně studovaného druhu *N. furzeri*, relativně uniformního vývoje lze dosáhnout nízkou (18–22 °C) nebo vyšší teplotou (28–30 °C). Při nižší teplotě nastává pravděpodobněji diapauza, vyšší teplota naopak stimuluje přímý vývoj. Pokusy napříč laboratoři potvrzují, že jednotlivá embrya reagují na změny teploty s různou citlivostí. Při střední teplotě (okolo 25–26 °C) lze v průměru pozorovat nejvyšší míru rozrůznění ve vstupu do diapauzy. Při oddělené inkubaci snůšek různých rodičovských kombinací se ukazuje, že za vývojovou dráhu jsou v daných podmínkách zodpovědné z velké části samice (Polačik a kol. 2017). Ovlivnění matkou je nejspíše negenetické podstaty, protože s tím, jak samice stárnou, zvyšuje se postupně i podíl diapauzujících potomků v jejich snůškách. Výzkum amerických kolegů poukazuje na možný význam regulační molekuly RNA (miRNA430, Romney a Podrabsky 2018). Složení jikry je ale komplexní a diapauzu mohou ovlivňovat i další látky, jako např. vitamín D. Vývoj konkrétního embrya závisí tedy nejen na okolních podmínkách, ale i na investici od matky, a potenciálně i na citlivosti embrya. Tyto signály mohou umožnit samici manipulaci s vývojem potomstva a zajištění přežití alespoň části snůšky (bet hedging – sázka na jistotu) v případě, že se na okolí nedá spolehnout.

Za laboratorních podmínek se dá pouze přibližně odhadnout vývojovou dráhu embrya. Mimo opravdu extrémní podmínky, které se pojí i s vývojovými defekty a nižším přežíváním, lze vždy zaznamenat alespoň nějakou variabilitu. V přírodě přirozená rozmanitost zajišťující přežití po-

tomstva však komplikuje cílený vědecký výzkum spouštěčů diapauzy. Dráhu vývoje embrya můžeme zjistit třeba analýzou genové exprese (např. genů spojených s metabolismem somatotropní osou). Čelíme tak ale problému podobnému známé Schrödingrově kočce – abychom zjistili budoucí stav embrya, musíme ho usmrtit. Dostupnost genetických linií produkujících uniformně buď diapauzující, nebo přímo se vyvíjející potomstvo by tento problém zcela vyřešila. Naše dosud nepublikovaná data ale ukazují, že cílená selekce samic na uniformní snůšky ani po čtyřech generacích odstraněním fenotypové variability (kanalizací) neskončí. Produkce variabilních snůšek tak bude pravděpodobně výrazně pod vlivem negenetických faktorů bránící kanalizaci tohoto znaku.

Jedním z nejvýznamnějších důvodů pro výzkum diapauzy halančíků je její nečekaná spojitost se stárnutím. I když intenzivní bádání stále probíhá, průchod embryonální diapauzou sdílí řadu buněčných mechanismů se zmlazovacími procesy nebo zpomalením stárnutí (Hu a kol. 2020). V našem srovnání přímo se vyvíjejících a diapauzujících embryí se po diapauze líhly ryby větší, ale rostly pomaleji než ty, které se vyvíjely přímo. Přímý vývoj se ukázal v určitém smyslu překotným, protože samci se skutečně dožívali kratšího věku (Polačik a kol. 2014).

Shrnutí

Možnost dlouhodobé inkubace anuálních halančíků (obr. 8–10) a manipulace jejího průběhu dovolují udržení chovných linií bez nutnosti dlouhodobě chovat dospělé ryby, synchronizaci vývoje odlišných snůšek, líhnutí různých starých ryb a obecně plánování pokusů, které by byly velice obtížné až neproveditelné s klasickými rybími modely, jako jsou dánío pruhované (*Danio rerio*) nebo živorodka duhová (*Poecilia reticulata*). Z tohoto pohledu představují anuální halančíci ideální kandidáty na laboratorní ryby – mohou doslova čekat na plánovaný experiment. Evoluce anuální strategie a zpomalení metabolismu představuje navíc fascinující příklad konvergentní adaptace k podobným selekčním tlakům jak z hlediska fyziologie, tak vývojové a buněčné biologie. V příštím dílu se naopak budeme zabývat zrychlenou životní historií těchto ryb po vylíhnutí a jejich stárnutím.

Použitá literatura uvedena na webu Živý.