

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
BIOLOGICKÁ FAKULTA



Bakalářská diplomová práce

**Metodické přístupy ke studiu evoluční  
historie reliktních hadcových populací  
*Knautia arvensis***

Filip Kolář  
2007

školitel: Ing. Milan Štech, PhD.  
konzultant: RNDr. Jan Suda, PhD.



Kolář F. (2005): Metodické přístupy ke studiu evoluční historie reliktních hadcových populací *Knautia arvensis* [Study of evolutionary history of relict serpentine populations of *Knautia arvensis* – methodical approaches, Bc. Thesis; in Czech]. – 58 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

A review of three major topics connected with the investigation of evolutionary history of relict serpentine populations of *Knautia arvensis* (L.) COULTER is presented: (1) specific microevolutionary processes in serpentine areas (2) biological characteristics of the model group studied (*K. arvensis*) (3) advantages, limitations and possible practical use of methods proposed for elucidation of evolutionary history of *K. arvensis*. Some preliminary results are employed to demonstrate benefits of above discussed methods for the study.

Tato práce byla financována z grantu GAAV B601110627 a studentské grantové agentury BF JU SGA2006/007

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, pouze s použitím citované literatury

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

.....

V Českých Budějovicích, 14. května 2005

## **Poděkování**

*Můj velký dík patří především mému školiteli Milanovi Štechovi už jen za ochotu pustit se do celého zcela nepoloparazitického chrastavcového problému, ale také za pomoc v terénu, cenné rady a připomínky, trpělivost a spoustu času, který mi obětoval. Mému konzultantovi Honzovi Sudovi jsem vděčný za spoustu užitečných rad, polyploidní nadšení a taky vydatnou materiální podporu v podobě všemožných publikovaných i nepublikovaných literárních pramenů.*

*Evě Rejzkové a Tomášovi Férovi jsem zavázán za uvedení do tajů molekulárních technik v jejich útulné a stále košaticí pražské DNA laboratoři. Pavlovi Trávníčkovi vděčím za uvedení do tajů průtokové cytometrie i za pomoc během analýz v přívětivě zabydlené průhonické FCM laboratoři.*

*Janu Štěpánkovi a Zdeňku Kaplanovi děkuji za cenné rady a nápady týkající se chrastavců všeho druhu.*

*Veliký dík za logistickou i morální podporu nejen během psaní práce patří i celé mojí rodině.*

*Za pomoc v terénu i u počítače, užitečné rady a nápady vděčím také Petrovi Kouteckému, Majdě Kubešové a Jakubovi Těšitelovi. Jakubovi jsem děkuji i za vydatnou pomoc s geometrickou morfometrií. Aničce Matoušů děkuji za přinesení první cytotypově smíšené populace v praktickém a esteticky hodnotném balení.*

*Mnohým dalším kamarádům vděčím za to, že se o chrastavce moc nezajímali a udrželi mě tak nejen v době psaní bakalářky při ± zdravém rozumu.*

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Specifika hadcového podkladu</b> .....	<b>2</b>
2.1 O hadci .....	2
2.2 Rostliny a hadec .....	2
<b>3. Mikroevoluce na hadci</b> .....	<b>3</b>
3.1 Hadcová tolerance .....	3
3.1.1 Mechanizmy hadcové tolerance .....	4
3.1.2 Vznik hadcové tolerance .....	5
3.1.3 Hadcová „past“? .....	6
3.2 Speciace na hadci .....	7
3.2.1 Hadce a fytogeografie .....	7
3.2.2 Hadcové endemity .....	8
3.2.2.1 Serpentinofyty a sympatrická speciace na hadcích .....	9
3.2.2.2 Serepentinikolní relikty .....	11
3.3 Případová studie <i>Streptanthus glandulosus</i> .....	11
<b>4. Modelová skupina <i>Knautia arvensis</i></b> .....	<b>14</b>
4.1 Rod <i>Knautia</i> .....	14
4.1.1 Způsoby reprodukce a šíření .....	15
4.1.1.1 Reprodukční systém .....	15
4.1.1.2 Gynodiecie .....	16
4.1.1.3 Rozšiřování plodů .....	16
4.1.2 Možnosti hybridizace .....	17
4.1.3 Karyologie .....	17
4.1.4 Evoluce v rámci sekce <i>Trichera</i> .....	18
4.2 Charakteristika skupiny <i>K. arvensis</i> agg. ....	20
4.3 <i>Knautia arvensis</i> v České republice .....	21
4.3.1 Dva cytotypy, čtyři poddruhy .....	22
4.3.2 Krkonošský endemit .....	23
4.3.3 Reliktní hadcové populace .....	24
4.3.4 Evoluční hypotéza .....	25
4.3.5 Hadcová tolerance u <i>K. arvensis</i> .....	26
4.4 Otázky .....	26
<b>5. Metody</b> .....	<b>27</b>
5.1 Morfologické přístupy .....	28
5.1.1 Geometrická morfometrie .....	28
5.1.2 Morfologie v případě <i>Knautia</i> .....	29
5.1.2.1 Pilotní morfologický průzkum – obrysová analýza zákrovních listů .....	29
5.1.2.2 Diskuze k morfologickým znakům <i>K. arvensis</i> .....	30
5.2 Průtoková cytometrie .....	34
5.2.1 Stanovení absolutní velikosti genomu .....	35
5.2.1.1 Studium vnitrodruhové variability v obsahu DNA .....	36
5.2.2 Stanovení stupně ploidie .....	37
5.2.3 FCM a karyologie .....	38
5.2.4 Průtoková cytometrie v případě <i>Knautia</i> .....	38
5.2.5 Karyologie v případě <i>Knautia</i> .....	40
5.3 AFLP .....	41

5.3.1	Limitace AFLP .....	42
5.3.2	Využití AFLP .....	43
5.4	Sekvenování nekódujících úseků DNA .....	44
5.4.1	Chloroplastová DNA .....	44
5.4.1.1	Limitace chloroplastových markerů .....	44
5.4.1.2	Využití chloroplastových markerů .....	45
5.4.2	Jaderná DNA .....	47
5.4.2.1	Výhody a limitace využití ITS .....	48
5.4.2.2	<i>Low copy</i> alternativa .....	49
<b>6.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>50</b>
	<b>Literatura .....</b>	<b>52</b>
	<b>Příloha .....</b>	<b>58</b>

# 1. Úvod

Svérázná hadcová flóra a vegetace poutala pozornost botaniků již odedávna. Hadcový substrát díky svým chemickým a fyzikálním vlastnostem představuje stresující a značně selektivní prostředí pro život rostlin (Kruckeberg 1986). Pro řadu druhů je hadcové prostředí zcela neobyvatelné, avšak známe i rostliny vázané svým výskytem výhradně na hadcové lokality. Často velmi pozoruhodné ekologické a geografické vazby těchto druhů pak vyvolávají řadu evolučně biologických otázek v širokém záběru od problémů vzniku hadcové tolerance až po otázky populačně-biologické a fylogeografické.

Také české hadce hostí několik pozoruhodných rostlinných taxonů, včetně některých význačných českých endemitů (např. *Cerastium alsinifolium*, *Minuartia smejkalii*, Krahulcová & Štěpánková 1998). Jejich evoluční historie je téměř neznámá, předložené hypotézy (pokud jsou vůbec formulovány) se opírají nanejvýše o některá sice cenná, avšak experimentálně slabě podložená pozorování (např. *Potentilla crantzi*, Soják 1960). Přes vcelku intenzivní výzkum v minulosti také zůstává neobjasněná celá řada otázek ohledně jedné z nejvýznamnějších součástí naší hadcové flóry – reliktních hadcových populací chrastavce rolního, *Knautia arvensis*. Kromě vlivu hadců se v evoluci těchto populací jistě uplatňovaly i procesy charakteristické pro celý polymorfní polyploidní komplex *Knautia arvensis* agg., především polyploidizace, hybridizace a alopatrická speciace (Štěpánek 1982). Důsledkem součinnosti těchto (a zřejmě i některých dalších) procesů je velmi pozoruhodná struktura morfologické, ekologické a karyologické variability vykazující jasné geograficky a edaficky podmíněné vazby.

Cílem studie, jež bude řešena v rámci navazující magisterské práce, je nahlédnout do spletené evoluční historie reliktních populací, zjistit příčiny současné geografické distribuce cytotypů a genetických linií a pokusit se o odhalení mikroevolučních mechanismů, které mohly hrát roli při vzniku a diferenciaci těchto populací. Evoluční studie s takto širokým záběrem se však neobejde bez důkladného základu znalostí o modelovém taxonu a také metodách, které budou pro řešení konkrétních otázek využívány.

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce je seznámit se s problematikou evoluce na hadcových stanovištích, biologií okruhu *K. arvensis* agg. a vybranými metodickými přístupy a pokusit se o shrnutí poznatků z těchto tří oblastí formou literární *review*. Dílčí cíle jsou následující:

- zpracování známých poznatků o mikroevolučních procesech, které se mohou uplatňovat v souvislosti se specifickými podmínkami hadcových stanovišť
- shrnutí známých poznatků z biologie modelového druhu *Knautia arvensis*
- nastínění konkrétních otázek a hypotéz týkajících se evoluční historie reliktních hadcových populací *K. arvensis*
- seznámení se s metodickými postupy, které budou využity k řešení těchto otázek v rámci magisterské práce a diskuze jejich výhod, limitací a využití a zhodnocení přínosu dosud použitých metod na základě předběžných výsledků

## 2. Specifika hadcového podkladu

### 2.1 O hadci

Hadce (serpentinity<sup>\*</sup>) vznikly přeměnou bazických a ultrabazických vyvřelých hornin. Těmito matečnými vyvřelinami jsou především horniny ze skupiny peridotitu obsahující olivín, rhombický pyroxen, monoklinický pyroxen apod. Různorodost bazického peridotitického magmatu je příčinou značné variability hadců. Během procesu, kdy hadce vznikají (tzv. serpentinizace), se uplatňují vysoké teploty (nepřevyšující však 700°C), zvýšený tlak a je také potřeba dostatek vody. V průběhu serpentinizace dochází k nahrazování minerálů původních minerály serpentinové skupiny –  $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$ . Kromě serpentinu však mohou vznikat i další nerosty jako např. magnezit ( $MgCO_3$ ), mastek, brucit a magnetit ( $Fe_3O_4$ ) (Čech et al. 2002, Proctor & Woodell 1975).

Z hlediska chemického je hadec především vodnatý křemičitan železnatohořečnatý ( $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$ ). Křemík a hořčík jsou obvykle zastoupeny každý 30–40% a železo 7–14%. Ve stopovém množství je také přítomna řada těžkých kovů, např. nikl, chrom či kobalt. Naopak v malé míře jsou obsaženy vápenaté, draselné a sodné ionty a fosforečnany.

Chemická reakce hadcových půd je mírně alkalická. Tyto půdy rychle propouštějí vodu, jsou suché a tak špatně vedou teplo. Povrchová vrstvička půdy se může značně přehřívat nebo podchlazovat a dochází tak k výrazným teplotním změnám i mezi dnem a nocí (Čech et al. 2002, Unar 1996).

### 2.2 Rostliny a hadec

Zvláštní vlastnosti hadcové horniny a z ní vznikajících půd značně ovlivňují životní podmínky rostlin. Nelze říci, že zde hraje roli jediný hlavní (například chemický) faktor, důležitých činitelů je větší počet a jejich vliv se sčítá. Termín „hadcový syndrom“, často užívaný v této souvislosti, poukazuje právě na kumulativní účinek jednotlivých komponent, na něž se rostlina musí adaptovat (Brady et al. 2005)

Hlavními složkami hadcového syndromu jsou následující chemické, fyzikální a geografické faktory (Brady et al 2005, Proctor & Woodell 1975):

1) Chemie hadcového podkladu a hadcových půd:

- **nízký poměr Ca:Mg iontů** na rozdíl od běžných půd nepřesahující hodnotu 1 (většinou však nižší 0,4)
- **vysoký podíl těžkých kovů**, zejména Ni, Cr, Co a Fe
- **nedostatek základních živin** (zejména N, P a K a také Ca)

2) Fyzikální vlastnosti hadcového podkladu a hadcových půd

- **velké teplotní výkyvy** – temná barva matečné horniny v kombinaci s jejich špatnou teplotní vodivostí zapříčiňuje vysoké kolísání teplot v povrchových vrstvách půdy (např. na Mohelenské hadcové stepi byly zaznamenány povrchové půdní teploty až o 18-24°C vyšší oproti okolnímu vzduchu, Hrudíčka 1937)

---

\* Užívání slova serpentinit (hadec) je v biologické literatuře poněkud širší, než jak ho vymezuje geologická definice. Většinou je vztahován na celou škálu různých druhů hornin, jimž je společný vysoký obsah Fe a Mg (v anglické literatuře souhrnně označovaných termínem *ultramafic*), a nikoliv pouze na horniny tvořené minerály serpentinové řady (Proctor & Woodell 1975). Širšího pojetí tohoto slova se budeme pro jednoduchost držet i v následujícím textu.



- **výrazná geomorfologie** – hadcová hornina často obtížně větrá a tak jsou hadcové oblasti charakteristické vystupujícími hřbety, rozervanými skalisky či prudkými kamenitými svahy; eroze naopak výrazně ovlivňuje hloubku a kvalitu půdního profilu
- **velké sucho** – mělké skeletovité půdy a rozpraskaná matečná hornina snadno propouštějí vodu; hrubá textura a nízký podíl organického materiálu navíc snižují retenční schopnosti

3) Silně **diskontinuální rozšíření** hadcových těles je příčinou v zásadě ostrovního charakteru hadcových lokalit (Kruckeberg 1991).

Na různých místech se však tyto charakteristiky uplatňují v různě silné míře. I z našeho území známe řadu hadcových lokalit (zejména těch drobných), kde se vliv hadcového substrátu vůbec neprojevuje (Novák 1928). Faktory jako oslunění, hloubka a stabilita půdního profilu, sklon svahu či možnost přísunu živin hrají klíčovou roli v síle stresového působení hadcového syndromu na rostliny (Kruckeberg 1984).

### 3. Mikroevoluce na hadci

Po dlouhou dobu byly průzkumy věnované svérázné hadcové flóře a vegetaci vesměs pouze popisně zaměřené. Autoři těchto průzkumů si všímali zejména zvláštních vegetačních typů, prudce kontrastujících s okolní vegetací, a také pozoruhodné koncentrace vzácných floristických prvků, často reliktního či endemitního charakteru a popisovali je (Kruckeberg 1984, Proctor & Woodell 1975). S postupem času se výzkumníci začali také ptát *proč* se taková flóra a vegetace na hadcích může vyskytovat. K odpovědi na tuto otázku je možné přistupovat dvěma různými způsoby. První přístup se soustřeďuje na speciální mechanismy, které umožňují rostlinám překonávat stres vyvolávaný zvláštními chemickými a fyzikálními vlastnostmi hadcového substrátu, popisuje fyziologické principy fungování a genetického řízení těchto mechanismů. Druhý přístup na zvláštní fyzikálně-chemické (ale i geografické) vlastnosti hadců pohlíží hlavně z úhlu jakéhosi „potenciálu“, který mohou představovat pro evoluci rostlin. Jaká může být role, kterou hrají v evolučních procesech šíření a speciace hadcových rostlin?

Mikroevoluční procesy, které formují hadcové druhy a rasy se v obecných principech nijak neodlišují od obecně známých schémat rostlinné evoluce. Edafický faktor hraje spíše úlohu základního stimulu, spouštějícího tyto procesy (Kruckeberg 1986). V následujícím přehledu se proto nebudeme soustřeďovat na popisování základních principů a mechanismů rostlinné evoluce (např. Briggs & Walters 2001), ale spíše se pokusíme nalézt různé způsoby, kterými mohou zvláštní vlastnosti hadců ovlivňovat průběh a projevy obecných mikroevolučních procesů.

#### 3.1 Hadcová tolerance

Většina rostlinných druhů není schopná na hadcových půdách úspěšně růst a přežít. Nicméně, u jisté menšiny rostlin se vyvinuly fyziologické a vývojové mechanismy, které jim umožňují přežít a dále se úspěšně rozmnožovat (Pepper & Norwood 2001). Konkrétní mechanismy hadcové tolerance jsou stále z velké části neznámé, je však velmi pravděpodobné, že se jedná o komplexní soubor několika souběžně působících faktorů (Proctor & Woodell 1975).

### 3.1.1 Mechanizmy hadcové tolerance

#### Obsah Ca a Mg iontů

Nízký obsah vápenatých iontů v hadcových půdách a jejich vztah s ionty hořečnatými je pravděpodobně nejdůležitější příčinou neobyvatelnosti hadcových půd pro většinu rostlin. (Brady et al. 2005). Proctor & Woodell (1975) uvádějí průměrné hodnoty dostupného vápníku pouze mezi 0,2 a 4 mEq/100g. Příjem nízce zastoupených Ca iontů ještě ztěžuje přítomnost Mg, které snižuje jeho dostupnost pro rostliny. Chemické charakteristiky hadcové půdy je proto vhodnější vyjadřovat formou poměru těchto dvou iontů. Zatímco pro optimální růst většiny rostlin musí být poměr Ca:Mg alespoň 1, na hadcových půdách toto číslo obvykle nepřekračuje hodnotu 0,4 (Proctor & Woodell 1975).

Na vztah vápníku a hořčíku se však můžeme dívat i z jiného úhlu. Co když je primární příčinou neúživnosti právě vysoký obsah Mg iontů, který řadě rostlin znemožňuje přístup k Ca i dalším prvkům (např. Al, Fe, B, Mn, P a N)? Jednalo by se tak vlastně o toxické účinky hořečnatých iontů na rostliny (Brady et al. 2005).

Obě z výše zmiňovaných možností však mohou vést ke stejnému výsledku co se týče poměru Ca a Mg iontů obsažených v rostlinných pletivech. Z řady studií vyplynulo, že pokud ve shodných podmínkách na serpentinitovém substrátu pěstujeme obě edafické rasy, hadcový typ dokáže přijímat méně Mg a více Ca ve srovnání se svým nehadcovým protějškem (Brady et al 2005). Zatímco koncentrace Ca i Mg byla u nehadcových druhů kalifornských keřů v podstatě shodná s obsahem těchto prvků v (hadcové) půdě, jejich hadcové kongenery dokázaly udržovat signifikantně vyšší hodnoty Ca:Mg ve svých listech (O'Dell et al 2006). Hlavními fyziologickými příčinami těchto rozdílů budou pravděpodobně odlišné vlastnosti membránových iontových přenašečů (selektivní transport Ca a/nebo vylučování Mg) a také odlišné chelatační schopnosti u jednotlivých ras (Brady et al. 2005, O'Dell et al 2006).



Obr. 1 – Reakce hadcové (pravá) a nehadcové (levá část květináče) rasy *Phacelia californica* na obsah Ca iontů a živin v hadcovém substrátu. A: přidáno 2 tuny/akr sádry ( $\text{Ca}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), B: přidáno 4 tuny/akr sádry, C: nezměněný hadcový substrát, D. hadec + NPK-hnojivo (Kruckeberg 1954)

#### Obsah těžkých kovů

Těžké kovy přítomné ve zvýšené míře v hadcových půdách (zejm. Ni a Cr) působí na většinu rostlin toxicky (Proctor & Woodell 1975). Například zvýšená koncentrace niklu může inhibovat dělení buněk v kořenových meristémeh u netolerantních rostlin, má negativní vliv na fotosyntézu, respiraci a regulaci transpirace (Nyberg Berglund et al. 2003). Sporná je však otázka, jak důležitou pozici zastává tolerance k těžkým kovům v celé problematice hadcové tolerance. Někteří autoři považují obsah těžkých kovů za hlavní příčinu neobyvatelnosti hadcových půd, jiní ho naopak pomíjejí. Například jinak velmi obsáhlá review Brady et al. (2005) vliv těžkých kovů v souvislosti s vlastní hadcovou tolerancí téměř nezmiňuje. Před kladením důrazu na účinek jediného faktoru – působení těžkých kovů varuje např. Slingsby (1988), klíčový význam jim nepřikládá ani experimentální studie O'Dell et al. (2006). Na

druhou stranu, skandinávské *Cerastium alpinum* vykazovalo průkazný rozdíl v toleranci k Ni u rostlin z hadcových a nehadcových populací (Nyberg Berglund et al. 2003).

### **Sucho, živiny a morfologická odpověď**

Sucho a snížený obsah živin pravděpodobně nikdy nejsou hlavními příčinami hadcové intolerance (viz např. Kruckeberg 1954, obr.1), avšak k nehostinnosti hadcových biotopů mohou značně přispívat. Působení těchto faktorů se pak odráží na morfologické odpovědi hadcových rostlin (Proctor & Woodell 1975). Některé morfologické znaky zřejmě představují konkrétní adaptace, jindy se může jednat o pouhé důsledky působení sucha nebo nedostatku živin na rostlinnou architekturu. U mnoha hadcových forem (avšak zdaleka ne u všech) se můžeme setkat s následujícími morfologickými rysy (Brady et al 2005, Kruckeberg 1984, Proctor 1999, Westerbergh & Rune 1996):

- xeromorfní tendence u listů – sklerofylie, menší velikost, sivé zbarvení, řídké či naopak velmi husté odění
- menší vzrůst
- kompaktní habitus
- vyvinutější kořenový systém

Zvláštní hadcové morfotypy, serpentinomorfózy, byly samozřejmě v popředí zájmu popisných botaniků počátku minulého století. Pravděpodobně českou specialitou se pak stal fenomén trpasličích rostlinných forem, tzv. nanismů. Největší zásluhu na „propagaci“ nanismů měl asi R. Dvořák, řídící učitel měšťanky v Mohelně (např. Dvořák 1940). Dvořák z této hadcové oblasti popsal celou řadu forem a variet od různých taxonů a celkem zde napočítal 279 různých typů nanismů (Macků 1960). Již v meziválečné době však Dvořákovi kolegové věděli, že nanismy jsou pouhou nedědičnou ekomorfózou a že na jejich formování má vliv především intenzivní pastva v celé oblasti (Suza 1928). Přesto však bývá přítomnost nanismů dodnes spojována spíše s hadcovým substrátem, než s vlivem pastvy.

Na tomto příkladu vidíme, jak nutnost oddělovat vliv prostředí od genetického základu na morfologickou variabilitu, nabývá v případě hadců dvojnásobné důležitosti. Geneticky podmíněné odchylky hadcových rostlin samozřejmě existují, často se projevují i na úrovni ekotypů (např. Štěpánková 1997, Westerbergh & Rune 1996). Studium morfologie a dědičnosti jednotlivých znaků může přinášet velmi důležité poznatky do studia speciace na hadcových stanovištích (např. příklad *Layia discoidea*, Baldwin 2005, kap. 3.2.2.1)

## **3.1.2 Vznik hadcové tolerance**

Kruckeberg (1954) předpokládá, že toxický hadcový substrát může úspěšně kolonizovat pouze nějaký vhodně „preadaptovaný“ genotyp. Tyto „preadaptace“ se mohou týkat odolnosti k některým z dílčích problémů hadcového syndromu, např. k suchu či zvýšenému obsahu některých prvků v půdě. Potenciální kolonizátor je jimi vybaven buď proto, že nijak neomezují jeho fitness, nebo protože mu dokonce poskytují nějakou v jiném kontextu využitelnou výhodu. Například rostliny obývající zasolená přímořská stanoviště musí být adaptovány na vyšší obsah Mg iontů v půdě (Brady et al. 2005). Také schopnosti některých rostlin ve zvýšené míře ve svých pletivech akumulovat těžké kovy může posloužit jako dobrý příklad – na hadcích tato vlastnost umožňuje hospodařit s těžkými kovy, zatímco na normálních substrátech chrání před patogeny, herbivory nebo může napomáhat v alelopatickém „souboji“ s okolními rostlinnými konkurenty (Boyd & Martens 1998). Taylor & Levy (2002) zjistili toleranci ke značně sníženému poměru Ca:Mg iontů u některých populací výhradně silikátového druhu *Phacelia dubia*, který na hadci nikdy nerostl.

Další možností je získání „preadaptace“ prostřednictvím genového toku od jedinců z blízkých hadcových populací. Kruckeberg (1954, 1967) si všiml zvýšeného podílu tolerantních jedinců v populacích u jinak netolerantních ras, které se nacházely v blízkosti hadcových výchozů obývaných hadcovými typy téhož druhu. Tok genů mezi hadcovými a nehadcovými populacemi *Silene dioica* v severním Švédsku prokázaly s využitím izozymových metod např. Westerbergh & Saura (1992).

„Preadaptací“ v jistém slova smyslu by mohla být i schopnost obejít se bez nějakého mechanismu, který sice v „normálních“ podmínkách představuje výhodu (např. kompetiční), avšak ve stresujícím hadcovém prostředí se jeho vliv nemůže uplatnit. Příkladem mohou být mykorhizy. Druh, který je již v nehadcovém prostředí přizpůsoben životu bez mykorhizy, neutrpí při přechodu na hadcový substrát snížením fitness z důvodu ztráty mykorhizního symbionta (Pepper & Norwood 2001). Výrazné zastoupení rostlin z převážně nemykorhizních čeledí *Caryophyllaceae* a *Brassicaceae* v hadcových florách temperátních oblastí (Proctor 1999) k podobným závěrům nabádají (Pepper & Norwood 2001), avšak praktické ověření takovýchto hypotéz schází.

### 3.1.3 Hadcová „past“?

Proč některé hadcové druhy nerostou mimo hadec? Důvodem by mohlo být silné fyziologické přizpůsobení na zvláštní chemické podmínky hadců, které už nedovolí hadcový substrát opustit. Pokusně byl doložen zvýšený požadavek na přísun určitých iontů (Mg, Ni) u některých hadcových typů (viz Brady et al. 2005, Proctor & Woodell 1975). Tento požadavek se však v popisovaných případech projevoval pouze zhoršenými vlastnostmi růstu, nikdy celkovým úhynem rostliny. Proctor a Woodell (1975) uvádějí, že neznají jediný hadcový druh, který by nebylo možné kultivovat v běžných podmínkách. Požadavky na zvláštní edafické vlastnosti hadců tak mohou k vazbě některých rostlin na hadce přispívat, avšak hlavní roli nehrají.

Nejdůležitějším faktorem, který „nedovolí“ některým serpentinofytům opustit hadcovou oblast je pravděpodobně konkurence (Kruckeberg 1954, Proctor & Woodell 1975, Brady et al. 2005). Kruckeberg (1954) toto dokázal elegantním pokusem, kdy vysel směs semen běžných nehadcových druhů a hadcového endemita rodu *Streptanthus* do nádob s hadcovou a normální půdou. Zatímco v hadcovém truhlíku bylo po několika týdnech možné nalézt jen roztroušené klíčící semenáčky *Streptanthus* a několik skomírajících semenáčků běžných rostlin (vesměs trav), nehadcový truhlík bujel vzrostlými semenáči řady druhů, avšak semenáčky hadcového endemita se mezi nimi nalézt nepodařilo. To, že je *Streptanthus* schopen klíčit v nehadcové půdě samostatně již bylo prokázáno v předchozím experimentu (Kruckeberg 1954).

Co však může být příčinou kompetiční slabosti hadcových druhů? Brady et al. (2005) hovoří pouze o genetických *trade-offs*. Konkrétnější vysvětlení nabízí Nyberg Berglund (2005). Hadcové rostliny snad z důvodů sucha či nedostatku živin musí vytvářet rozsáhlejší kořenový systém. Pokud investují do rozvoje kořenů, již jim nezbude dostatek zdrojů na rychlý růst nadzemních částí, rostou tedy pomaleji a celkově dosahují menšího vzrůstu (chování typického S-stratéga). A vskutku, pomalejší růstové rychlosti (nadzemních částí) u hadcových typů ve srovnání s jejich nehadcovými „protějšky“ zmiňují i další autoři (viz Brady et al. 2005).

## 3.2 Speciace na hadci

### 3.2.1 Hadce a fytogeografie

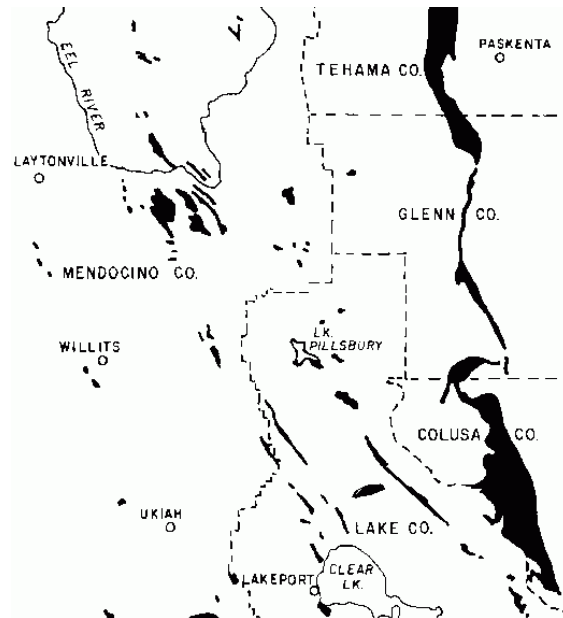
Hadcové horniny jsou takřka celosvětově rozšířené a pokrývají přibližně 1% zemského povrchu (Proctor 1999). Téměř nikdy však netvoří rozsáhlejší tělesa, ale vyskytují se spíše jako jednotlivé drobnější ostrůvky diskontinuálně rozptýlené v rámci nějakého rozsáhlejšího území (Kruckeberg 1986, 1991, viz též obr. 2). Právě takovéto geografické *pattern* ve spojení se zvláštními, silně selektivními podmínkami hadcových stanovišť představují vhodné „živné médium“ pro speciaci a evoluci rostlin.

Pozoruhodná ostrůvkovitá distribuce jednotlivých hadcových lokalit „svádí“ ke srovnávání s evolučními teoriemi vytvořenými v souvislosti s biogeografií oceánských ostrovů. Kruckeberg (1991) tyto příklady v obecné rovině schvaluje, avšak poukazuje na některé fytogeografické aspekty, kterými se „vnitrozemské“ edafické ostrovy liší od těch „pravých“ oceanických:

- Hadcové ostrovy nejsou obklopeny mořem „bez života“, ale jinými suchozemskými biotopy, ze kterých mohou na hadce pronikat nové druhy (nově se formující endemické „serpentinofyty“, avšak také konkurenti stávajících druhů)
- Rostlinstvo hadcového ostrova proto může být příbuznější druhům z okolního „moře“, než obyvatelům dalších ostrovů (např. v případě hadcových ras a ekotypů).
- Důležitou fytogeografickou složkou hadcového ostrova mohou být i reliktní druhy (pocházející z geologicky nedávné minulosti ve srovnání s relikty z oceanických ostrovů)
- Hadcové ostrovy jsou od okolního prostředí vymezeny charakteristickými vlastnostmi serpentinového substrátu. Bariéra proto není jen geografická, ale i ekologická a potenciální kolonista hadcového ostrova musí být na jeho specifické podmínky adaptován (zatímco ke kolonizaci oceanického ostrova může teoreticky stačit pouhá schopnost úspěšné dálkové disperse)

Zajímavé je, že v mnoha směrech analogickou situaci k edafickým hadcovým ostrovům můžeme hledat i u jiných edaficky vymezených diskontinuit (např. vápencové lokality, silikátové výchozy) nebo i topograficky vymezených vnitrozemských ostrovů, například alpinských poloh (Kruckeberg 1991).

Rostliny, které se na hadcových ostrovech „sešly“, představují pestrou směsicí taxonomických i fytogeografických prvků, s velmi odlišnými projevy reakce na hadcový substrát. Na jednom serpentinovém výchozu můžeme najít plynulou škálu druhů od omezených lokálních endemitů, přes relikty, exklávní prvky, různě diferencované ekotypy až po edaficky zcela indiferentní i v okolí běžné druhy (Kruckeberg 1984).



Obr. 2 – Ostrůvkovitá rozšíření hadcových výchozů v Kalifornii (Kruckeberg 1984)

Kruckeberg (1984) na základě svých dlouholetých zkušeností s hadcovou flórou západního pobřeží USA vyčlenil tyto fytogeografické hadcové „prvky“:

- **Indiferentní druhy** (*bodenvag species*) jsou nespecializované taxony schopné růst na pestré škále substrátů včetně serpentinitů. Jelikož jsou tyto druhy většinou vyčleněny pouze na základě morfologie, rozhodně není vyloučena přítomnost kryptických edaficky specializovaných intraspecifických ras či ekotypů (např. *Achillea millefolium*, Kruckeberg 1967).
- **Local indicators** jsou taxony, které sice mohou růst na hadci i mimo něj, avšak v rámci svého areálu tak činí s určitou geografickou strukturou. V typickém případě daný druh v centru svého areálu roste na nehadcových místech, avšak v některé okrajové části je věrný serpentinitům (např. kalifornská *Pinus jeffreyi*, Kruckeberg 1984). Je dobré poznamenat, že v politicky fragmentované Evropě mohou být takovéto okrajové populace snáze označovány za samostatné endemité taxony, než v podobně velké oblasti západního USA.
- **Hadcové endemity** jsou taxony svým výskytem omezeny výhradně na hadcové lokality. Na tuto kategorii se nyní podíváme blíže

### 3.2.2 Hadcové endemity

Hadcové endemity jsou bezpochyby jednou z nejzajímavějších složek hadcového fenoménu. Jejich četnost je v různých oblastech značně proměnlivá, například z Kalifornie uvádí Kruckeberg (1984) 215 endemických hadcových taxonů, z Nové Kaledonie je údajně známo přes 30 rodů a 900 druhů a dokonce 2 monotypické čeledi omezené na hadcové lokality (Kruckeberg & Rabinowitz 1985). Oproti tomu v severně položených temperátních a boreálních oblastech je počet hadcových endemitů (obzvláště v ranku druhu a výše) značně nižší, zřejmě zejména díky proměnám vegetace v průběhu kvartéru (Westerbergh & Rune 1996)

Taxony, kterým je společný endemický výskyt na hadcových substrátech se mohou zásadně odlišovat svým původem a potažmo i způsobem vzniku. O vymezení dvou extrémních fytogeografických případů se pokusil Kruckeberg (1954), jehož koncept posléze převzali Proctor & Woodell (1975). Mayer & Soltis (1994) na problém hadcového endemismu u rodu *Streptanthus* úspěšně aplikovali koncept paleo- a neoendemismu. Oba tyto přístupy v zásadě dospívají ke shodnému rozdělení:

- **serpentinofyt ~ hadcový neoendemit** vznikl a diferencoval z nějakého geograficky blízkého (hadcového či nehadcového) taxonu v nedávné době přímo *in situ* na hadci. Jeho areál je velmi malý, většinou omezený na několik blízkých hadcových ostrovů, na které se pravděpodobně dostal migrací ze své „mateřské“ lokality.
- **serpentinikolní relikť ~ hadcový paleoendemit** představuje pozůstatek původně šíře rozšířeného taxonu, jež po výrazné kontrakci areálu a vymizení jeho nehadcových populací zůstal omezen pouze na ostrovy serpentinitů
- ani do jedné z výše uvedených kategorií (vytvořených na základě znalostí kalifornských hadců) však nezapadá fylogeografický *pattern* endemických **hadcových kapradin** (známý možná pouze z Evropy) – serpentinofytní zástupci rodu *Asplenium* obývají na poměry jiných hadcových endemitů neobvykle rozsáhlé areály (např. Křisa 1988) což je pravděpodobně důsledkem postupného šíření „z ostrova na ostrov“ prostřednictvím lehkých anemochorních spor.

### 3.2.2.1 Serpentinofyty a sympatrická speciace na hadcích

Serpentinofyt by sice mohl pocházet z nějakého blízce příbuzného hadcového taxonu, avšak mnohem zajímavější schéma nabízí případy sympatrické speciace hadcového typu z přilehlé nehadcové populace. Právě procesy probíhající na selektivním rozhraní stresující hadcové a nehadcové půdy přitáhly pozornost většiny výzkumníků a v souhře se studii *heavy metal tolerance* vyústily v koncept „edafické speciace“, zvláštního typu sympatrického speciálního procesu, který má ambice stát se jedním ze základních modelů adaptivní evoluce v přírodních podmínkách (Brady et al. 2005).

Základní model postupné edafické speciace právě na příkladu serpentinitů popsal Kruckeberg (1986): V rámci nehadcových populací existují jedinci, „preadaptovaní“ na zvláštní edafické podmínky hadců. Mechanismy disruptivní selekce, katastrofické selekce (viz níže) nebo postupná divergence (s přispěním genetického driftu) rozdělí původně jednotný druh do hadcově tolerantních a netolerantních, ekologicky specializovaných ras (zde se projevuje klíčový „speciální stimulus“ hadcových půd). Hadcová rasa dále diverguje ve strukturálních a funkčních znacích. V souvislosti s postupnou divergencí obou ras dojde ke genetické fixaci jejich reprodukční izolace. Přerušení genového toku mezi oběma rasami umožní další divergenci (např. prostřednictvím driftu) a speciaci hadcového endemita. Většinou se tedy jedná o postupný vývoj v linii: tolerantní genotyp → hadcová rasa (~ekotyp) → hadcový (neo)endemit.

Zajímavou otázkou je, proč některé hadcové typy „zůstaly“ ve fázi hadcové rasy, zatímco jiné dospěly až do „konečného“ stavu samostatného druhu. S touto otázkou bezprostředně souvisí klíčový bod této teorie (který sám autor moc nerozvádí) – vznik reprodukčních bariér a následné omezení genového toku mezi oběma typy (! nyní neuvažujeme zřejmě vzácnější případy saltační speciace). Této otázce se podrobněji věnuje Rajakaruna (2004) a na základě vlastních studií na rodu *Lasthenia* (z hadců) a výzkumů dalších autorů u rodů *Agrostis* a *Mimulus* (z půd kontaminovaných těžkými kovy) poukazuje na následující možnosti reprodukční izolace edafických typů:

- posuny v době kvetení (*Agrostis*, *Lasthenia*, *Mimulus*)
- změna v opylovačských preferencích (přestavbou květní morfologie, *Mimulus*)
- vznik či alespoň zvýšení míry samosprašení v populacích specializovaného edafického typu (*Agrostis*, *Lasthenia*, *Mimulus*)
- vytvoření pylové inkompatibility mezi oběma typy (*Lasthenia*, *Mimulus*)

Primární příčinu k vytvoření těchto bariér může představovat ekologický selekční tlak působící na hybridy vzniklé křížením mezi oběma typy. Například v případě rodu *Lasthenia* tyto hybridy nebyli v přirozených podmínkách pozorováni i přes experimentální ověření plné kompatibility mezi oběma rodičovskými typy. Hybridy jsou pravděpodobně ekologicky znevýhodněni v prostředí obou mateřských typů a selekční tlak proto působí na vytvoření mechanismů, které by vzniku takovýchto „neužitečných“ hybridů mohly zabránit (Rajakaruna 2004).

V této situaci je zajímavé zmínit případ hybridizace dvou edaficky vikarizujících kalifornských dubů (Forde & Faris 1962). *Quercus durata* je hadcovým endemitem, zatímco *Q. dumosa* se těmto substrátům zásadně vyhýbá. Hybridizace mezi oběma druhy je sice možná, avšak kříženci se vyskytují pouze vzácně v přechodné zóně na hranicích hadcových obvodů a v prostředí ani z jednoho z rodičovských typů nejsou schopny úspěšně přežít. Výjimkou je jediná kompletně hybridní populace, která našla vhodnou niku v ekologicky stresujících podmínkách na exponovaném a neúživném (avšak nehadcovém) skalnatém

hřebenu, kde se zřejmě ani jeden z rodičovských druhů nemohl uplatnit (Forde & Faris 1962, Kruckeberg 1986).

### **Saltační speciace na hadcích**

Poměrně „extremistický“ (o to však citovanější) model saltační speciace na diploidní úrovni je tzv. katastrofické selekce (Lewis 1962). Tento model předpokládá existenci marginální populace rostoucí v silně stresujících podmínkách na hranici ekologických možností druhu (např. na velmi suchém stanovišti). Při zesílení vlivu tohoto ekologického stresu (např. během extrémně suché sezóny) dojde ke zdecimování větší části této populace a přežije jen omezené množství nejodolnějších jedinců, kteří zároveň nesou chromosomální přestavbu znemožňující genový tok se zbylými populacemi daného druhu. Vznikne nový druh, dokonale izolovaný od svého předka. Příkladovým druhem se stal druh *Clarkia lingulata* (*Onagraceae*), jenž se od svého pravděpodobného předka *C. biloba* skutečně odlišuje rozsáhlými cytologickými přestavbami (liší se dokonce chromozomovým počtem). Těsná blízkost obou druhů byla prokázána cytologickým pozorováním (Lewis 1962) a později i studiem izozymů a DNA (Gottlieb 2004). *C. biloba* ani *C. lingulata* však na hadci nerostou (a ani nikdy nerostly) a základní stresující faktor představovalo (kolísající) sucho. Raven (1964) se koncept katastrofické selekce pokusil aplikovat na možnosti hadcové speciace (zvláštní edafické podmínky jako stresující faktor), avšak konkrétní příklady neuvádí. Od této doby je tento koncept v souvislosti s edafickou evolucí pouze přejímán dalšími autory (např. Kruckeberg 1986, Rajakaruna 2004).

Saltační speciace se pravděpodobně uplatnila při vzniku (tentokrát již hadcového) neoendemitního taxonu *Layia discoidea* (*Asteraceae*) (Gottlieb 2004, Baldwin 2005). Tento druh je omezen na jediný hadcový obvod v Kalifornii a od svého mateřského taxonu *L. glandulosa* se odlišuje drastickými změnami v morfologii (postrádá jazykovité květy a některé listeny). Zajímavé je, že takto nápadné morfologické rozdíly jsou řízeny jen malým počtem genů velkého účinku (Gottlieb 2004). Těsnou blízkost obou druhů prokázalo sekvenování úseku ITS – ve výsledném stromu byla *L. discoidea* „uhnížděna“ mezi jednotlivými populacemi *L. glandulosa* (Baldwin 2005). Konkrétní mikroevoluční mechanismus vzniku *Layia glandulosa* je však stále neznámý (Baldwin 2005). Možnost katastrofické selekce však lze jednoznačně vyloučit už jenom proto, že se oba druhy mezi sebou bez problémů kříží (Gottlieb 2004).

Velmi rozšířeným mechanismem saltační speciace v obecné rovině je polyploidizace (Briggs & Walters 2001). Překvapivě málo studií se však zabývalo karyologickými diferenciacemi přírodních populací v kontextu toxických substrátů (Krahulcová & Štěpánková 1998). Negativní výsledky, co se týče rozdílů ve struktuře a počtu chromozomů přináší např. Cobon & Murray (1983). Studie polyploidního komplexu *Galium pumilum* agg. (u jehož druhů jsou známy hadcové a nehadcové populace) také neodhalila význačnější vztah mezi ploidní úrovní a věrností k hadcovému substrátu (Krahulcová & Štěpánková 1998). Zajímavý byl ale nález jediného vysoce polyploidního (12x) jedince *G. pumilum* agg. na jedné z hadcových lokalit (dolnokralovické hadce). Mezi diskutované příčiny vzniku tohoto polyploida patřila hybridizace spojená s allopolyploidizací nebo mutagenní účinky těžkých kovů (Krahulcová & Štěpánková 1998). Vliv hadce se nejspíš může promítat i do morfologie karyotypu. Karyotypy třech hadcových populací druhu *Myosotis stenophylla* se statisticky odlišovaly od karyotypů zbylých populací, avšak navzájem si byly velmi podobné, a to i přes velikou geografickou vzdálenost hadcových lokalit (Štěpánková 1996). Coulaud et al. (1999) sice nepozorovali žádné rozdíly v morfologii karyotypu mezi populacemi *Armeria maritima* z normálních a těžkými kovy kontaminovaných lokalit, ale zjistili vyšší frekvenci interfázních abnormalit (přítomnost mikrojadér indikujících poruchy mitózy) u rostlin pocházejících z kontaminovaných míst.



### 3.2.2.2 Serepentinikolní relikty

Prostředí hadcových „ostrovů“ je sice ekologicky stresující, avšak díky snížené kompetici zde můžou nalézt útočiště konkurenčně slabší druhy (Kruckeberg 1984). V podmínkách postupně se měnícího klimatu spojeného se vzrůstající konkurencí jiných druhů rostlin mohou přilehlé nehadcové populace vyhnout a z našeho druhu se stane buď rovnou endemický serpentiniolní relik (vyhynou všechny nehadcové populace) nebo „*local indicator*“ (vyhynou pouze blízké nehadcové populace, avšak v jiné části areálu druh stále roste i na jiných substrátech, např. skandinávské *Cerastium alpinum*, Nyberg Berglund 2005). Ve druhém případě však mohou nastoupit mechanismy alopatrické speciace spojené s ekogeografickou specializací (Kruckeberg 1984) a z reliktního hadcového typu, geograficky i ekologicky izolovaného od populací ve zbytku areálu se může stát samostatný druh.

Zajímavá situace může nastat v místech sekundárního kontaktu hadcového relikta s nějakým blízkým příbuzným taxonem. Tlak na vytvoření reprodukčních bariér známý ze sympatrie (Rajakaruna 2004) se zde neuplatňoval, a tak mohou být oba taxony schopny bezproblémového křížení (volně křížitelné jsou např. ekogeograficky izolované druhy rodu *Caulanthus*, Pepper & Norwood 2001). Reliktní hadcové populace *Silene dioica* v jižním Švédsku, které se dostaly do blízkosti svých nehadcových příbuzných díky antropogennímu odlesnění krajiny, před introgresí pravděpodobně „chrání“ pouze krátká doletová schopnost jejich opylovačů (Westerbergh & Saura 1992)

Rada serpentiniolních reliktních druhů není vybavena nějakými mechanismy úspěšného dálkového šíření semen (např. *Streptanthus* spp., *Silene dioica*). Kolonizace geograficky vzdálenějších hadcových ostrovů prostřednictvím šíření semen z nějaké stávající hadcové populace pak představuje silně nepravděpodobný scénář. Spíše byl každý vzdálenější hadcový výchoz obsazen nezávislou kolonizační událostí. V tom případě ale muselo nutně dojít k opakovanému vzniku hadcové tolerance, což nás přivádí na otázku, jak často může v přírodě k takovéto události docházet.

Studie z kontaminovaných výsypek ukazují, že tolerance k těžkým kovům může u některých druhů vzniknout během několika málo generací (Antonovics et al. 1971). Kruckeberg (1967) našel tolerantní populace u druhů, které se do styku s hadcem na zkoumaných lokalitách mohly dostat nejdříve před 75 lety. Opakovaný vznik hadcové tolerance u disjunktních populací různých druhů pak prokázala řada studií využívající molekulárních markerů (např. Mayer & Soltis 1994, Mengoni et al. 2003, Nyberg Berglund 2005, Rajakaruna et al. 2003; další příklady uvádí Brady et al. 2005). Zisk hadcové tolerance tedy zřejmě nemusí být takový problém, jak by se mohlo na první pohled zdát.

Navíc ne všechny druhy při styku s toxickým substrátem musejí toleranci teprve získávat. Zvýšený obsah Ni tolerovaly i rostliny pocházející z „normálních“ půd např. u druhů *Silene dioica* (Westerbergh & Rune 1996) nebo *Thlaspi montanum* (Boyd & Martens 1998). Tato vlastnost se u populací z netoxických substrátů může uchovávat buď proto, že je v běžných podmínkách nijak neomezuje nebo proto, že těmto rostlinám i v netoxických podmínkách poskytuje nějaké (jiné) výhody (Brady et al. 2005).

## 3.3 Případová studie *Streptanthus glandulosus*

Výzkumy prováděné na komplexu *Streptanthus glandulosus* agg. jsou asi nejlepším příkladem studie řešící fylogeografické otázky hadcového endemismu. Široká škála použitých metod nám umožní porovnat přínos jednotlivých přístupů pro odhalení spletité evoluční historie tohoto komplexu

Převážně kalifornský rod *Streptanthus* (*Brassicaceae*) zahrnuje přes 40 druhů, z nichž více než třetina je více či méně vázána na hadcová stanoviště (Kruckeberg 1984). Do téměř výhradně hadcového podrodu *Euclisia* spadá také komplikovaná skupina *Streptanthus glandulosus* agg. Jedná se o komplex morfologicky diverzifikovaných hadcových stenoendemitů, většinou reprezentovaných jen několika málo populacemi (často početně velmi slabými). Výjimku představuje taxon *Streptanthus glandulosus* subsp. *glandulosus*, který se roztroušeně vyskytuje napříč areálem celého komplexu. Jedině u tohoto taxonu jsou známy také nehadcové populace (Mayer & Soltis 1994). Vliv geografické izolace (spojený s genetickým driftem) zřejmě zapříčinil značné rozpory taxonomickém chápání celé skupiny (různí autoři rozlišovali od 1 do 13 druhů; Mayer & Soltis 1994). Pozoruhodné ekologicko-geografické *pattern* vzbudilo již více jak 50 let trvající zájem o studium evoluce této skupiny (Kruckeberg 1951, 1954, 1957, 1984, Mayer & Soltis 1994, 1999, Mayer et al. 1994). Obsáhlý metodický aparát využívaný ke studiu této skupiny zahrnoval hybridizační pokusy spojené s testy fertility, přesazovací pokusy, izozymovou analýzu, RFLP chloroplastové DNA a sekvenování ITS úseku jaderné rDNA.

Kruckeberg (1957) studoval míru genetické izolace mezi jednotlivými populacemi/taxony prostřednictvím měření vzájemné interfertility (= pylové fertility experimentálně vytvořených hybridů). V rozsáhlém pokusu zahrnujícím přes 300 různých kombinací zjistil silnou negativní korelaci mezi interfertilitou a geografickou vzdáleností jednotlivých populací (odpovídající klasickému modelu izolace vzdáleností, Mayer & Soltis 1994).

Analýza izozymů (Mayer et al. 1994) umožnila posoudit míru genetické variability, genového toku a genetické podobnosti mezi studovanými populacemi (do průzkumu byly zahrnuty všechny známé populace stenoendemitů a většina populací *S. \*glandulosus*). Podařilo se odhalit překvapivě vysokou míru vnitropopulační variability, což značně zpochybnilo možnost uplatnění nějakého dřívějšího procesu spojeného s redukcí populační velikosti (např. *founder effect*). Na vyšších hierarchických úrovních byl největší podíl genetické variability na mezipopulační úrovni. Míra genového toku mezi populacemi byla většinou velmi malá, takže nestačila na vyvážení účinku genetického driftu, avšak nevyklučovala možnost vzácných případů hybridizace mezi některými populacemi. Genetická vzdálenost jednotlivých populací korelovala s jejich vzdáleností geografickou.

RFLP analýza chloroplastové DNA (Mayer & Soltis 1994) vyústila v sestavení fylogenetického stromu celého komplexu (metodou maximální parsimonie). Celý komplex bylo možno rozdělit do několika geograficky dobře vymezených skupin, které však neodpovídaly stávajícímu taxonomickému členění. Populace široce rozšířeného poddruhu *S. \*glandulosus* byly příbuznější geograficky blízkým populacím lokálních endemitů, nežli jiným vzdálenějším populacím svého poddruhu.

Následné porovnání výsledků analýzy izozymů a cpDNA (Mayer & Soltis 1994) ukázalo velkou shodu mezi oběma markery co se týče vztahu geografické a genetické vzdálenosti. Celý komplex pravděpodobně představuje serpentinelní relik (zde označovaný termínem paleoendemit). Původní široce rozšířený předek celé skupiny prodělal výraznou kontrakci areálu spojenou se zánikem většiny nehadcových „mezipopulací“. Přežily jen malé izolované populace na hadcových ostrovech, z nichž některé (zejména pod vlivem genetického driftu) dále morfologicky a geneticky divergovaly a speciovaly. Hlavní důvody pro „paleoendemický“, reliktní původ celého komplexu jsou následující:

- malé disjunktí populace rozšířené v relativně velké oblasti (celkový areál *S. glandulosus* agg. má více jak 800 km),
- disjunktí distribuce je zřejmě důsledkem konkurenčního vyloučení většiny nehadcových populací (nízká kompetiční úspěšnost byla potvrzena vysévacími pokusy, Kruckeberg 1954)

- malý potenciál k šíření na dlouhé vzdálenosti (relativně těžká a hladká semena)
- genetické *pattern* svědčící spíše pro postupující rozpad areálu a izolaci, než postupné šíření z hadcového ostrova na ostrov prostřednictvím *long-distance dispersal* (nízký genový tok, vysoká diferenciace populací, vysoká vnitropopulační variabilita, žádné důkazy *fouder-effect*)
- korelace geografické a genetické vzdálenosti populací
- klimatická a fytogeografická historie celé oblasti (zejména kolísání suchých a vlhkých období během pleistocénu)

Na úrovni drobných lokálních stenoendemitů se podařilo odhalit několik případů možného neoendemitního původu těchto taxonů (tedy nedávná drobná expanze jedné geneticky odlišné, avšak jen omezeně variabilní populace na několik blízkých hadcových ostrovních lokalit).

- celý taxon tvořen jen málo (2-3) populacemi vyskytujícími se ve velmi omezeném území (na délku jen několik km)
- téměř žádná genetická variabilita mezi jeho populacemi
- jen malá genetická odlišnost od některého jiného geograficky blízkého taxonu

Pozdější analýza sekvencí ITS úseku (Mayer & Soltis 1999) umožnila porovnat výsledky kladistických analýz jaderné a chloroplastové DNA, přičemž případné neshody mohly signalizovat buď (i) odlišné cesty evoluce organelární a jaderné DNA nebo (ii) metodické artefakty jednoho z přístupů. Jako největší limitací ITS markerů se ukázal výskyt polymorfních míst v sekvencích některých populací (pravděpodobně se jednalo o paralogické sekvence ITS, viz kap. 5.4.2.1). Strom sestavený z chloroplastové DNA zase neposkytoval dostatečnou podporu v některých kritických místech (nízká variabilita chloroplastového markeru). Za nejlepší přístup autoři považují sestavení kombinovaného stromu z ITS a cpDNA dat. Tento strom poskytl nejlepší rozlišení (s nejsilnější podporou řady větví) a dále potvrdil parafylii taxonu *S. \*glandulosus* a jeho blízkost k hypotetickému předkovi celé skupiny (jedna větev tvořená čistě tímto poddruhem se ocitla na bázi celého agregátu *S. glandulosus*)

Separátní porovnání ITS a cpDNA stromů se ukázalo jako výhodné, když umožnilo detekovat pozoruhodnou mikroevoluční událost *chloroplast capture* (Rieseberg & Soltis 1991): Vzácný, a morfologicky, ekologicky i molekulárně silně odvozený druh *S. niger* byl na základě restričního profilu cpDNA jasně řazen do velmi dobře podporované skupiny „*Bay area clade*“ (od ostatních členů této skupiny se lišil variabilitou pouze v jediném restričním místě, zatímco celá skupina byla podporována osmi synapomorfiemi). Mayer & Soltis (1999) tuto situaci vysvětlují tak, že *S. niger* získal chloroplast od jiného člena *Bay area clade* mechanismem *chloroplast capture* – tedy prostřednictvím genového toku cytoplazmické DNA a následné fixace takto získaných chloroplastů v populaci (viz též kap. 5.4.1.2).

Přítomnost polymorfních sekvencí ITS v některých populacích pravděpodobně indikuje mezipopulační genový tok, který již také naznačovala dřívější izozymová analýza. Pokud ke genovému toku skutečně došlo, muselo se tak stát prostřednictvím pylu, neboť v distribuci maternálně přenášené chloroplastové DNA se jeho vliv neodrazil (Mayer & Soltis 1999).

**Závěr:** V evoluci hadcového komplexu *Streptanthus glandulosus* agg. se uplatnila celá řada vzájemně provázaných evolučních procesů, což vyústilo ve složité *pattern* zahrnující původní reliktní endemity s disjunktními areály a z nich nověji vznikající drobné stenoendemitní taxony. Odhalení takto složité struktury evolučních vztahů umožnilo pouze využití širokého spektra metodických nástrojů a následné porovnání a kritické zhodnocení jejich výsledků.

## 4. Modelová skupina *Knautia arvensis*

K plnému porozumění evolučních procesů probíhajících v rámci nějaké skupiny je nezbytně nutná detailní znalost její biologie (Nyberg Berglund 2005). Až v takovémto širším kontextu nás výsledky morfologických, karyologických a molekulárních analýz mohou dovést k zajímavým evolučně-biologickým závěrům. Následující přehled proto bude zaměřen na shrnutí známých poznatků z biologie rodu *Knautia*, přičemž zvláštní pozornost bude věnována aspektům, které pravděpodobně hrají klíčovou roli v mikroevolučních procesech této skupiny. V dalších oddílech bude podrobněji rozebrána morfologická a cytologická variabilita a geografické rozšíření druhu *K. arvensis* v rámci České republiky a nastíněny dosud uvažované hypotézy o evoluční historii reliktních populací *K. arvensis*.

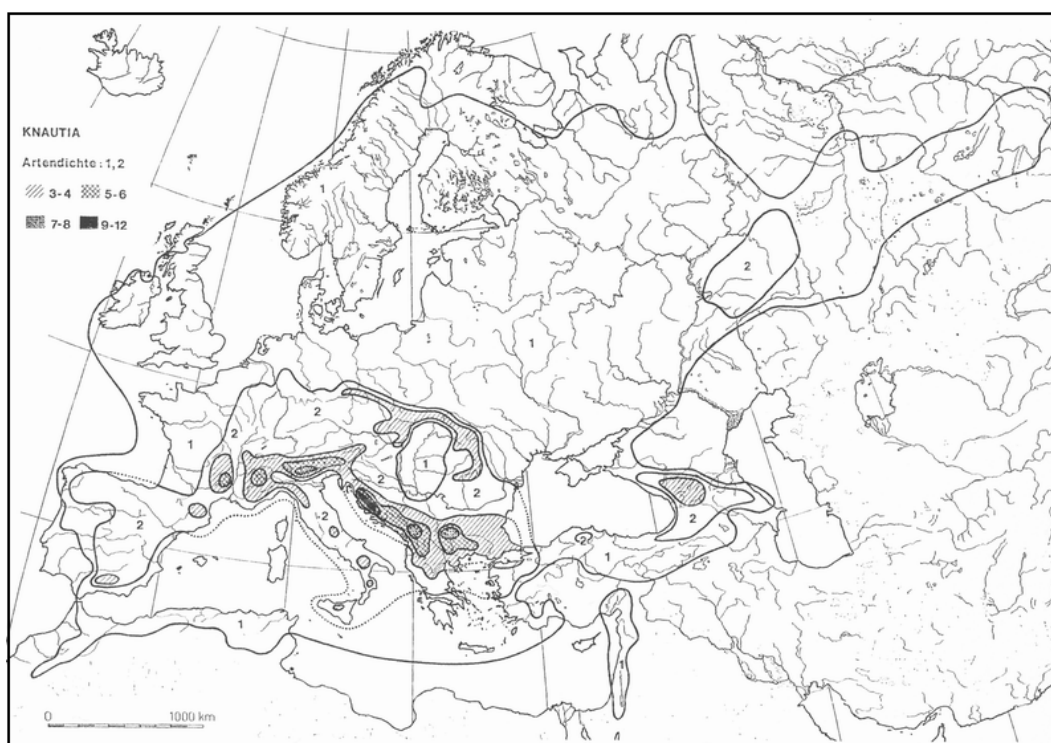
### 4.1 Rod *Knautia*

Rod *Knautia* L. (chrastavec; čeleď *Dipsacaceae*) zahrnuje přibližně 45-50 druhů jednoletých až vytrvalých bylin. Listy jsou vstřícné, celistvé až peřenosečné, často velmi proměnlivého tvaru. Drobné, čtyřčetné, oboupohlavné nebo funkčně samičí květy se skládají do plochých nebo polokulovitých strboulů krytých zákrovem z kopinatých až vejčitých listenů. Plodem je jednosemenná nažka na jejíž bázi se nachází masitý výrůstek – elaiosom (Ehrendorfer 1976, Štěpánek 1997).

Areál přirozeného výskytu rodu *Knautia* zaujímá celou Evropu, přilehlé oblasti Asie (Malá Asie, Kavkaz) a severní Afriky, druhotně se chrastavce vyskytují v celém mírném pásu severní polokoule (Štěpánek 1997). Centrum diverzity celého rodu můžeme hledat na Balkánském poloostrově. Svým výskytem se sem soustřeďují zástupci všech tří základních sekcí rodu a také všech šesti základních diploidních skupin z nejbohatší sekce *Trichera* (Ehrendorfer 1981).

Celý rod je tradičně členěn do tří morfologicky, ekologicky a také cytologicky velmi dobře vymezitelných skupin, stavěných na úroveň sekcí (např. Ehrendorfer 1962a). Sekce *Knautia* a sekce *Tricheroidea* jsou pravděpodobně fylogeneticky odvozené, zahrnují několik málo jednoletých a od zbytku rodu značně odlišných druhů, vyskytujících se převážně ve východním mediteránu (Ehrendorfer 1964, 1981).

V následujících kapitolách se zaměříme pouze na charakteristiky poslední skupiny, *Knautia* sect. *Trichera*. Tato, co do počtu druhů zdaleka největší sekce (okolo 45 druhů), je tradičně považována v rámci rodu za fylogeneticky původní skupinu, neboť zahrnuje převážně vytrvalé (vzácněji i dvouleté) druhy se základním chromozomovým číslem  $x=10$  (Ehrendorfer 1962a). Její areál v podstatě kopíruje hranice celého areálu rodu. Také všechny naše druhy chrastavců přísluší této skupině. Celá sekce představuje jeden velký polymorfní polyploidní komplex, sestávající se ze třech ploidních úrovní – diploidní ( $2x$ ), tetraploidní ( $4x$ ) a hexaploidní ( $6x$ ) (Ehrendorfer 1962a).



Obr. 3 – Celkové (primární) rozšíření a diverzita v rámci areálu rodu *Knautia*. Číslo a různé šrafování značí odlišný počet druhů rodu *Knautia* v dané části areálu (Ehrendorfer 1981)

## 4.1.1 Způsoby reprodukce a šíření

### 4.1.1.1 Reprodukční systém

Zástupci rodu *Knautia* jsou tradičně považováni za striktně alogamní druhy (např. Ehrendorfer 1965, Štěpánek 1997). Drobné, nápadně barevné květy chřastavců s krátkou korunní trubicí skládající se do hustých strboulů jsou dobře přizpůsobené obligátní entomogamii (Štěpánek 1979). Hlavním mechanismem zabráňujícím samosprášení je dichogamie typu protandrie (Ehrendorfer 1962, Štěpánek 1979, Vange 2002)\*. Nejen v rámci jednoho květu, ale v rámci celého strboulu se funkční období andrece nepřekrývá s dobou zralosti blizen (Štěpánek 1979). Sílu tohoto izolačního mechanismu dokládá pokus norské autorky V. Vange (2002), při němž se v kontrolních zasáčkovaných a nevykastovaných strboulech vyvinulo pouhých 2,8% semen.

Právě neschopnost samosprášení v rámci jedné hlávky nejspíš vedla dřívější autory k závěrům, že také celá rostlina je autosterilní\*. To však vyvrátila nedávná práce, zabývající se geitonogamií druhu *Knautia arvensis* v Norsku (Vange 2002) (geitonogamie = možnost samosprášení mezi různými květy v rámci téže genety; v případě *Knautia* tedy mezi různými strbouly téže ramety nebo mezi různými rametami téhož klonu). Mezi hlávkami opylenými

\* údaj v Květeně ČR (Štěpánek 1997) o proterogynii bude pravděpodobně omyl

\* Štěpánkem (Štěpánek 1979, 1989) zmiňovaná „fyziologická autosterilita“ je pravděpodobně důsledkem mylného výkladu slova „Selbsterilität“ (Ehrendorfer 1962a) popř. „autostérilité“ (Breton Sintes 1974a) jako pylové inkompatibility. Oba zahraniční autoři hovoří o silné autosterilitě, avšak do tohoto významu pravděpodobně zahrnují i vliv proterandrické izolační bariéry. Zajímavé je, že Ehrendorfer (1962a) zmiňuje jistou variabilitu v síle autosterility mezi různými jedinci, další podrobnosti však neuvádí. Absenci pylové inkompatibility (a tedy úplnou self-kompatibilitu) prokázala Vange (2002, viz výše).

pylem z jiné hlávky téže genety a z hlávky odlišného individua nebyl nalezen takřka žádný rozdíl, co se týče produkce zdravých, neabortovaných plodů (v obou případech 53% plodů). Studované rostliny tedy byly plně pylově autokompatibilní (Vange 2002).

Rozdíly byly nalezeny až v produkci biomasy u semenáčků – samosprášením vzniklé semenáčky dosahovaly v průměru 2,8-krát menšího výtěžku biomasy. Autorka tento výsledek přičítá vlivu inbrední deprese. Důsledkem je, že v malých, izolovaných populacích chrastavců můžeme očekávat vliv inbrední deprese a to tím silnější, čím více se budou jedinci této populace rozmnožovat klonálně.

Přítomnost apomixie (ve smyslu rozmnožování neoplozenými semeny) u celé čeledi *Dipsacaceae* vylučuje Ehrendorfer (1964). Důkaz pro toto tvrzení přímo u rodu *Knautia* přináší Vange (2002) – v deseti zasáčkovaných funkčně výhradně samičích hlávkách se nevyvinulo jediné semeno (přestože v zasáčkovaných oboupohlavných strboulech se vytvořilo 2,8% semen). Většina chrastavců se však může klonálně rozmnožovat prostřednictvím větveného pozemního oddenku (rostlina pak tvoří více postranních listových růžic).

### 4.1.1.2 Gynodiecie

V mnoha populacích chrastavců můžeme nalézt jedince se zřejmou tendencí k redukci samčího pohlaví a tedy k funkční jednopohlavnosti (Ehrendorfer 1962a). Funkčně samičí hlávky se odlišují i morfologicky, jsou menší a obsahují menší počet květů, které nepaprskuje (Hegi 1918, Štěpánek 1979). Tito jedinci jsou však normální součástí populací oboupohlavných rostlin a jakékoliv pokusy o jejich vyčleňování jsou taxonomicky neopodstatněné (Štěpánek 1979). Zajímavé je, že funkčně samičí jedinci zatím nebyli pozorováni v reliktních populacích *K. arvensis* v ČR a to i přes poměrně hojně zastoupení tohoto jevu v ostatních skupinách druhu (Štěpánek 1989, pers. comm.).

Gynodiecie umožňuje, aby se křížením mezi oboupohlavnými a samičími rostlinami v populaci uchovávala proměnlivost a současně umožňuje samosprášení hermafroditů (Briggs & Walters 2001). Některé studie také dokazují, že v nestálých podmínkách je podíl funkčně samičích rostlin vyšší než na stabilnějších stanovištích (Briggs & Walters 2001). S tím by mohla korespondovat i vzácnost/absence tohoto jevu u některých populací českých chrastavců osidlující extrémní, avšak poměrně stálé lokality (hadcové bory, vysokohorský kar). Alespoň na teoretické úrovni z předchozích údajů vyplývá, že populace bez přítomnosti funkčně samičích jedinců by mohly vykazovat vyšší míru inbreedingu.

### 4.1.1.3 Rozšiřování plodů

Jednosemenné plody chrastavců jsou na bázi opatřeny bílým zdužnatělým tělískem považovaným za elaiosom. V důsledku toho je celý rod tradičně označován za myrmekochorní (např. Ehrendorfer 1962a, 1965, Štěpánek 2002). Experimentální důkazy pro myrmekochorii podal Sernander (1906, sensu Ehrendorfer 1962a). Ehrendorfer (1962a) ještě zmiňuje možnost příležitostného šíření prostřednictvím ptáků či hlodavců a také Vandvik & Vange (2003) hovoří o možné exozochorii (plody jsou štětinaté). Tato tvrzení však nejsou ani v jednom případě podložena konkrétním příkladem pozorování nebo citací. Pokud jsou chrastavce skutečně výhradně myrmekochorní, lze očekávat, že genový tok na delší vzdálenosti může být v krátkém čase zprostředkováván pouze prostřednictvím pylu.

## 4.1.2. Možnosti hybridizace

Rozsáhlá hybridizace představuje jeden ze základních zdrojů obrovské a značně nepřehledné variability v rámci *Knautia* sect. *Trichera*. Nejdůležitější poznatky o možnostech hybridizace v rodě *Knautia* přinesly rozsáhlé experimentální studie z oblasti francouzského Massif Central (Breton Sintes 1974b, 1975, Breton Sintes & Cauderon 1969, 1970). Experimentální hybridizaci se také věnoval F. Ehrendorfer, výsledky svých pokusů však nepublikoval a pouze se na ně odvolává v diskuzích některých svých studií (zejm. Ehrendorfer 1962a). Nejdůležitějším zjištěním obou autorů je zásadní rozdíl v tom, zda dojde ke zkřížení jedinců ze stejné nebo z odlišných ploidních úrovní.

Mezi jedinci stejné ploidní úrovně reprodukční bariéry takřka neexistují (snad s výjimkou některých diploidních taxonů, Ehrendorfer 1964) a to bez ohledu na morfologickou nebo předpokládanou fylogenetickou odlišnost jednotlivých skupin (např. *K. arvensis*-4x a *K. drymeja*-4x, Ehrendorfer 1962a, 1964, *K. arvensis*-4x a *K. dipsacifolia*-4x, Breton Sintes 1974b). Hybridní jedinci jsou vitální a fertillní, nebyly pozorovány význačnější poruchy průběhu meiózy (Breton Sintes 1974b). Díky značné fertilitě hybridů může docházet ke zpětnému křížení, vzniku hybridních rojů a rozsáhlé introgresi (Ehrendorfer 1962a). Velmi silnou interfertilitu různých tetraploidních taxonů rodu *Knautia* potvrdil z našeho území také Štěpánek (1979).

Naproti tomu mezi jedinci odlišných ploidních úrovní jsou bariéry takřka nepřekonatelné. Na více než 2000 opylených květů mezi různými diploidními a tetraploidními taxony (včetně obou cytotypů *Knautia arvensis*) bylo dosaženo pouze jediné triploidní rostliny, která měla poruchy meiózy a byla zcela sterilní (Breton Sintes 1974b, 1975). Jednalo se o křížence mezi druhy *K. bazaltica* (ze skupiny *K. longifolia*) a *K. arvernensis* (ze skupiny *K. dipsacifolia*) (Breton Sintes & Cauderon 1969). Také Ehrendorfer (1962a) nezískal z pokusných křížení diploidních a tetraploidních taxonů žádné nebo nanejvýš sterilní potomstvo.

Dalším důkazem silných meziploidních bariér je naprosté minimum údajů o anortoploidním chromozomovém počtu u jedinců z volné přírody. Triploidní počet zaznamenala pouze Plaksina (1999) v případě druhu *Knautia tatarica* ze středního Povolží. Ke křížení mezi tetra- a hexaploidními jedinci bude pravděpodobně docházet o trochu častěji. Pentaploidní jedince z volné přírody dokládá Ehrendorfer (1962a, jeden případ *K. arvensis* x *K. dipsacifolia* ze Savojska) a také Štěpánek (1979, 1982, jeden kříženec mezi *K. kitaibelii* a *K. dipsacifolia*, smíšená populace tetra- a hexaploidního cytotypu *K. dipsacifolia* s výrazným zastoupením pentaploidů; obě lokality ze Slovenska). Existuje také několik údajů o výskytu hybridů *K. arvensis* a *K. dipsacifolia* z našeho území (Štěpánek 1997), žádný z nich však nebyl podroben cytologickému průzkumu. Hybridizační experimenty zaměřené na křížitelnost tetra- a hexaploidů prováděny nebyly.

Jinou možnost genetického kontaktu mezi odlišnými ploidními úrovněmi mohou představovat neredukované gamety. Ehrendorfer (1962b) na základě pozorování přírodních hybridů a nepublikovaných hybridizačních pokusů usuzuje na možnost vzniku životaschopných a ± plodných polyploidních jedinců prostřednictvím neredukovaných samicích gamet.

## 4.1.3 Karyologie

Ačkoliv základní chromozomové číslo i struktura karyotypu je v rámci rodu *Knautia* proměnlivá, celá sekce *Trichera* se vyznačuje jednotným a jen minimálně proměnlivým karyotypem se základním chromozomovým číslem  $x = 10$  (Ehrendorfer 1962a). Karyotyp

diploidního druhu *K. purpurea* (ze skupiny *K. arvensis* agg.) publikoval Kachidze (1929) a pro celou sekci ho zobecnil Ehrendorfer (1962a). Drobné odchylky oproti tomuto základnímu karyotypu uvádí Ehrendorfer (1962a) pro zástupce dalších dvou skupin ze sekce *Trichera* (*K. drymeja* a *K. velutina*). Odlišnosti spočívají především v poloze centromery u třech nejmenších chromozomů. Tyto rozdíly jsou však tak malé, že na jejich základě by nebylo možné identifikovat předpokládaný allopolyploidní původ některých taxonů (Ehrendorfer 1962a). Odchylné karyogramy také uvádí Verlaque (1975) u řady druhů včetně diploidní *K. arvensis* z jižní Francie. Idiogramy vyobrazené v jejích pracích se liší zejména absencí satelitů a často také subterminální polohou centromery u nejdelšího chromozomu (Štěpánek 1979).

Intenzivnímu studiu byl také podroben průběh meiózy u zárodečných pylových buněk (Ehrendorfer 1962a, Breton Sintes 1974a,b, 1975, Breton Sintes & Cauderon 1969). U diploidních ani polyploidních rostlin ani u homoploidních kříženců nebylo pozorováno větší množství významnějších odchylek ve struktuře, párování a rozchodu meiotických chromozomů. Pozoruhodná byla pouze poměrně vysoká frekvence multivalentů u polyploidních jedinců. Průměrná četnost tetraivalentů se pohybovala mezi 36 a 66% buněk u tetraploidů, u hexaploidů bylo toto číslo ještě o něco vyšší. Tetraivalenty byly přibližně třikrát častější, než trivalenty (Ehrendorfer 1962a). Pravděpodobně ještě hojnější výskyt tetraivalentů zaznamenala Breton Sintes (1975) u všech tetraploidních druhů i jejich homoploidních hybridů (v průměru 1,85 respektive 2,04 tetraivalentů na buňku). Univalenty byly pozorovány jen vzácně (Breton Sintes 1974b).

Zcela odlišná situace byla u triploidního jedince vzniklého experimentální hybridizací diploidní a tetraploidní rostliny (Breton Sintes 1975, Breton Sintes & Cauderon 1969). Nápadná byla zejména vysoká frekvence trivalentů (1-7, v průměru 4,28 trivalentů na buňku).

Vysoká četnost multivalentů a následná nepravidelná distribuce chromozomů při meióze jsou pravděpodobně příčinou častého výskytu aneuploidie u tetra- a hexaploidních rostlin (Štěpánek 1979). Častěji se setkáváme s nadbytkem chromozomů, tedy hyperploidií (Ehrendorfer 1962a, Štěpánek 1979, 1982). Z našeho území zaznamenal Štěpánek výskyt aneuploidů pouze u tetraploidních rostlin, zato však v poměrně vysoké frekvenci (ca 4,5%). Zatímco Ehrendorfer (1962a) zmiňuje celé aneuploidní populace či dokonce lokální rasy, na našem území byli aneuploidní jedinci vždy pouze minoritní součástí euploidních populací (Štěpánek 1979, 1982)

S aneuploidií v širším slova smyslu souvisí i výskyt tzv. B-chromozomů. Jedná se o většinou drobné, nepravidelně segregující „nadbytečné“ chromozomy, jejichž četnost mezi populacemi téhož druhu může být nestálá (Briggs & Walters 2001). B-chromozomy mohou vnášet zmatek do analýz velikosti genomu, jakožto příčina intraspecifické variability v obsahu jaderné DNA (Šmarda & Bureš 2006). Obecně lze říci, že přes velmi detailní karyologické průzkumy prováděné v různých částech areálu a přes řádově stovky analyzovaných rostlin nebyla v žádné z výše jmenovaných studií (Breton Sintes 1975, Ehrendorfer 1962a, Štěpánek 1979, 1982) zaznamenána přítomnost B- chromozomů v rodu *Knautia*. Ehrendorfer (1962a) také zdůrazňuje, že jím pozorované nadpočetné chromozomy aneuploidních rostlin se strukturně nijak neliší od chromozomů normálních.

#### 4.1.4 Evoluce v rámci sekce *Trichera*

*Knautia* sect. *Trichera*, ve svých ca 45 druzích soustřeďuje většinu ekologické a morfologické diverzity celého rodu *Knautia* (Ehrendorfer 1964). Jaké jsou hlavní příčiny obrovské proměnlivosti této skupiny? Celá sekce v zásadě představuje jediný ohromný polymorfní polyploidní komplex, při jehož vzniku a formování se uplatňují především následující tři mikroevołuční procesy:



- **Polyplodizace** – V rámci komplexu známe diploidní, tetraploidní a hexaploidní taxony a cytotypy. Ke vzniku polyploidů zřejmě dochází opakovaně a mohou se při něm uplatňovat auto- i allopolyploidizační procesy (Ehrendorfer 1962b, Breton-Sintes 1975).
- **Alopatrická speciace** – Geografické bariéry umožňují vznik řadě morfologicky a ekologicky značně odlišným typům / taxonům.
- **Hybridizace** – Mezi taxony téže ploidní úrovně dochází k takřka volné hybridizaci (často spojené s introgresí), která vede v místech styku areálů ke splývání i morfologicky a fylogeneticky velmi vzdálených druhů

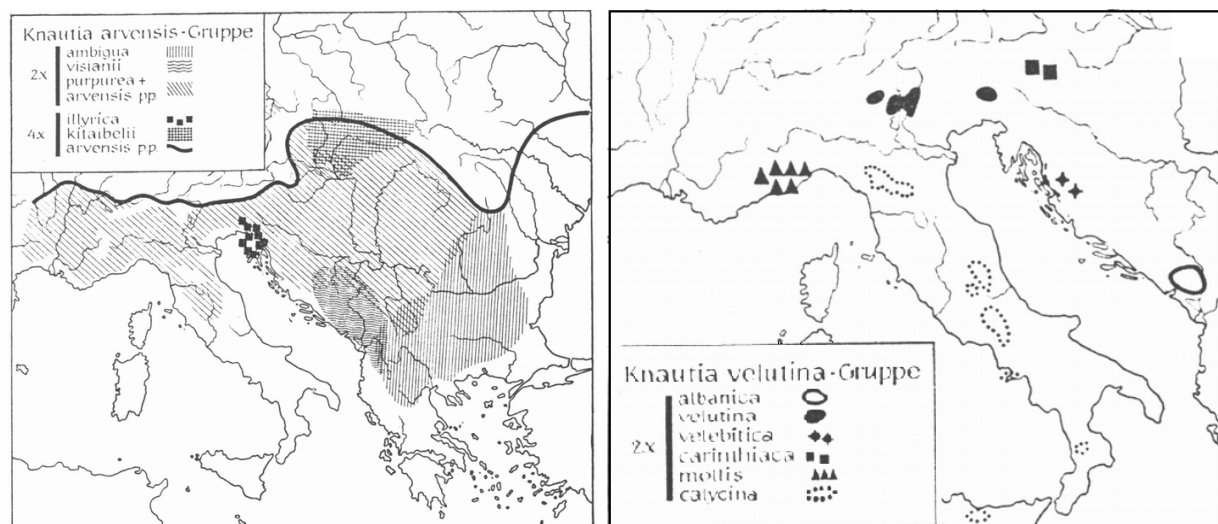
Základem celého komplexu jsou diploidní ( $2n = 2x = 20$ ) taxony, které divergovaly do několika (pravděpodobně 6) linií – rozlišovaných jako základní skupiny, Wurzelgruppen (Ehrendorfer 1962a). Tito diploidi často obývají malé reliktní areály v jihoevropských (zejména balkánských) pohořích. Prostorová izolace minimalizuje možnosti hybridogenních kontaktů mezi jednotlivými druhy. K izolaci diploidů snad přispívají i reprodukční bariéry, potvrzené „řadou hybridizačních pokusů“ (Ehrendorfer 1964). Proti tomuto faktu však hovoří hybridizační pokusy prováděné ve střední Francii (Breton Sintes 1975, viz výše) nebo plynulé přechody pozorované např. mezi diploidními taxony *K. arvensis* agg., Ehrendorfer 1962a).

Zmiňované bariéry jsou však překonávány prostřednictvím polyploidů. Značná část polyploidních taxonů v sobě kombinuje znaky více základních diploidních skupin a jejich pravděpodobný allopolyploidní původ (Ehrendorfer 1962a) tak představuje další formu „kontaktu“ genomů rozdílných diploidních linií. Složitou „vertikální“ strukturu polyploidních sérií doplňují i četné „horizontální“ vztahy, tedy rozsáhlá hybridizace, introgrese a následné splývání jednotlivých polyploidních druhů (Ehrendorfer 1965).

Kontroverzním tématem je otázka vzniku polyploidů v rodu *Knautia*. Jsou tetra- a hexaploidní taxony autopolyploidy, nebo vznikly hybridizací spojenou s allopolyploidizací? Jelikož podrobné molekulárně biologické a molekulárně-cytogenetické studie chybějí, musíme se spokojit s názory dřívějších autorů, založených na karyologických pozorováních a hybridizačních pokusech. Téměř jistě došlo v rámci rodu *Knautia* k opakované polyploidizaci (Ehrendorfer 1962a) a teoreticky tedy mohly (a mohou) hrát roli oba procesy. Ehrendorfer (1962a) nepochybuje o allopolyploidním původu řady druhů, které jasně kombinují znaky druhů z různých Wurzelgruppen (např. *K. dipsacifolia*). Na druhou stranu, například druhy *K. arvensis* a *K. drymeja* se skládají ze dvou morfologicky a ekologicky v podstatě nerozlišitelných cytotypů (Štěpánek 1972, Breton Sintes 1969, Ehrendorfer 1962b). Takovéto tetraploidy považuje Ehrendorfer (1962b, 1964) také za allopolyploidy, kteří se pouze velmi úzce přiblížily k některému z diploidních typů a „simulují“ tak autopolyploidy. Oproti tomu Breton Sintes (1974b, 1975) poukazuje na základě karyologických pozorování tetraploidních rodičovských taxonů (vysoká frekvence tetravalentů) i jejich experimentálních hybridů (bezproblémová tvorba bivalentů při meióze, vysoká fertilita) na vysokou míru podobnosti tetraploidních genomů a považuje studované tetraploidní druhy za autopolyploidy.

Zatímco většina diploidních taxonů zůstává omezena na malé reliktní areály, polyploidi se rozšířili do rozsáhlých oblastí západní, východní a severní Evropy (obr. 4). Výsledný geografický *pattern* pak připomíná situaci známou i u jiných druhů (např. *Plantago media*, Van Dijk & Bakx-Schotman 1997): Diploidní předkové ostrůvkovitě rozptýleni ve stabilních biotopech v jižně situovaných glaciálních refugiích, a nově vzniklé polyploidní taxony kolonizující labilnější biotopy v rozsáhlém postglaciálním prostoru střední a severní Evropy (Ehrendorfer 1964).

Komplikované evoluční historii odpovídá neméně složitá taxonomie v rámci sekce *Trichera*. Tu ještě ztěžuje ohromná ekologicky podmíněná plasticita morfologických znaků. Taxonomické pojetí celé sekce tak může kolísat od rozlišování nepřehledného množství druhů a subspecifických taxonů (variet, forem, cf. Szabó 1905) po extrémní tendence chápat celou sekci jako jediný široce pojatý, biologicky definovaný druh (Breton Sintes 1974b, 1975). Oba přístupy jsou do jisté míry „extremistické“ a pro praktické (tj. jiné než taxonomické) užití taxonomie rodu *Knautia* nepoužitelné. Ke spolehlivému vylišování taxonů v rámci *Knautia* sect. *Trichera* je nezbytnou nutností využívat celého souboru morfologických, cytologických a chorologických kritérií (Štěpánek 1979, 1982).



Obr. 4 – Odlišné fytogeografické situace u dvou skupin *Knautia* sect. *Trichera*. Vlevo: rozšíření *Knautia arvensis* agg. ve střední a jihovýchodní Evropě. Souvislá čára představuje jižní hranici tetraploidního cytotypu *K. arvensis* s. str. Vpravo: Areály druhů ze skupiny *Knautia velutina*. (Ehrendorfer 1962b, mírně upraveno).

## 4.2 Charakteristika skupiny *K. arvensis* agg.

Agregát taxonů v blízkosti druhu *Knautia arvensis* představuje jednu z vůbec nekomplikovanějších skupin v rámci sekce *Trichera*. Mezi charakteristické znaky těchto chřastavců patří statný vzrůst, sympodiální větvení oddenku, k tvorba postranních růžic většinou až po odkvětu, lodyžní listy proměnlivého tvaru, nejčastěji peřenoklané až peřenosečné s lyrovitým koncovým úkrojkem (avšak často také zcela nedělené) a relativně řídké, heterotrichní odění (štětinaté a pýřité chlupy) (Ehrendorfer 1962a, Štěpánek 1997).

*Knautia arvensis* agg. je souborem drobných druhů, poddruhů a lokálních ras rozšířených téměř v celém areálu rodu, s výjimkou oblastí při jeho jižní a jihovýchodní hranici (Štěpánek 1997). Hlavní příčinu vysoké variability celé skupiny můžeme spatřovat v nezvykle proměnlivé a silně provázané diploidní „základně“ celé skupiny. Na rozdíl od jiných skupin sekce *Trichera* (např. *K. velutina*), kde diploidní druhy přežívají v izolovaných reliktních areálech, představuje areál diploidů skupiny *K. arvensis* agg. souvislý pás probíhající prostorem jižní Evropy v rámci nějž jeden taxon víceméně volně přechází v druhý (Ehrendorfer 1962a). Tento stav by mohl být důsledkem pozvolné parapatrické speciace nebo splynutí v minulosti geograficky oddělených typů.

Také stanoviště, na kterých můžeme většinu diploidních taxonů *K. arvensis* agg. najít neodpovídají definicím „stabilních“ reliktních společenstev, o kterých hovoří Ehrendorfer (1962a) v souvislosti s jinými diploidními skupinami. Celá skupina *K. arvensis* agg. nalezla

své optimum v lesostepních, stepních až lučních relativně labilních společenstvech, která jsou významně ovlivňována či dokonce udržována lidskou činností (Ehrendorfer 1965).

Na proměnlivou diploidní bázi pak navazují tři pravděpodobně nezávisle vzniklé tetraploidní typy (? allotetraploidi, Ehrendorfer 1962a, 1962b). Dva z nich jsou svým výskytem omezeny na relativně malé oblasti (*K. illyrica* – širší okolí istrijského poloostrova, *K. kitaibelii* – Západní Karpaty). Třetí typ, tetraploidní cytotyp *Knautia arvensis* s. str., je asi nejúspěšnějším taxonem celého rodu, neboť osídlil rozsáhlé oblasti západní, severní a východní postglaciální Evropy a západní Sibíře (Ehrendorfer 1962a, Štěpánek 1997). Své stanovištní optimum našel na sekundárních sušších lučních stanovištích od planárního do vysokohorského stupně. Ke značné proměnlivosti tohoto taxonu přispívá kromě již zmiňovaných faktorů také rozsáhlá hybridizace spojená s tokem genů od vzdáleně příbuzného, tetraploidního cytotypu druhu *K. drymeja* (Ehrendorfer 1965).

Oba cytotypy *K. arvensis* jsou morfologicky i ekologicky takřka nerozeznatelné (Štěpánek 1972, Breton Sintes 1969, 1974a). Zajímavé je, že jejich areály alespoň na území střední Evropy téměř vikarizují (Štěpánek 1979). V místech kontaktu však byly zaznamenány smíšené populace (Breton Sintes 1969). Tetraploidní cytotyp je rozšířen na sever od Pyrenejí, jižní části Alp a Západních Karpat (Ehrendorfer 1976), kdežto diploidi se vyskytují jižně od této hranice. Mapu předpokládaného rozšíření taxonů a cytotypů z okruhu *K. arvensis* uvádí Ehrendorfer (1962b, viz obr.4). Vyobrazený údaj o výskytu diploidů ve středních Čechách je nejspíš založen pouze na neověřené domněnce (Kaplan 1998).

## 4.3 *Knautia arvensis* v České republice

Polyploidní komplex *Knautia arvensis* agg. je v České republice zastoupen dvěma druhy. Druh *Knautia arvensis* (L.) COULTER se vyskytuje takřka na celém území, vyhýbá se pouze nejvyšším horským polohám a uzavřenějším lesním komplexům (Štěpánek 1979, 1997). Z území České republiky známe diploidní i tetraploidní cytotyp tohoto druhu. Ve východní části naší republiky se roste druhý druh z tohoto komplexu, výhradně tetraploidní *Knautia kitaibelii* (SCHULT.) BORBÁS. Původní oblast výskytu tohoto chrastavce u nás pravděpodobně zahrnovala pouze pahorkatinný a podhorský stupeň Bílých Karpat a Jeseníků (Štěpánek 1997), díky rozsáhlé introgresivní hybridizaci s předchozím druhem se však jeho genetický materiál rozšířil mnohem dále na západ. Hybridní rostliny mezi druhy *K. kitaibelii* a *K. arvensis* (pouze tetraploidním cytotypem) nazývané *K. × posoniensis* DEGEN se hojně vyskytují zejména v teplejších oblastech celé východní poloviny ČR (s těžištěm výskytu ve v. Čechách a na s. a stř. Moravě), spolehlivě chybí pouze v západní polovině Čech (Štěpánek 1997). Morfologicky jdou tyto hybridy poznat podle barvy koruny (různé kombinace barev jejich rodičů – růžové až modrofialové barvy *K. arvensis* a nažloutle bílé až světle žluté *K. kitaibelii*). Ke spolehlivému odlišení hybridů od obou rodičovských taxonů lze užít také exaktnější metodu – chromatografii květních barviv, flavonoidních glykosidů (Štěpánek 1979).

Se zástupci skupiny *K. arvensis* agg. také může hybridizovat další tetraploidní chrastavec – *Knautia drymeja*. Na našem území tento druh roste na jz.a stř. Moravě, ve v. Čechách a v Posázaví; izolovaný výskyt je v údolí Labe mezi Děčínem a Pirnou (Štěpánek 1983). V rámci této oblasti můžeme nalézt hybridogenní populace vzniklé křížením s tetraploidním cytotypem *K. arvensis*, nebo s již hybridním taxonem *K. × posoniensis* (Štěpánek 1997). Hybridizace s druhem *K. drymeja* je však obecně vzácnějším jevem z důvodu ekologické diferenciace rodičovských druhů (Štěpánek 1997). Poslední český druh chrastavce, *Knautia dipsacifolia*, je na území ČR výhradně hexaploidní, můžeme tedy očekávat pouze omezené možnosti hybridizace se zástupci *K. arvensis* agg. Přesto však jsou

kříženci (odlišeni na základě morfologie) z našeho území známi z několika lokalit. Vždy se však jednalo jen o jednotlivé a pravděpodobně zcela sterilní rostliny (Štěpánek 1997).

### 4.3.1 Dva cytotypy, čtyři poddruhy

Přestože se druh *Knautia arvensis* vyskytuje v rámci České republiky takřka kontinuálně na celém území, můžeme pozorovat velmi pozoruhodnou geografickou distribuci jeho dvou cytotypů.

- V celé oblasti výskytu druhu (snad s výjimkou nejjihnější Moravy) se roztroušeně až hojně vyskytuje tetraploidní cytotyp, označovaný jako *Knautia arvensis* subsp. *arvensis*. Ekologicky se „chová“ jako typický zástupce skupiny *Knautia arvensis* agg., osidluje především sekundární, suchá až mezofilní travnatá stanoviště (louky, pastviny, okraje cest, náspy, příkopy komunikací, křovinaté lemy; Štěpánek 1997).
- Do teplých oblastí jižní Moravy proniká z jihu kontinuálně rozšířený diploidní cytotyp nazývaný *Knautia arvensis* subsp. *pannonica* (HEUFFEL) O.SCHWARZ. Morfologicky ani ekologicky ho téměř nelze odlišit od výše popisované tetraploidní nominální subspecie (Štěpánek 1979, 1982, 1985).

Kromě těchto dvou kontinuálně rozšířených cytotypů nalézáme ještě několik izolovaných diploidních populací na reliktních „ostrovech“ uvnitř souvislého areálu tetraploidní *K. arvensis* subsp. *arvensis*. K těmto diploidům je také provizorně řazeno několik tetraploidních populací z reliktních stanovišť západních Čech.

- Na karbonátovém výchozu v karu Kotelních jam v Krkonoších se vyskytuje jediná izolovaná, morfologicky velmi silně diferencovaná diploidní populace. Tento stenoendemitní taxon je nazýván *Knautia arvensis* subsp. *pseudolongifolia* (SZABÓ) O.SCHWARZ.
- Další diploidní populace obývají reliktní bory na hadcových výchozech ve Středním Posázaví, Žďárských vrších a v severním Bavorsku. Na základě morfologických a ekologických podobností jsou k těmto rostlinám řazeny ještě tetraploidní populace z mariánskolázeňských hadců. Souhrnně jsou tyto hadcové chrastavce označovány provizorním jménem *Knautia arvensis* subsp. *serpenticola* SMEJKAL ined. Nejistá je příslušnost tetraploidních rostlin z hadců v Blanském lese.

	<i>Knautia arvensis</i> subsp.			
	<i>pseudolongifolia</i>	<i>arvensis</i>	<i>pannonica</i>	<i>serpenticola</i>
žlaznatost lod. pod strbouly	ano	často	zřídka	vždy
lodyžní listy				
odění	téměř lysé	zpravidla štětinatě chlupaté a naspodu též pýřité		
stupeň dělení	peřenolaločné, peřenodílné	peřenodílné až peřenosečné		
délka konc. úkrojků	1/3–2/5 celk. délky listu	1/3–1/2 celkové délky listu		
průměr term.ího strbouly	4 cm	2,6–3,7 cm	2,6–3,5 cm	2,4–3,3 cm
délka vnějš. zákrovních l.	15–18 mm	12–16 mm	9–14 mm	14 mm
barva korun	růž.–fialově růž.	růž.–modrofial., vz. bílá	světl. růž.–modrofial.	sytě fialově nachová
délka nažek *	5,2–5,7 mm	4,2–5,1 mm	3,6–4,6 mm	4,1–4,7

Tab. 1 – Hodnoty diakritických znaků používaných k oddělení vnitrodruhových taxonů *K. arvensis* (podle Štěpánek 1997). \* = délka plodu měřena bez elaiosomu, který se při sušení smršťuje

Vzhledem k jasné geografické diferenciaci a k předpokládané silné reprodukční izolovanosti těchto skupin se užití taxonomické hodnocení v ranku poddruhu jeví jako oprávněné. Velký problém však představuje morfologické vymezení jednotlivých taxonů. S výjimkou morfologicky značně odvozené krkonošské populace jsou morfologické znaky diakriticky dosti slabé – jejich hodnoty velmi variabilní v rámci jedné skupiny a mezi jednotlivými skupinami naopak existují rozsáhlé překryvy (viz tab.1). Závěrečný verdikt tak ve většině případů musí stejně vynést geografické či cytologické kritérium.

Snadné odlišení obou cytotypů *K. arvensis* je pravděpodobně možné v pouze oblastech s patrným vlivem introgrese *K. kitaibelii*. Vzhledem k mimořádně silným reprodukčním bariérám mezi diploidy a tetraploidy (Breton Sintes 1974b), nejsou diploidní rostliny *K. arvensis* touto introgresí zasaženy a jejich květy si uchovávají původní růžovou až modrofialovou barvu.

Hlavní příčinou diskriminačních potíží je především rozsáhlá, ekologicky podmíněná plasticita v morfologických znacích. K diskuzi vlivu prostředí na morfologii a využitelnosti různých morfologických znaků při studiu evoluční historie *K. arvensis* se vrátíme v kap. 5.1.2.2)

### 4.3.2 Krkonošský endemit

Izolovaná krkonošská diploidní populace nazývaná *Knautia arvensis* subsp. *pseudolongifolia* může být podstatnou součástí evolučního příběhu našich hadcových chřastavců. Tento stenoendemitní poddruh se vyznačuje svébytnou kombinací morfologických znaků k nimž patří nedělené nebo nanejvýš peřenoklané téměř lysé listy a veliké terminální strbouly (Štěpánek 1989). Poddruhové jméno upomíná na alpsko-karpatský vysokohorský druh *K. longifolia* (náležející do jiné skupiny v rámci sekce *Trichera*), avšak zdánlivá podobnost v některých znacích je pouze důsledkem konvergentního vývoje v podobných ekologických podmínkách (Štěpánek 1989). Tendenci ke klinální variabilitě spojené se vzrůstající nadmořskou výškou některých znaků (např. velikost terminálního strboulu, velikost pylových zrn, redukce odění, nevětvenost) pozoroval Štěpánek (1979) i u jiných skupin československých chřastavců.

Celý taxon je reprezentován jedinou nepříliš početnou (250–300 jedinců) populací, která obývá hřbítek oddělující kary Velké a Malé kotelní jámy a přilehlé partie těchto jam ve výšce přibližně 1300 m.n.m. (Štěpánek & Procházka 1999). Pozoruhodná a v rámci Krkonoš značně ojedinělá je jak geologická stavba této lokality (úživné vápence a erlany), tak i společenstvo, do nějž se krkonošský chřastavec začleňuje. Většina jedinců (přibližně ¾ populace) je soustředěna do vzácné asociace sudetských skalních terások *Saxifraga oppositifoliae-Festucetum versicoloris* WAGNEROVÁ ET ŠIROVÁ 1971 (svaz *Agrostion alpinae*). Zbylá ¼ populace je rozptýlena v okolních sušších a slunnějších keříčkových společenstvech svazu *Genistion* (Štěpánek 1989). Jelikož se jedná o vzácný stenoendemitní taxon, je mu také věnována největší pozornost ochranná (kategorie C1 červeného seznamu cévnatých rostlin ČR, Holub & Procházka 2001, zvláště chráněný a kriticky ohrožený taxon, Štěpánek & Procházka 1999).

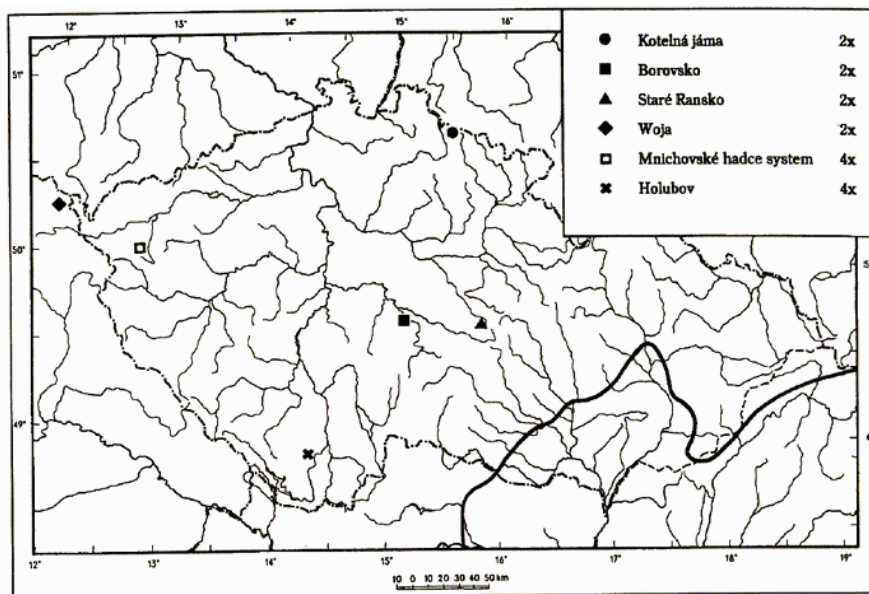
Pozoruhodná je reprodukční ekologie této populace. V jednom roce vykvétá pouze 5–15 % rostlin, přičemž v klimaticky nepříznivých sezónách většina plodů nemusí vůbec dozrát. Převažuje proto vegetativní rozmnožování větvením podzemního oddenku (Štěpánek 1989). Zvýšená klonální struktura populace s sebou může přinášet zvýšené riziko inbrední deprese prostřednictvím geitonogamie (Vange 2002). Riziko samoopylení, alespoň v rámci jedné ramety, je na druhou stranu sníženo morfologií této subspecie – zpravidla se vytváří pouze jediný veliký terminální strboulu (Štěpánek 1979).

*K. \*pseudolongifolia* je typickým příkladem rychlé alopatrické speciace, jevu zřejmě typického pro celý rod *Knautia*. Pozoruhodně silnou morfologickou i ekologickou diferenciaci tohoto taxonu v tak krátké době lze přičítat značné evoluční potenci celé skupiny působící v interakci s extrémními ekologickými podmínkami. Také malá početnost jedinců v populacích se mohla projevit v posunu variability a ve fixaci neadaptivních znaků (Štěpánek 1989).

### 4.3.3 Reliktní hadcové populace

Morfologické vyhraněnosti hadcových chrastavců si poprvé všiml M. Smejkal na lokalitě u Starého Ranska ve Žďárských vrších. Na schedách svých sběrů pro tyto rostliny použil vlastní jméno *Knautia arvensis* subsp. *serpentinicola*, které však zůstalo nepublikováno (Štěpánek 1979). Diploidní počet chromozomů u této populace zjistil J. Štěpánek (1979, 1982) a objevil také další diploidní populaci na přibližně 50 km vzdálených Dolnokralovických hadcích (u osady Borovsko). Přítomnost reliktních chrastavců na ostatních větších hadcových lokalitách v ČR a v přilehlých oblastech Německa zjišťoval Kaplan (1998). Poblíž osady Woja v severním Bavorsku objevil populaci diploidů. Další, tentokrát však tetraploidní rostliny našel na serpentinech ve Slavkovském lese (je zajímavé, že dvě populace z hadců Slavkovského lesa („Vlček“ a „Mnichov“=Pluhův bor) studoval již Štěpánek, neodlišoval je však od běžného nehadcového tetraploidního cytotypu). Tetraploidní chrastavce rostou také na hadcích u Holubova v Blanském lese, jejich postavení je však nejisté. Kaplan (1998) u rostlin této populace zaznamenal výrazné morfologické odchylky (z velké části se však jedná o záměnu s *K. dipsacifolia*, viz dále), avšak ani Štěpánek (1997) Holubovské hadce v přehledu lokalit *K. \*serpentinicola* neuvádí.

Na hadcích u Mohelna se podařilo nalézt pouze hybridní roj *K. \*arvensis* a *K. drymeja* (v okrajových partiích). Kaplan (1998) nevyklučuje, že se zde tetraploidní hadcová populace dříve mohla vyskytovat, avšak došlo k jejímu „rozplynutí“ v důsledku introgrese s *K. drymeja*. Na ostatních českých serpentinech nebyl výskyt hadcových chrastavců potvrzen, nanejvýš se zde vyskytovaly ojedinělé rostliny *K. \*arvensis* recentně zavlečené podél lesních komunikací.



Obr. 5. – Rozšíření jednotlivých cytotypů a reliktních populací *K. arvensis* v ČR (a přilehlém Bavorsku). Plné kolečko (Kotelná jáma) značí lokalitu *K. \*pseudolongifolia*, ostatní body reprezentují jednotlivé hadcové populace. Souvislá čára označuje předpokládanou severní hranici diploidního poddruhu *K. \*pannonica* (Kaplan 1998).

Hadcové populace jeví jistý stupeň morfologické diference a to jak oproti ostatním taxonům v rámci *K. arvensis*, tak i vůči sobě navzájem (Štěpánek 1979, 1982, Kaplan 1998). Kvantitativní znaky ± korelující se stupněm ploidie přibližují tento taxon (a to včetně tetraploidních mariánskolázeňských populací) diploidnímu poddruhu *K. \*pannonica* (Kaplan 1998, Štěpánek 1997). Přímý vztah s těmito panonskými diploidy však Štěpánek (1979) nepředpokládá. Kaplan (1998) kromě těchto ploidně ± korelovaných charakteristik uvádí také soubor znaků, který do určité míry odlišuje jednotlivé hadcové populace od sebe (podrobněji viz kap. 5.1.2.2). Celkem pět znaků pocházejících z obou těchto souborů pak bylo využito v mnohorozměrné analýze PCA (celkem 142 jedinců z poddruhů *K\* serpentinicola* (6 populací), *K \*pannonica* a *K \*arvensis*). První osa PCA naznačuje korelaci s ploidní úrovní, avšak mezi třemi poddruhy existují silné překryvy. Jedinci z různých populací *K. \*serpentinicola* jsou navzájem značně promíšeni a tendence korelace s ploidní úrovní je v rámci tohoto taxonu již méně patrná.

Problematická (a z analýzy PCA vyloučená) byla populace z hadců Blanského lesa (Holubovské hadce), jejíž zástupci spíše než *K. arvensis* připomínali druh *K. dipsacifolia* (Kaplan 1998). Vysvětlení přinesla až cytometrická analýza prováděná v rámci této bakalářské práce. Všechny zkoumané rostliny (vyjma několika zavlečených jedinců) náležely k hexaploidní *K. dipsacifolia*. Dvě rostliny, které byly podrobené karyologické analýze (s výsledkem 4x) se vyskytovaly v jiné části lokality, a jejich výskyt již nebyl znovu ověřen (Kaplan, pers. comm.). Na nedaleké hadcové lokalitě v PP Bořinka však rostou tetraploidní rostliny z okruhu *K. arvensis* (vlastní pozorování).

Další charakteristikou, která je v souvislosti s hadcovými chrastavci často zmiňována je intenzivně tmavočervená až červenofialová barva koruny (Štěpánek 1982, 1997, Kaplan 1998). Ostatní poddruhy z okruhu *K. arvensis* přitom mají květy světlejších odstínů (ružové až modrofialové, Štěpánek 1997).

Specifická ekologie a cenologické vazby poddruhu *K. \* serpentinicola* jsou značně odlišné od ostatních poddruhů *K. arvensis*. Hadcové chrastavce osidlují především světlé reliktních bory, lesní světliny a okraje cest na skeletovitých minerálně bohatých hadcových půdách (Štěpánek 1997).

#### 4.3.4 Evoluční hypotéza

Současná komplikovaná geograficko-ekologická distribuce cytotypů druhu *Knautia arvensis* v rámci ČR nejspíš souvisí s postglaciálním vývojem středoevropské krajiny a vegetace (Štěpánek 1989, Kaplan 1998). V dobách, kdy v prostoru střední Evropy převažovala nelesní vegetace, ale panovalo již relativně příznivé podnebí (preboreál, boreál) se do této oblasti rozšířil diploidní cytotyp. Později byly diploidní chrastavce jako prvek nelesní vegetace zatlačeny zapojenějšími lesními formacemi na extrémní stanoviště nevhodná k uchycení zonální vegetace (hadcové výchozy, subalpínské polohy) (Štěpánek 1989). V těchto refugiích se diploidní rostliny přizpůsobily novým stresujícím podmínkám (vysokohorské prostředí, hadcový substrát) a zapojily se do zdejších reliktních společenstev (hadcové bory, subalpínské skalky a trávníky). Oblast souvislejšího rozšíření se u diploidního cytotypu zachovala pouze v jižnějších částech Evropy (nejblíže asi v panonské pánvi, obr. 4). Došlo tak k prostorové a ekologické izolaci reliktních populací od jejich původního předka (Kaplan 1998). Díky tomu se začaly uplatňovat alopatrické mikrospeciální procesy, jejichž vliv mohl být ještě umocněn extrémními životními podmínkami a také malou početností jedinců v populacích (Štěpánek 1989).

V pozdějších dobách začal při formování krajiny nabývat na významu vliv člověka a do nově odlesněných oblastí se rozšířil úspěšnější allochtonně vzniklý tetraploidní cytotyp. Vzhledem k téměř dokonalým reprodukčním bariérám mezi jedinci různých ploidii

nedocházelo ke kontaktu s reliktními diploidy (Štěpánek 1979, 1997) a tito se mohli i nadále „nerušeně“ vyvíjet v izolaci.

Nastíněná hypotéza však nevysvětluje postavení tetraploidních rostlin z hadců Slavkovského lesa (popř. i z Blanského lesa). Jedná se pouze o běžný tetraploidní cytotyp, který se přizpůsobil hadcovému substrátu? Nebo to jsou pozůstatky původních reliktních diploidů, kteří prošli nezávislou polyploidizační událostí? Kaplan (1998) se alespoň v případě mariánskolázeňských rostlin přiklání spíše k druhé variantě a dokládá to následujícími skutečnostmi:

- Obdobné „chování“ 2x a 4x ve společenstvu (začlenění do reliktních borů)
- Podobná barva koruny (intenzivně červenofialová)
- Obligátní přítomnost žlázek pod strbouly (u ostatních skupin je variabilní)
- Spíše „diploidní“ hodnoty u znaků korelujících ± s ploidií (na základě PCA, viz výše)
- Zachování základního vzhledu i při kultivaci v běžném substrátu

### 4.3.5 Hadcová tolerance u *K. arvensis*

Otázka tolerance *K. arvensis* ke specifickým podmínkám hadcového substrátu zatím zůstává otevřená. Výše nastíněné evoluční schéma ukazuje nutně na opakované vytvoření tolerance. Je však také možné, že chrastavce se specifickým podmínkám hadcového substrátu vůbec nemusí přizpůsobovat. Celá řada rostlin je ke vlivu hadcového substrátu indiferentní (tzv. *bodenvag species*, Kruckeberg 1984). Experimentálně byla odolnost k hadcovému substrátu i u nehadcových rostlin prokázána např. u *Silene dioica* (Westerbergh & Rune 1996). Variantě hadcové „indiference“ však odporuje ekologické „chování“ tetraploidních rostlin *K. \*arvensis* recentně zavlečených do hadcových území (Kaplan 1998). Tyto rostliny sice byly zaznamenány na řadě hadcových těles (včetně těch, která hostí reliktní populace *K. \*serpentinicola*), avšak vždy zůstávaly pouze v bezprostřední blízkosti člověkem pozměněných míst (např. lesní cesty) a nikdy nepronikaly do přirozených reliktních společenstev (Kaplan 1998). Na základě několika takovýchto pozorování však nelze vynést definitivní soud a vyřešení otázky serpentinní tolerance u *K. arvensis* by vyžadovalo důkladných experimentálních studií, především vysévacích a přesazovacích pokusů (Kruckeberg 1954) nebo experimentů s klíčením (Nyberg Berglund et al. 2003).

## 4.4 Otázky

Při pohledu na složité geografické a ekologické *pattern* druhu *K. arvensis* na území ČR se nabízí ohromné množství možných otázek týkajících se širokého spektra vědních oborů od fyto geografie, přes ochranářskou biologii až po ekofyziologii. My se zaměříme na problémy týkající se evoluční historie tohoto komplexu ve střední Evropě, především na fylogeografii. Pohlížíme-li na fylogeografii jako na hraniční obor mezi systematikou a populační genetikou (Avice et al. 1987), můžeme si okruh otázek přibližně rozdělit do následujících skupin

Dílčí systematicko-fylogenetické otázky

- Jaké jsou vzájemné vztahy diploidních taxonů / populací?
- Jak do vztahů mezi diploidy zapadají polyploidní taxony / populace?
- Je taxon *Knautia arvensis* subsp. *serpentinicola* v současném pojetí (Štěpánek 1997) monofyletický?



## Dílčí populačně biologické otázky

- Jaká je genetická a cytologická struktura reliktních populací?
- Jaký je rozsah morfologické, cytologické a molekulární variability u těchto reliktních populací? Liší se v těchto charakteristikách od populací kontinuálně rozšířených poddruhů?
- Jak se u reliktních diploidních populací projevuje vliv reprodukční i geografické izolace? Může v jejich evoluci hrát roli genetický drift?
- Jsou reliktní diploidní populace skutečně zcela izolované od okolních nehadcových tetraploidních populací nebo může docházet alespoň k omezenému genovému toku např. prostřednictvím neredukovaných gamet a triploidního mostu?
- Jaká je míra genového toku mezi hadcovými a nehadcovými tetraploidy? Dochází k toku genů mezi příslušníky reliktních populací v hadcovém „souostroví“ ve Slavkovském lese?

## Souhrmné evolučně-fylogeografické otázky

- Lze (alespoň do určité míry) potvrdit schéma evoluční historie reliktních populací nastíněné v kap. 4.3.4?
- Došlo na hadcích ve Slavkovském lese k nezávislé polyploidizační události?
- Existuje korelace mezi geografickou a genetickou vzdáleností v rámci *K. \*serpentinicola* popř. v rámci celého komplexu *K. arvensis* agg.?
- Uplatnily se v průběhu nezávislé evoluce izolovaných populací uplatnit mechanismy spojené s jejich omezenou velikostí (genetický drift, *bottle-neck* efekt)?
- Nedošlo v průběhu složité evoluční historie komplexu ke změnám ve velikosti genomu na téže ploidní úrovni?
- Jak vypadá současná kontaktní zóna *K. \*arvensis* a *K. \*pannonica* – existují zde smíšené populace obou ploidíí, dochází zde k toku genů?
- Jak se projevuje na úrovni velikosti genomu a genetické variability introgresivní chování tetraploidů (především *K. kitaibelii* a možná introgrese hadcových a nehadcových tetraploidů)?

## 5. Metody

Úspěšné a přesvědčivé zodpovězení nastíněných otázek umožní pouze aplikace více vhodně zvolených metod. Kombinací jejich výsledků bychom měli být schopni objasnit řadu aspektů spletité evoluční historie reliktních populací *Knautia arvensis*. Kritické porovnání případných odlišných výsledků pomůže odhalit možné metodické chyby a artefakty u některého z přístupů

Popsat a kriticky zhodnotit možnosti a limitace všech v současnosti dostupných metod, které by bylo možné využít k řešení našeho problému, by samozřejmě značně přesahovalo rámec bakalářské práce. V následující části proto zaměříme pozornost na metody, které skutečně jsou a budou využívány v souvislosti se studiem evoluční historie *K. arvensis*, neboť byly zahrnuty do úspěšného návrhu badatelského projektu GA AV. V případě morfometrie a průtokové cytometrie jsou již k dispozici první průběžné výsledky, na nichž bude možné demonstrovat konkrétní přínosy dané metody pro studium *K. arvensis*. Molekulární DNA-metody (AFLP, sekvenování) jsou bohužel zatím pouze ve fázi optimalizace, v předkládané práci proto budou nastíněny pouze jejich příklady využití získané z literatury.

## 5.1 Morfologické přístupy

Morfologie společně s karyologií představují základ pro taxonomické hodnocení v rodě *Knautia*. Studium vhodných determinačních znaků je proto nezbytné pro pochopení celé problematiky v kontextu dřívějších prací. Detailní znalost morfologické variability může být velmi podstatná např. pro případné vymezení taxonu *Knautia arvensis* subsp. *serpentinicola* (dosavadní pojetí je pouze provizorní). Pro potvrzení monofyletické podstaty tohoto taxonu, stejně jako pro studium jeho evoluční historie však budou nejpodstatnější molekulární biologické přístupy.

Využití morfologických znaků při odvozování příbuzenských vztahů naráží na celou řadu obtíží. Předně, hodnoty morfologických znaků nejsou určovány jen genetickým základem, ale jsou pod silným vlivem okolního prostředí. Oddělení genetiky podmíněného základu od fenotypické plasticity však často představuje nelehký úkol. Valná většina morfologických znaků také není selekčně neutrální. Další problém představuje fakt, že mnohé znaky bývají řízeny jen malým množstvím genů (velkého účinku) – mutace v některém z těchto genů tak může vést k rozsáhlým morfologickým změnám i v rámci blízce příbuzných taxonů (viz příklad v rodě *Layia* popisovaný v kap. 3.2.2.1). Morfologická divergence pak může mít jen málo společného s genetickou diferenciací mezi jednotlivými liniemi (Schaal et al. 1998, Briggs & Walters 2001).

Tradiční morfometrické přístupy spočívají na kvantitativním zhodnocení sady předem vybraných morfologických charakteristik. Hodnoty znaků jsou porovnávány jednorozměrnými (např. ANOVA) a zejména pak mnohorozměrnými statistickými metodami (PCA, diskriminační analýza, klastrovací analýzy, blíže viz Marhold & Suda 2002).

### 5.1.1 Geometrická morfometrie

Díky spojení rozvíjející se výpočetní techniky a nových statistických metod se v průběhu devadesátých let plně zformoval nový mocný nástroj pro zkoumání morfologických znaků – geometrická morfometrie. Hlavní oblasti, v nichž geometrická morfometrie značně předstihne „klasické“ přístupy jsou následující (Adams et al. 2004, Macholán 1999, Těšitel 2005):

- Zatímco klasické morfometrické metody přistupují k popisu tvaru objektů pomocí rozkladu na omezené množství *a priori* zvolených rozměrů, geometrická morfometrie „pracuje“ se tvarem jako celkem. Dochází tedy k podstatně menší ztrátě informace o tvaru.
- Protože v průběhu analýzy nedochází k odstranění geometrické informace, je možné v závěru „zpětně“ získat i přímé vykreslení tvarů, a to včetně nezávislých trendů v jejich variabilitě, rozdílů mezi skupinami apod.
- V průběhu standardizace a „přípravy“ objektu ke statistické analýze dochází k oddělení informace o tvaru od informace o jeho velikosti. Vlastní analýza tak pracuje pouze s tvarem nezatíženým rozměrovou chybou. Informaci o velikosti je pak možné využít jako další nezávislou proměnnou.
- Pracovní postup geometrické morfometrie je obvykle výrazně rychlejší; časově náročnější fází může být pouze příprava objektu k digitalizaci

V závislosti na charakteru tvaru studovaných objektů jsou využívány dva základní metodické přístupy. Prvním typem jsou obrysové analýzy, které jsou vhodné k popisu méně komplikovaných tvarů, kde je však třeba zachytit i rozdíly spočívající ve velmi jemných odchylkách proporcí – například vejčité listy (Těšitel 2005). Nejčastěji je využívána tzv.

eliptická Fourierova analýza. Základním principem Fourierovy analýzy je převedení zkoumaných obrysů na funkci, která je definována jako série sinových a kosinových funkcí, tzv. harmonických složek. Každá následující harmonická složka popisuje menší detaily ve tvaru objektu. Jako předmět analýz pak slouží parametry harmonických složek nazývané koeficienty Fourierových funkcí (Zima & Macholán 2004). Jednou z výhod Fourierovy analýzy je velmi snadné oddělení symetrické a nesymetrické složky variability. Tento přístup využili např. Yoshioka et al. (2004), kteří v obrysové analýze korunních lístků různých kultivarů *Primula sieboldii* zjistili silnou genetickou podstatu symetrické složky, zatímco asymetrická složka variability byla zásadně ovlivněná prostředím. Geometrická morfometrie tak otevírá jedinečnou cestu k efektivnímu hodnocení fenotypické plasticity v morfologických znacích. Základním softwarem pro provádění Fourierovy eliptické analýzy je program SHAPE (Iwata & Ukai 2002, <http://cse.naro.affrc.go.jp/iwatah/shape/>).

Pokud je na studovaných objektech možné definovat nějaké význačné, homologní body (*landmarks*), je většinou vhodnější využít přístupy založené na analýze těchto bodů. Omezení *landmark-based* metod v neschopnosti popsat tvarově nevýraznou (např. oblou) část objektu (na niž není možné vyčlenit nějaké pevné body), bylo překonáno zavedením částečně pohyblivých bodů, *sliding semilandmarks* (Adams et al. 2004). Ještě před vlastní analýzou je nutné jednotlivé objekty usprádat tak, aby si jejich homologní body co nejlépe odpovídaly – k tomu slouží tzv. Prokrustovská superimpozice (detaily viz Neustupa 2006). K porovnání tvarových rozdílů (deformací) mezi objekty pak slouží tzv. metoda ohebných pásků (*thin plate spline*), která v analogii s principy mechaniky přiřazuje změnám konstituce význačných bodů tzv. deformační energii (čím je změna lokálnější, tím je tato energie větší – obdobně delší pásek z plechu ohneme snáze než kratší). Pro větší počet objektů než dva lze použít analýzu relativních deformací (*thin plate spline relative warps*, TPSRW), která je z ní odvozena. Ta spočívá v sumarizaci matice tzv. parciálních deformací každého bodu procesem obdobným analýze hlavních komponent (Zima & Macholán 2004). Vhodným programovým balíkem k provedení výše popsaného typu *landmark-based* metod je software TPS (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)

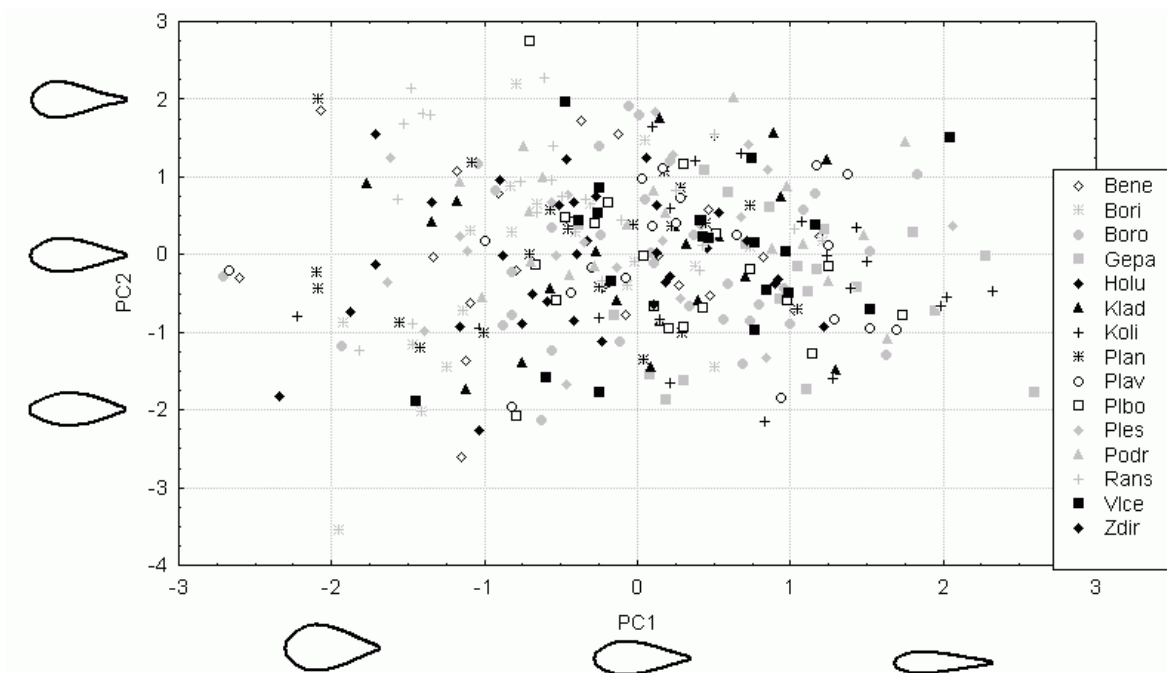
## 5.1.2 Morfologie v případě Knautia

### 5.1.2.1 Pilotní morfologický průzkum – obrysová analýza zákrovních listenů

Metody: Během sezóny 2006 byly sebrány populační vzorky (vždy ca po 20 rostlinách) z 15 lokalit v České a Slovenské republice (celkem 310 rostlin). Přehled lokalit populačních sběrů a jejich charakteristik co se týče ploidie a substrátu shrnuje následující tabulka (podrobnosti v příloze na konci práce):

Hadcové, diploidní	Borovsko, Staré Ransko
Hadcové, tetraploidní	Bořinka (Křemže), Planý vrch, Vlček, Pluhův bor
Nehadcové, diploidní (vše SR)	Kolíňany, Podrečany, Gemerská Panica, Plešivec
Nehadcové, tetraploidní	Benešov n. Černou, Planá u Mar. Lázní, Ždírec n. Doubravou, Kladská, Holubov

Z terminálního strboulu každé studované rostliny byly sebrány první čtyři vnější zákrovní listeny a naskenovány. S pomocí programového balíku SHAPE (Iwata & Ukai 2002) byla provedena analýza obrysu využívající eliptických Fourierových deskriptorů. Hodnoty koeficientů normalizovaných eliptických Fourierových deskriptorů (tj. hodnoty analyzované v PCA) pro čtyři listeny náležející stejné rostlině byly vždy zprůměrovány. Body ve výsledné PCA tedy charakterizují jednotlivé jedince.



Obr. 6 – Analýza hlavních komponent (PCA) s využitím hodnot normalizovaných eliptických Fourierových deskriptorů (průměrné hodnoty 4 vnějších listenů pro 310 rostlin). Analyzována byla symetrická složka variability pro prvních 20 harmonických složek. První dvě osy vysvětlují 96,3 % celkové variability souboru (první osa samotná 87,8 %). Šedé symboly – 2x cytotypy, černé symboly – 4x cytotypy. U os je vždy vyneseno průměrný tvar listenu a odchylky  $\pm 2$  SD podél dané osy (měřítko odpovídá jednotkách SD).

Z diagramu na obr. 6 je zřejmé, že jednotlivé skupiny okruhu *Knautia arvensis* se ve tvaru listenů příliš neliší, ačkoliv daný znak bývá často udáván jako taxonomicky významný. Variabilita v tomto znaku je vysoká, 2x a 4x jedinci příslušející jak hadcovým tak nehadcovým populacím jsou rozmístěni a promíšeni v celém ordinačním prostoru. Ani rozdíly mezi jednotlivými populacemi nejsou zvláště patrné.

### 5.1.2.2 Diskuze k morfologickým znakům *K. arvensis*

Výše uvedený pilotní průzkum poukázal na fakt, že ne všechny znaky, které bývají v literatuře uváděny jako diskriminační, mohou být bez výhrady považovány za spolehlivé. Proto, než bude přistoupeno k rozsáhlejšímu zhodnocení morfologické variability *Knautia arvensis*, může být vysoce přínosné shrnout, porovnat a prodiskutovat již známé poznatky o morfologické proměnlivosti z dostupných pramenů. Morfologickému studiu *Knautia arvensis* se na našem území věnovalo již několik obsáhlejších studií (Štěpánek 1979, Štěpánek 1982, Štěpánek 1997, Kaplan 1998).

#### **Variabilita v morfologických znacích**

*Knautia arvensis* je morfologicky velmi variabilní druh. Příčiny i projevy této variability jsou často velmi komplexního charakteru. K ekomorfózám a individuálně podmíněným odchylkám se u tetraploidních rostlin přidává ještě vliv hybridizace, která je často spojena s introgresí (Štěpánek 1979, 1997). Rozsáhlá variabilita pak může snadno překrýt determinačně nebo systematicky informativní, geneticky podmíněné rozdíly v morfologických znacích.

Problémy při morfologickém studiu může způsobovat již výrazná proměnlivost mezi modulárními orgány v rámci téže rostliny. Tvar a velikost listu jsou závislé na jeho postavení

na lodyze (Štěpánek 1979) a ne vždy je možné jasně homologizovat „tytéž“ listy u různých jedinců (délka lodyhy a počet internodií jsou velmi variabilní). Pro srovnávání reprodukčních orgánů je zase nutné využívat pouze terminálního strboulu, což s sebou nese ten problém, že není možné v jednom čase na témž jedinci zaznamenat důležité diakritické znaky na kvetoucích květenstvích i plodech.

Rozsáhlejší diskuzi k mezipopulační variabilitě a s tím souvisejícími možnostmi odlišení jednotlivých skupin v rámci *Knautia arvensis* uvádí Štěpánek (1979, potažmo 1982). Ponecháme-li stranou reliktní diploidní populace z Čech, dochází k závěru, že spolehlivé odlišení obou cytotypů pouze na základě morfologie je nemožné (viz též tab. 1). S tím se shodují i výsledky morfologických analýz rostlin z Francie (Breton Sintes 1974a)\*. Na druhou stranu Štěpánek (1979) přiznává, že zde existují jisté slabé tendenční rozdíly v některých kvantitativních znacích (velikost strboulů, délka zákrovních listenů, délka plodů, velikost průduchů, velikost pylových zrn). Určité trendy v cytotypové odlišnosti ukázala též mnohorozměrná analýza PCA (Kaplan 1998). Diagnostická hodnota těchto znaků je však snížena v zásadě dvěma faktory (Štěpánek 1979):

- Ačkoliv se liší průměrné hodnoty těchto znaků, především mezipopulační variabilita je tak vysoká, že zastírá jejich význam. Mnohé populace se pak v hodnotách toho či onoho znaku chovají zcela „v rozporu“ se svou ploidní úrovní.
- Mnohé tyto „znaky“ jsou pouhým projevem fenotypové plasticity a ve společných kultivacích se rozdíly v jejich hodnotách ztrácejí (např. délka zákrovních listenů).

U fenotypické plasticity *K. arvensis* se ještě krátce zastavíme. Mezi znaky silně ovlivňované ekologickými faktory patří zejména výška a větvení lodyhy, velikost, tvar a míra dělení listů, konzistence listů, velikost průduchů a délka zákrovních listenů (Štěpánek 1979). Nejčastějšími faktory, které na formování těchto znaků mají vliv jsou světelné a vlhkostní podmínky stanoviště. Rostliny ze zastíněných stanovišť jsou zpravidla menšího, gracilnějšího vzrůstu, se všemi listy nedělenými, chabější konzistence. Také rostliny ze suchých míst se vyznačují menším vzrůstem a s tím souvisejícími charakteristikami (méně větvené lodyhy, menší listy s méně úkrojky, Štěpánek 1979).

Další skupina znaků také vykazuje velkou vnitro- či mezipopulační variabilitu, není však dávana do přímé souvislosti s nějakou konkrétní ekologickou příčinou. Sem patří např. rozložení listů na lodyze či přítomnost a hustota žlázek pod květenstvím. Mezi vnitropopulačně nestálé můžeme počítat i znaky morfologicky odchylných samičích jedinců – tyto rostliny jsou nápadně především menšími, řidšími strbouly složenými z nepaprskujících květů s redukovanými tyčinkami (Štěpánek 1979, 1997). Pokud je naším primárním zájmem postihnout genetickou podstatu morfologických znaků, je vhodné se při terénním sběru materiálu vyhýbat především napadeným a poškozeným rostlinám a také funkčně samičím jedincům, sciomorfózám, a rostlinám ze zvláště suchých míst (což je dvojnásob důležité u většinou suchých hadcových lokalit).

Další vhléd do problematiky fenotypické plasticity by měl přinést orientační kultivační experiment založený v minulém roce na pozemcích Katedry Botaniky BF JČU. Z několika populací lišících se ploidií a typem substrátu (hadec/jiné horniny) bylo vybráno po ca 5 kvetoucích jedincích s postranními růžicemi. Kvetoucí část byla standardním způsobem připravena k morfologickým analýzám a zbylá část rostliny byla (po oklepání větší části kořenového balu) zasazena do běžného zahradnického substrátu. Vyhodnocení tohoto experimentu bude možné až v průběhu letošní sezóny.

---

\* Pozoruhodné je, že vysledované znaky, kterými by se oba cytotypy francouzské *K. arvensis* mohly lišit (tvar koncového úkrojku na 2. nejvyšším lodyžním listu; počet kališních štětín; Bereton Sintes 1974a) jsou zcela odlišné od znaků, které jsou k odlišení využívány ve střední Evropě (viz tab. 1).

Pokud zde skutečně existují dědičné znaky, vymezující ten který cytotyp/poddruh/populaci, jsou tedy ve velké většině pravděpodobně zkrsleny lokálními ekologickými podmínkami. V tom případě je nutné podřídit sběr dat konkrétní otázce, na kterou by mělo morfologické studium odpovědět.

- 1) Snažíme se zachytit a porovnat celkovou míru variability, kterou se daná populace vyznačuje (malé a izolované populace by např. mohly vykazovat menší míru variability), popřípadě se budeme snažit vytvořit determinační klíč k určení těchto typů přímo v terénu (např. Štěpánek 1979). V tom případě je nutné studovat rostliny sebrané přímo na dané lokalitě a populační sběr provést s ohledem na zachycení pokud možno „celé“ škály variability (samozřejmě s výjimkou nápadně poškozených nebo napadených rostlin).
- 2) Naší hlavní snahou je využít morfologických znaků k odhalení/potvrzení fylogenetických vztahů v dané skupině (např. porovnání s výsledky molekulárních analýz). V tomto případě bychom se měli snažit pokud možno co nejlépe odlišit genetickou složku variability od ekologicky podmíněné stanovištní plasticity, což nám asi nejlépe umožní společná kultivace studovaných rostlin ve stejných standardních podmínkách (Briggs & Walters 2001). Zásadním problémem kultivačních experimentů je však velká časová, materiální i fyzická náročnost. V kombinaci s poměrně složitým cytologicko-geografickým *pattern* studované skupiny, a z toho vyplývající nutností sebrat poměrně velké množství populačních vzorků, je možnost kultivačního experimentu kapacitně takřka nemožná

### **Použitelné diagnostické znaky v rámci druhu *Knautia arvensis***

Podívejme se nyní na celý problém variability z druhé strany. Jaké znaky jsou geneticky podmíněné a zároveň nejsou tak silně variabilní a plastické, aby nemohly být využitelné pro odlišení jednotlivých skupin v rámci *K. arvensis*? Následující přehled vychází z důkladného rozboru morfologických znaků, který provedl Štěpánek (1979) na území Československa.

- Přítomnost přízemních listových růžic. Přezimující přízemní listové růžice se v případě druhu *K. arvensis* vytvářejí až na konci vegetační sezóny (v kontrastu s *K. kitaibelii*). V průběhu kvetení byly růžice pozorovány i u obou diploidních hadcových populací (u Borovska pravidelně, u St. Ranska někdy) (Štěpánek 1979).
- Tvar lodyžních listů. Tento znak je vhodný k odlišení *K. \*pseudolongifolia* a údajně i jednotlivých populací *K. \*serpentinicola* (diskuze viz další oddíl). Obecně však podléhá velmi silné variabilitě v závislosti na konkrétních stanovištních podmínkách. Téměř ve všech populacích je možné nalézt rostliny, u nichž jsou všechny listy nedělené (Štěpánek 1979). Naopak Kaplan (1998) několik charakteristik lodyžních listů (délka, poměr délky a šířky, poměr délky koncového úkroju ku celkové délce) využil k částečnému odlišení cytotypů a hadcových populací v analýze PCA.
- Přítomnost (a hustota) žlázek pod květenstvím je velmi proměnlivý znak na vnitro- i mezipopulační úrovni. Uvádí se však, že u *K. \*pannonica* se žlásky vyskytují pouze zřídka a naopak u *K. \*serpentinicola* je jejich výskyt pravidlem (Štěpánek 1979, 1997, Kaplan 1998)
- Průměr terminálního strboulu (= vzdálenost mezi vnějšími okraji paprskujících korun okrajových květů). Tento znak je u rodu *Knautia* obecně korelován s nadmořskou výškou – taxony z horských a vysokohorských poloh (bez ohledu na vzájemnou příbuznost) se vyznačují velkými terminálními strbouly. To platí i pro krkonošskou populaci *K. \*pseudolongifolia*. Již značně slabší se jevila jeho korelace s ploidií (diagnostická hodnota tohoto znaku byla v této souvislosti označena za „mizivou“, Štěpánek 1979). S tímto závěrem kontrastuje pozdější zařazení tohoto znaku do

determinačního klíče (rozhodující mezi *K. \*serpentinicola* a *K. \*pannonica*, Štěpánek 1997) a do PCA analýzy hadcových populací (Kaplan 1998)

- Délka vnějších zákrovních listenů (terminálního strboulu). Tento znak dosahoval nápadně nízkých hodnot u diploidních nehadcových populací. Ovšem při společné kultivaci došlo ke setření rozdílů (diploidní rostliny se „vyrovnaly“ ostatním). Pozorovaná tendence ke klinální variabilitě ve vztahu k nadmořské výšce by mohla být vysvětlena celkově většími strboulou u horských rostlin (Štěpánek 1979). Délka zákrovních listenů je diakritickým znakem v určovacím klíči (Štěpánek 1997) a byla také použita do PCA analýzy (Kaplan 1998)
- Velikost pylových zrn. Ze znaků, u nichž se předpokládá korelace s ploidní úrovní se tento jevil jako nejspolehlivější. I přesto se však naměřené hodnoty ve velké oblasti překrývaly a celková proměnlivost byla veliká. Zajímavé je, že jedinou tetraploidní populací, která ve velikosti pylových zrn výrazně vybočovala směrem k „diploidním“ hodnotám byla populace „Vlček“ z mariánskolázeňských hadců (u druhé studované tetraploidní hadcové populace nebyla velikost pylových zrn měřena, Štěpánek 1979). Štěpánek (1979) si také všiml určitých rozdílů ve skulptuře exiny (exina tetraploidů měla vesměs hustší pokryv z mohutnějších ostének). Ehrendorfer (1962a) dospěl k závěru, že velikost pylových zrn sice je korelovaná se stupněm ploidie, avšak rozdíly mezi jednotlivými taxony mohou tento trend překrýt.
- Délka svěracích buněk průduchů. U tohoto znaku se projevila celková závislost na stupni ploidie, avšak zároveň se ukázala i velká proměnlivost v jeho hodnotách (zřejmě vliv ekologických podmínek). Některé diploidní populace se velikostí plně vyrovnávaly tetraploidům a naopak (Štěpánek 1979).
- Délka plodů (měřena bez elaiosomu, který se při sušení smršťuje). Také v hodnotách tohoto znaku bylo lze pozorovat jistou korelaci se stupněm ploidie a také se vzrůstající nadmořskou výškou (? opět souvislost s většími úbory horských rostlin), nejevila však příliš vysokou diagnostickou hodnotu (Štěpánek 1979). V kontrastu s tímto poznatkem je tento znak opět využíván v determinačním klíči (mj. právě k odlišení tetraploidní *K. \*arvensis* od převážně diploidní skupiny *K. \*pannonica* + *K. \*serpentinicola*; Štěpánek 1997)

Je vidět, že jednotlivé studie si v některých směrech poměrně silně odporují. Hlavní příčinou těchto rozporů nejspíš bude rozsáhlá morfologická variabilita, k níž se mohl přidat vliv ekologických podmínek na konkrétních lokalitách a odlišný způsob sběru vzorků různými autory.

### **Morfologická variabilita reliktních hadcových populací**

Ne zcela jednoznačná situace panuje také v otázkách morfologie reliktních hadcových populací *K. arvensis*. O tom, že jsou tyto populace morfologicky diferencované jak od ostatních populací *K. arvensis*, tak i vzájemně od sebe, hovoří Štěpánek (1979, 1982) i Kaplan (1998). Důležité znaky, jejichž základě autoři toto tvrzení staví, jsou následující:

- Štěpánek (1979, 1982) – „statnost“ rostliny, velikost, celkový tvar a míra dělení listů, velikost a barva strboulů. Populace ze Slavkovského lesa (Vlček, Mnichov = Pluhův bor) autor neodlišuje od běžného tetraploidního cytotypu (= *K. \*arvensis*)
- Kaplan (1998)
  - znaky korelující s ploidí (které *K. \*serpentinicola* – 2x i 4x – sdílí s *K. \*pannonica*): velikost strboulů, délka zákrovních listenů, délka listů
  - znaky do určité míry vymezující jednotlivé populace: celkový tvar listu, délka a šířka úkrojků, poměr délky koncového úkroju k celkové délce listu

- tmavě červená barva koruny je typickým znakem pro celý taxon *K. \*serpentinicola*

Řada těchto charakteristik však patří mezi znaky silně ovlivněné stanovištními podmínkami (statnost rostliny, tvar, míra dělení a velikost listů; viz výše). Je však možné, že v reprodukčně izolovaných populacích došlo (např. vlivem genetického driftu) k posunu a zafixování pouhého „výseku“ celkové variability těchto znaků, a potom by kombinovaný soubor těchto znaků mohl mít jistou výpovědní hodnotu. Na druhou stranu, například malý gracilní vzrůst rostlin z Dolnokralovických hadců by mohl být vysvětlen velmi suchým charakterem stanoviště, v němž byl J. Štěpánkem sbírán (otevřené bory s porosty *Festuca ovina*, Štěpánek 1979). V jiných, vlhčích partiích tohoto hadcového tělesa lze nalézt rostliny vyšší, s bohatě dělenými listy (vlastní pozorování).

Zdá se, že jediným znakem, vymežujícím *K. arvensis* subsp. *serpentinicola*, na kterém se shodují všichni autoři (Štěpánek 1982, 1997, Kaplan 1998) je nápadná červenofialová barva koruny. Do chemotaxonomických analýz květních barviv Štěpánek (1979) bohužel žádnou z hadcových populací nezahrnul. Problémem při pokusech vymežit *K. \*serpentinicola* pomocí analýzy květních barviv by mohly být změny barevných odstínů během ontogeneze koruny a také závislost antokyanového zbarvení na konkrétních podmínkách půdního prostředí (Štěpánek 1979).

## 5.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) je metodickým přístupem, který umožňuje měření optických vlastností izolovaných částic. V rostlinné biosystematice je využívána zejména ke zjišťování obsahu jaderné DNA\* (Suda 2004) – analyzované částice jsou buněčná jádra a měřenou charakteristikou je intenzita fluorescence barviva (fluorochromu), specificky se vázajícího na DNA.

Základní princip metody je následující: Jednotlivé částice (jádra) jsou unášeny rychle tekoucí kapalinou, která je hydrodynamicky usměrňuje do středu jednolitého proudu, takže mohou postupně (jedna po druhé) procházet paprskem silného světla (např. laseru). Toto světlo excituje navázaný fluorochrom, vzniklé fluorescenční záření (popř. i další optické charakteristiky) je snímáno a převáděno na elektrické implusy zpracovávané počítačem (Doležel 1997). V případě systematicko-botanických studií je hlavní (a většinou jedinou) měřenou charakteristikou samotná fluorescence. Klasickým výstupem z FCM analýzy je pak 2-D histogram (na vodorovné ose relativní intenzita fluorescence na svislé ose počet jader, Suda 2004, viz také obr. 7). Snímání i dalších optických charakteristik (*forward* a *side scatter*) pro kontrolu kvality analýz doporučují Loureiro et al. (2006).

Hlavní výhodou průtokové cytometrie je jednoduchá a rychlá příprava vzorku (tj. roztoku uvolněných jader). Základem celého postupu je přiměřené nasekání vzorku rostlinného pletiva ve vhodném izolačním pufru a následné přefiltrování suspenze. Fluorescenční barvivo může být již součástí izolačního pufru, nebo může být přidáno před analýzou (podrobný popis přípravy vzorků a možné modifikace viz Greilhuber et al. 2007). Rychlost přípravy jednoho vzorku se pohybuje v řádu pouhých minut, což prudce kontrastuje s časově (a mnohdy i technicky) náročnými karyologickými postupy (Suda 2004). FCM má oproti klasické karyologii i další výhody (Doležel 1997, Suda 2004, Suda & Trávníček 2006):

---

\* Níže popisovaný přístup umožňuje zjistit pouze obsah jaderné DNA (a nikoliv tedy obsah DNA celého genomu, tj. jaderné + organelární DNA) Pro zjednodušení však budeme v následujícím textu užívat zkrácené termíny „obsah DNA“ a „velikost genomu“, avšak stále musíme mít na paměti, že se jedná o charakteristiky jaderného genomu (toto zjednodušení je běžně užíváno v cytometrické literatuře)



- možnost analyzovat velké množství vzorků (až stovky za den)
- nedestruktivnost
- možnost analyzovat mitoticky inaktivní buňky (a s tím související široká volba typu studovaného pletiva – listů, stonků, řapíků, ..., ale i semen)
- detekce smíšených vzorků, umožňující určení subpopulací jader s různým obsahem DNA (např. odlišení jader v G1 a G2 fázi buněčného cyklu, detekce endopolyploidie)
- vysoká přesnost umožňující detekovat i drobné odchylky v obsahu DNA
- širší možnosti – měření relativního obsahu DNA nebo stanovení velikosti genomu

Naopak hlavní nevýhodou terénních aplikací FCM je obecná nutnost analyzovat čerstvý materiál. Dobu, po kterou jsou rostlinná pletiva ještě použitelná, lze prodloužit na dobu v řádu dnů až týdnů vhodným skladováním (ve vlhku a chladu). Pro méně náročné cytometrické postupy (např. určování ploidy) je často možné využít i herbářové položky (Suda & Trávníček 2006), nebo pletiva rychle vysušená např. v silikagelu (Suda et al. 2007). Další omezení představují sekundární metabolity (zejména třísloviny a slizy), které se uvolňují z cytosolu v průběhu sekání a mohou výrazně ovlivnit možnosti vazby fluorochromů na DNA (Doležel & Bartoš 2005, Loureiro et al. 2006, Suda 2004).

V závislosti na typu problému, který chceme s využitím FCM řešit, je velmi důležitá volba správného druhu fluorescenčního barviva, fluorochromu. V současné době v biosystematických aplikacích převládají dva fluorochromy – propidium jodid (PI) a 4',6-diamidino-2-fenylyndol (DAPI). Některé obecné vlastnosti a zejména pak výhody a nevýhody obou typů barviv shrnuje následující tabulka (tab. 2)

	DAPI	PI
charakter vazby na DNA	vazba na A-T bohatá místa	DNA-interkalátor
zdroj excitačního záření	rtuťová výbojka	argonový laser
nutnost ošetřit vzorek ribonukleázou	ne	ano
fluorescence úměrná obsahu DNA	-	+
snadnost excitace	+	-
citlivost ke struktuře chromatinu	+	-
citlivost k vlivu sekundárních metabolitů	+	-

Tab. 2 – Vybrané charakteristiky, výhody (+) a nevýhody (-) dvou fluorochromů nejčastěji využívaných v rostlinné biosystematice (podle Doležel 1991, Doležel & Bartoš 2005, Suda 2004)

V případě zkoumání evoluční historie *Knautia arvensis* nám průtoková cytometrie může přispět ve dvou hlavních oblastech – (i) při stanovování absolutní velikosti genomu jednotlivých taxonů a (ii) určování stupně ploidy zkoumaných vzorků.

## 5.2.1 Stanovení absolutní velikosti genomu

Znalost absolutní velikosti genomu daného druhu nám otevírá širší možnosti, než by se na první pohled mohlo zdát. Ukazuje se, že na druhové úrovni je absolutní velikost genomu většinou stálý znak a tak ji lze (za určitých okolností) využít jako vhodný determinační marker. Tento přístup je obzvláště užitečný v případě dvou příbuzných druhů, které se neliší stupněm ploidy, ale odlišuje je právě velikost genomu. Pokud je tato odchylka dostatečně velká (a rozlišení cytometrických analýz dostatečně přesné), můžeme kromě vlastních druhů detekovat i jejich potenciální hybridy (Kron et al. 2007, Suda et al. 2007).

Stanovení velikosti genomu pomocí FCM není tak triviální procedura, jak byla někdy chápána v „raných“ dobách rostlinné průtokové cytometrie. Řada metodických chyb u mnoha

dřívějších prací si vyžádala formulování několika základních pravidel, kterými je třeba se řídit, aby bylo možné získat kvalitní a vzájemně porovnatelná data (Doležel & Bartoš 2005, Greilhuber et al. 2007, Suda et al. 2007):

1. **výhradně interkalační barviva** (např. PI) – relativní zastoupení A-T (resp. G-C) párů bazí je na vyšší než druhové úrovni velmi proměnlivý znak, který není korelován s velikostí genomu (Barrov & Meister 2002) a proto je nutné vyhýbat se báze-specifickým barvivům (např. DAPI)
2. **vhodná interní standardizace** – interní standard je vzorek rostliny o známé a přesně stanovené velikosti genomu, který je přidáván ke každému analyzovanému vzorku již během jeho přípravy. Vhodný interní standard by měl mít velikost genomu co možná nejbližší studovanému taxonu (z důvodu možné nelinearity měření), ne však tak blízkou, aby nebylo možné píky obou rostlin spolehlivě odlišit.
3. **opakování** – při stanovování velikosti genomu u dosud nezkoumaného druhu je potřeba vyhnout se nežádoucí (i) variabilitě mezi jedinci (např. náhodným vybráním aneuploida) a (ii) variabilitě v proceduře (náhodné drobné odchylky v přesnosti přístroje nebo v přípravě a barvení vzorku). Od každého druhu je proto nutné změřit alespoň 3 různé rostliny, z nichž každou 3× v různých dnech
4. **přesnost a kvalita analýzy** – v úvahu je vhodné brát pouze histogramy s alespoň 5000 analyzovanými jádry, a s kvalitními píky, jejichž koeficienty variance (CV)\* nepřesahují hodnotu 3%

Kromě těchto základních zásad je také silně doporučováno provést cytologickou kontrolu analyzovaného materiálu (Leitch & Bennet 2007) a také ověřit možné negativní účinky sekundárních metabolitů (např. tříslovin) na kvalitu a přesnost měření (Loureiro et al. 2006).

### 5.2.1.1 Studium vnitrodruhové variability v obsahu DNA

Otázka vnitrodruhové variability v obsahu DNA (dané jinými procesy, než polyploidizací) je v botanických kruzích poměrně kontroverzním tématem. Podle současných názorů se jedná o poměrně neobvyklý jev, rozhodně vzácnější, než se ještě před nedávnem soudilo. Známe několik exemplárních případů, kdy byla „vnitrodruhová variabilita v obsahu DNA“ důsledkem metodických chyb či působení sekundárních metabolitů (např. rozdíly v „obsahu DNA“ mezi různě osluněnými rostlinami *Helianthus annuus*, Price et al. 2000). Nejčastější příčiny mylně detekované vnitrodruhové variability v obsahu DNA shrnují Greilhuber (2005) a Doležel et al. (2007):

- přístrojové a metodické chyby
- vliv sekundárních metabolitů (možná fluktuace v jejich obsahu i v závislosti na podmínkách stanoviště, ročním období, typu a poloze zvoleného rostlinného orgánu)
- rozdílné výsledky při měření v různých laboratořích
- taxonomická heterogenita zkoumaného materiálu

Přesto se v poslední době množí důkazy intraspecifické variability, která byla prokázána na základě metodicky přísně ošetřených postupů. Hlavními adepty na „skutečnou“ variabilitu jsou zejména druhy se širokou geografickou nebo ekologickou amplitudou, disjunktně rozšířené druhy nebo opakovaně vzniklé allopolyploidní taxony (Doležel et al. 2007).

Pokud je studie zaměřena výhradně na studium intraspecifické variability v rámci konkrétního druhu (a neklade si tedy za cíl zjištění absolutní velikosti genomu), je možné

---

\* CV (*coefficient of variance*) = charakteristika vyjadřující šířku píky v histogramu (udáván v %). Jedná se o nejčastěji užívané měřítko kvality a rozlišovací schopnosti FCM analýzy

odchýlit se od některých (výše zmíněných) metodických zásad spojených se stanovováním absolutní velikosti genomu. Šmarda a Bureš (2006) například při studiu tohoto problému u druhu *Festuca pallens* využili A-T specifické barvivo DAPI, protože umožňovalo mnohem lepší rozlišení cytometrických analýz (průměrné CV 1,6 oproti 3,1 v případě PI). Zároveň ale hlavní studii doprovodili „kalibračním pokusem“, v němž byli tytéž rostliny *F. pallens* měřeny s využitím DAPI i PI FCM. Zjištěná silná korelace mezi výsledky DAPI a PI měření dovolila interpretovat variabilitu zjištěnou na základě jiných DAPI měření jako skutečnou variabilitu v obsahu DNA.

Na druhou stranu, při studiu intraspecifické variability v obsahu DNA může být užitečné držet se některých jiných metodických zásad. Při porovnávání jedinců z různých oblastí areálu *F. pallens* pracovali Šmarda a Bureš (2006) výhradně s rostlinami pocházejícími z alespoň rok trvající společné kultivace, aby bylo zabráněno možné fluktuaci v obsahu nežádoucích sekundárních metabolitů mezi původními stanovišti. Čtvrtina měřených jedinců byla navíc podrobena karyologické analýze, která by umožnila odhalit případy aneuploidie nebo výskytu B chromozomů. B chromozomy byly ve zkoumaném materiálu skutečně nalezeny, jejich přítomnost se však projevovала nápadnými „skokovými“ (až 12%-tními) rozdíly v obsahu DNA, (Šmarda a Bureš 2006). Užitečným přístupem vylučujícím vliv metodických artefaktů je společná analýza dvou jedinců, u kterých jsme již zjistili rozdíly v obsahu DNA (případná přítomnost dvojitého píku (obr. 7 vpravo) poukazuje na takový rozdíl).

## 5.2.2 Stanovení stupně ploidie

Ve srovnání se stanovováním absolutní velikosti genomu klade „pouhé“ určování ploidie nižší nároky na přesnost a kvalitu analýz. Vědomé porušení některých pravidel zmiňovaných v kap. 5.2.1 však může v řadě případů (kde stanovování velikosti genomu není hlavním cílem) značně rozšířit možnosti FCM (podle Suda et al. 2007, pokud není uvedeno jinak):

- Při určování ploidie stačí znát pouze relativní obsah DNA, a proto je možné použít barvivo DAPI. Analýzy využívající DAPI dosahují často lepšího rozlišení (Doležel & Bartoš 2005), což usnadňuje odhalení drobných odchylek v genomu – možná detekce aneuploidů nebo zjišťování drobných odchylek v genomu u příbuzných homoploidních druhů.
- Akceptování histogramů s horšími CV (mezi 5-10%) nebo nižším celkovým počtem analyzovaných jader (pod 5000) dovoluje využívat k analýze i takový materiál, který by za striktních podmínek neposkytoval přijatelné výsledky, avšak v biosystematických či ekologických studiích může přinést řadu důležitých informací (např. semena, herbářový materiál)
- Výše uvedené snížené požadavky na kvalitu analýz ve spojení se omezením nutnosti opakovat měření otevírají možnosti rozsáhlého cytotypového *screeningu* v různých časových i prostorových měřítkách.
  - S využitím FCM je snadné zjistit rozšíření cytotypů určitého druhu v rámci celého jeho areálu a adekvátně posoudit výsledný cytogeografický *pattern*. Dnešní cytogeografické studie běžně pracují s více jak 1 000 jedinci.
  - Rozsáhlé průzkumy zvyšují pravděpodobnost detekce vzácných cytotypů, například triploidních kříženců, nebo dosud neznámých vyšších ploidií některých taxonů.
  - FCM přenesla studium polyploidie z úrovně jedinců na úroveň populací (Kron et al. 2007). Detailní cytologický průzkum smíšených populací více ploidií téhož druhu umožňuje posoudit dynamiku vztahů mezi jednotlivými cytotypy a

také dovoluje rekonstruovat procesy odehrávající se při vzniku neopolyploidů (např. Husband & Sabara 2003).

### 5.2.3 FCM a karyologie

Doplňkovou (avšak nezbytně nutnou) součástí využívání průtokové cytometrie v biosystematických oborech jsou metody „klasické“ karyologie (především jsou využívány tzv. rychlé roztlačkové metody, Krahulcová 1998). Karyologické ověření je silně doporučováno například v následujících případech:

- **stanovování velikosti genomu u neznámého druhu** – řada chromozomálních mutací způsobuje detekovatelné odchylky v obsahu DNA (např. aneuploidie, chromozomové duplikace a delece, pohlavní chromozomy, B chromozomy)(Leitch & Bennet 2007)
- **stanovování stupně ploidie** – původní předpoklad, že úměrně se stupněm ploidie se zvyšuje i hodnota celkového obsahu DNA se ukázal být mylný. Velmi častým jevem je tzv. *genome downsizing* (Leitch & Bennet 2004) – x-násobný polyploid nemá x-násobný obsah DNA diploidního cytotypu, ale jeho obsah DNA je o něco menší. Porovnávání dvou jedinců lišících se ploidní úrovní (a to i v případě cytotypů téhož druhu) je proto nutné doplnit prvotní karyologickou analýzou, jinak může docházet k vážným omylům např. v odhadech stupně ploidie (Suda et al. 2007). Dvojnásobné důležitosti nabývá karyologické ověření v případě nálezů nového, dosud neznámého cytotypu (např. triploidního hybrida)
- **detekce aneuploidních jedinců** – i když pomineme metodické chyby a artefakty, může mít zjištěná odchylka v obsahu DNA více příčin (B chromozomy, chromozomové duplikace, ...). Každý nalezený jedinec s odlišným obsahem DNA by proto měl být podroben karyologickému zkoumání, které by potvrdilo výskyt aneuploidie v tom konkrétním případě.
- **studium rostlin s holokinetickými chromozomy** – holokinetické chromozomy (u rostlin především u čeledi *Cyperaceae* a *Juncaceae*) nemají pravou centromeru a jejich kinetochor je rozptýlen po větší části chromozomu. Pokud tedy dojde ke zlomu chromozomu, mohou se oba fragmenty dědit dále, což má za příčinu proměnlivý počet chromozomů při ± stejných hodnotách velikosti genomu.

Rychlé karyologické metody umožňují pozorování obarvených roztlačkových nebo roztěrových předem macerovaných pletiv. Příprava vzorků je ve srovnání s klasickými metodami karyologie jednodušší a skutečně také časově méně náročná, avšak přesto ve většině případů zabere více jak jeden den.. První fází je předpůsobení materiálu mitotickými jedy s cílem zablokovat co největší množství jader ve fázi mitózy (a také zkrátit a lépe zviditelnit jednotlivé chromozomy). Následuje fixace (rychlé a šetrné usmrcení pletiva), macerace (rozrušení střední lamely a uvolnění jednotlivých buněk), barvení objektu a roztlak (Krahulcová 1998). Důležitými fázemi z hlediska optimalizace této metody na konkrétní rostlinný druh je především předpůsobení (doba jeho trvání a druh použité chemikálie) a macerace (doba jejího trvání). Nezbytnou podmínkou je použití mitoticky aktivního pletiva, nejčastěji se preparáty připravují z vrcholových kořenových meristémů.

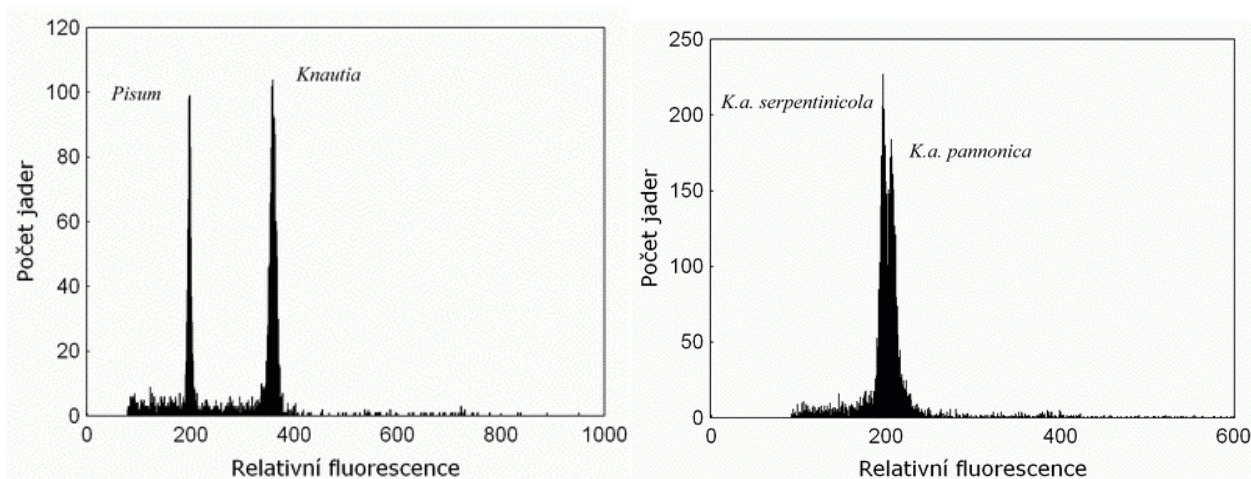
### 5.2.4 Průtoková cytometrie v případě *Knautia*

Cytologickou situaci u *Knautia arvensis* zkoumáme s využitím FCM již od podzimu 2005. Shromážděné výsledky však v tuto chvíli nelze spolehlivě interpretovat, protože zatím chybí data z molekulárních analýz DNA a také z důvodu zatím nedostatečného počtu sebraných

populací (základního cytologický *screening* bude dokončen až v letošním roce). Na dosud získaných datech je však možné velmi dobře ukázat možnosti, kterými může FCM přispět ke studiu fytogeograficky pozoruhodného polyploidního komplexu.

Metodika: Postup přípravy materiálu vychází z dvoustupňové procedury vyvinuté původně pro živočišné buňky (Otto 1990), kterou upravili a u rostlin poprvé aplikovali Doležel a Gohde (1995). Základní postup, využívaný při určování absolutní velikosti genomu, byl následující: v Petriho misce obsahující 1 ml ledového pufru Otto I bylo žiletkou rozsekáno přibližně 0,5 × 0,5 cm listu chrastavce společně s odpovídající plochou listu referenčního standardu *Pisum sativum* cv. Ctirad (2C = 9,09 pg DNA). Suspenze byla přefiltrována přes jemnou nylonovou síť (velikost oka 42 μm) do kyvety a centrifugována 5 minut při 150g. Po skončení centrifugace byl slit supernatant, přidáno 100 μl pufru Otto I a vzorek promíchán. Ca 5 minut před vlastní analýzou bylo do kyvety přidáno 1 ml směsi pufru Otto II, propidium jodidu a RNázy a znovu promícháno. Vzorek byl analyzován na průtokovém cytometru Partec CyFlow vybaveným argonovým laserem. Zjednodušený postup, využívaný při určování stupně ploidie, zahrnoval následující modifikace: vzorek byl připravován pouze v 500 μl pufru Otto I, byl vynechán krok centrifugace (a slévání supernatantu) a pufr Otto II s fluorochromem (PI nebo DAPI) byl přidán přímo k 500 μl suspenze s Otto I. V případě analýzy využívající jako barvivo DAPI byl vzorek analyzován na průtokovém cytometru Partec PA II vybaveném rtuťovou výbojkou (HBO – 100). Veškeré analýzy byly prováděny v Laboratoři průtokové cytometrie Botanického ústavu AV ČR ([www.ibot.cas.cz/fcm](http://www.ibot.cas.cz/fcm), zde také podrobnosti ohledně metodických postupů, přístrojového vybavení a použitých chemikálií).

*Knautia arvensis* se ukázala jako vhodný taxon pro FCM analýzy. Díky tužší konzistenci listů nebyl problém s analyzováním vzorků pletiv více než týden starých, v případě, že byly uchovávány ve vlhku a chladu. Sekundární metabolity zjevně nijak výrazně neovlivňovaly kvalitu analýz a vysoké rozlišení analýz (s nízkými hodnotami CV) umožňovalo detekovat i drobné odchylky v obsahu DNA (viz obr. 7 vpravo). Při stanovování velikosti genomu bylo běžně dosahováno CV s hodnotami okolo 2%. Vysoká kvalita analýz také usnadnila a výrazně urychlila provádění rozsáhlého cytotypového průzkumu (např. na jednu hadcovou populaci byla zjišťována ploidie u 100 – 200 rostlin), neboť bylo možné analyzovat více jedinců z téže populace (zpravidla 5–10) zároveň při jednom běhu. I při takovémto postupu bylo běžně dosahováno hodnot CV pod 3% (viz obr. 7 vlevo). V případě nálezu smíšeného vzorku bylo samozřejmě nutné přistoupit k separátní analýze jednotlivých rostlin.



Obr. 7 – Histogramy z FCM analýz *Knautia arvensis*. Vlevo: cytotypový screening populací – analýza vzorku z 10 jedinců *K. arvensis* (4x, lokalita Vlček) + interní standard *Pisum*. CV píku vzorku je 1,95%. Vpravo: detekce drobné odchylky ve velikosti genomu – společná analýza diploidní rostliny *K. \*serpenticola* (Staré Ransko) a *K. \*pannonica*. V obou případech barveno pomocí DAPI

Průtoková cytometrie zásadně přispěla ke studiu mikroevoluční historie *Knautia arvensis* zejména v následujících třech směrech výzkumu:

Stanovení stupně ploidie morfologicky či molekulárně dále analyzovaných jedinců spojené s rozsáhlým cytotypovým screeningem v rámci areálu *K. arvensis* agg. je nezbytnou podmínkou pro další studium hned z několika důvodů. (1) Stupeň ploidie je důležitým taxonomickým znakem v okruhu *K. arvensis* agg., jednoznačně umožní určit např. morfologicky takřka shodné poddruhy *K. \*arvensis* a *K. \*pannonica*. Nález hexaploidní populace na lokalitě Holubovské hadce jednoznačně poukázal na příslušnost zdejších rostlin k druhu *K. dipsacifolia*, čímž byly vysvětleny morfologické neshody dříve diskutované Kaplanem (Kaplan 1998). (2) Polyploidizace hraje stěžejní roli v evoluci rodu *Knautia*, stavění jakýchkoliv evolučních teorií bez znalostí vztahu cytologie k molekulárně-biologickým, geografickým či morfologickým charakteristikám by postrádalo smysl. (3) Polyploidie může komplikovat vyhodnocování výsledků některých molekulárních analýz (např. ITS sekvencí, viz kap. 5.4.2.1), při používání těchto metod si tedy musíme být vědomi, zda pracujeme s diploidním či polyploidním jedincem.

Rozsáhlý cytotypový screening na úrovni populací může vést k odhalení vzácných cytotypů a/nebo ploidně-smíšených populací. To se potvrdilo i v případě *K. arvensis*: (1) Několik diploidních rostlin bylo nalezeno v populaci 4x rostlin na hadcové lokalitě Planý Vrch ve Slavkovském lese (přitom na ostatních lokalitách v daném území se vyskytují výhradně tetraploidi). (2) Jedna triploidní rostlina neznámého původu byla nalezena na dolnokralovických hadcích (jedná se o vůbec druhý nález triploidního chrastavce ve volné přírodě). (3) Podařilo se zjistit, že hadcová lokalita Woja v severním Bavorsku je obývána diploidním i tetraploidním cytotypem (4x jedinci zřejmě zavlečení podél železnice). (4) Smíšená populace 2x a 4x rostlin byla objevena také na jižní Moravě v kontaktní zóně mezi *K. arvensis* subsp. *pannonica* a subsp. *arvensis*. Tyto výsledky zásadně přispívají k odhalování evoluční historie hadcových chrastavců (např. diploidní rostliny ve Slavkovském lese) a také otevírají cestu k možnému dalšímu studiu procesů probíhajících v místech kontaktu diploidních a tetraploidních rostlin (navíc v kontrastujících edafických podmínkách).

Při stanovování absolutní velikosti genomu jednotlivých taxonů se podařilo detekovat drobnou (přibližně 4%) avšak stálou odchylku ve obsahu DNA mezi diploidními rostlinami *K. \*serpentinicola* a *K. \*pannonica* (viz obr. 7 vpravo). Příčina takové variability zatím zůstává neznámá, stejně jako její možný přínos pro znalost vzájemných fylogenetických vztahů v rámci celé skupiny (zatím bylo analyzováno jen minimum nehadcových tetraploidních rostlin). Vzhledem k nálezu takové odchylky u taxonů na poddruhové úrovni také nelze vyloučit, že bude možné využít velikost genomu jako vhodnou charakteristiku i k odlišení některých druhů popř. jejich hybridů (např. *K. arvensis* a *K. kitaibeli*).

## 5.2.5 Karyologie v případě *Knautia*

Karyologickému studiu *Knautia arvensis* se v minulosti věnovala řada zahraničních autorů (např. Breton Sintes 1974a,b, 1975, Ehrendorfer 1962, Kachidze 1929, Verlaque 1975), na našem území chromozomy chrastavců počítali Štěpánek (1979, 1982) a Kaplan (1998). Oba čeští autoři využili rychlou roztlakovou metodu využívající barvení lakto-propio orceinem (Krahulcová 1998), předpůsobení probíhalo 2-4 hodiny, jako činidlo byl v obou případech použit roztok p-dichlorbenzenu, macerace trvala 20-60 sekund (Štěpánek 1979) nebo 2 minuty (Kaplan 1998).

Pro orientační karyologické pozorování byl tento postup využit i v předkládané práci. Průběh přípravy preparátu sledoval Kaplana (Kaplan 1998) s jedinou modifikací (lakto-propioorcein nebyl součástí fixačního roztoku, ale byl přidán na podložní skličko až těsně před provedením roztlaku). Značný problém zpočátku představoval výběr vhodného mitoticky aktivního pletiva. Neporušené kořenové špičky dospělých rostlin, které používal Kaplan (1998) se nepodařilo získat. Jako optimální pletivo pro karyologické analýzy se nakonec ukázaly vrcholové lodyžní meristémy. Jednoznačně se podařilo stanovit počty u diploidního ( $2n = 20$ ) a tetraploidního ( $2n = 40$ ) cytotypu *K. arvensis* a předběžně i u hexaploidních jedinců *K. dipsacifolia* ( $2n = \text{ca. } 60$ )(viz obr. 8)



Obr. 8 – Mitotické chromozomy *Knautia arvensis*. Vlevo diploidní ( $2n=20$ ) jedinec *K. arvensis* subsp. *pannonica* (Gombasek z Rožňavy, jižní Slovensko), vpravo tetraploidní ( $2n = 40$ ) jedinec *K. arvensis* subsp. *arvensis* (Planá u Mariánských lázní, ČR). Měřítko = 10  $\mu\text{m}$

### 5.3. AFLP

*Amplified fragment length polymorphism* (AFLP) je moderní vysoce citlivá metoda DNA fingerprintingu, která našla široké uplatnění také v rostlinné biosystematice. Princip AFLP v sobě kombinuje výhody dvou metod – PCR (*polymerase chain reaction*) a restričních analýz (Karp et al. 1996). Základním principem této metody je štěpení celkové DNA dvěma restričními enzymy, které je následováno selektivní PCR-amplifikací jen některých ze získaných úseků. U těch se pak hodnotí polymorfismus v délce (Vos et al. 1995). Konečná vizualizace se děje prostřednictvím radioaktivního nebo fluorescenčního barvení za použití automatického sekvenátoru, případně pomocí vertikální polyakrylamidové elektroforézy (Mueller & Wolfenbarger 1999).

Klíčovou výhodou AFLP je schopnost simultánního *screeningu* mnoha odlišných úseků DNA náhodně rozmístěných po celém genomu. Výsledkem je získání velkého množství vzájemně nezávislých polymorfních markerů. Navíc se jedná o poměrně rychlou metodu – v relativně krátkém čase mohou být analyzovány stovky jedinců u nichž mohou být skórovány desítky polymorfních míst. Například metody studia mikrosatelitů (SSR) nebo některé RFLP analýzy předstihuje AFLP tím, že k jeho aplikaci není potřeba předchozí znalosti o genomu zkoumaného organismu (např. sekvence pro primer). Na rozdíl od obdobně zvýhodněné metody RAPD jsou výsledky AFLP vysoce spolehlivé a opakovatelné. (Mueller & Wolfenbarger 1999, Robinson & Harris 1999, Vos et al. 1995)

### 5.3.1 Limitace AFLP

Hlavní nevýhodou AFLP pro řešení populačně biologických otázek je dominantní povaha AFLP markerů. Dominantní markery dovolí pouze určení genotypu, ale neumožňují odhadnout frekvenci jednotlivých alel, protože není možné odlišit heterozygota od dominantního homozygota (Ouborg et al. 1999). Některé AFLP markery sice vykazují i kodominantní dědičnost (Mueller & Wolfenbarger 1999), identifikace heterozygota pouhým odhadnutím intenzity daného fragmentu však není možná, neboť AFLP procedura není citlivá ke koncentraci templátové DNA – stejná intenzita fragmentů byla pozorována při koncentracích 25ng a 25pg DNA (Vos et al. 1995)! Při skórování AFLP gelu je tedy možné zaznamenávat pouze prezenci/absenci fragmentu (0/1 data). Nedostatky plynoucí z dominantního charakteru částečně vyvažuje snadný zisk velkého množství nezávislých vysoce polymorfních znaků (Robinson & Harris 1999).

Velký problém zejména pro fylogenetické využití AFLP dat představuje otázka homologie spolu migrujících fragmentů (Mueller & Wolfenbarger 1999, Karp et al. 1996). Obecně se předpokládá, že proužky ležící na gelu vedle sebe (tj. o stejné molekulární hmotnosti) mají původ ve stejné evoluční události (Robinson & Harris 1999). To však nemusí být pravda – výsledkem je pak homoplázní stav, tzv. *size homoplasy* (Pompanon et al. 2005). Navíc jeden proužek může být složen z více stejně velkých fragmentů pocházejících z úplně jiných míst genomu, evoluční ztráta jednoho fragmentu pak nemusí nutně znamenat zmizení proužku. Zcela nemožné je zjištění homologie chybějících proužků. Pro kladistické analýzy je také velkým problémem asymetrie v pravděpodobnosti mutací vedoucích k zisku či ztrátě restričního místa – ztráta je mnohem pravděpodobnější (Robinson & Harris 1999).

Několik studií také prokázalo, že opakovatelnost AFLP procedury je sice vysoká, avšak ne zcela dokonalá. Za hlavní příčinu vznikajících chyb je považována nedokonalá digesce templátové DNA restričními enzymy (Robinson & Harris 1999). Restriční enzymy je proto vhodné nechávat pracovat dostatečně dlouhou dobu (např. přes noc). Artefakty PCR jsou méně pravděpodobné díky přísným podmínkám při hybridizaci primerů – vysoká teplota *annealingu* dovolí pouze vysoce specifické párování bazí (Mueller & Wolfenbarger 1999).

Bonin et al. (2004) se na otázku opakovatelnosti výsledků podívali z praktického úhlu. U dvou případových AFLP studií se pokusili odhadnout *genotyping error* celé procedury od počátku izolace vzorku až po jeho vyhodnocení. Kvantifikaci chyby umožnilo zopakování celé procedury u mnoha náhodně vybraných vzorků a také nezávislé vyhodnocování AFLP gelů dvěma osobami. Zjištěná chyba nebyla vysoká (2% a 2,6%), avšak zejména pro potřeby studií pracujících na úrovni jedinců ne zcela zanedbatelná. Hlavními příčinami byly „technické“ nedostatky procedury (projevující se v kolísající intenzitě fluorescence a drobných posunech v poloze proužků) a také lidský faktor (při skórování proužků na gelu). Ze zjištěných výsledků vyvozují Bonin et al. (2004) několik obecných zásad, které by měly být dodržovány při provádění (nejen) AFLP analýz:

- systematicky používat slepé vzorky (kvůli kontrole kontaminace)
- u dostatečného množství vzorků zopakovat celý postup, porovnáním výsledků stanovit (a uvést v publikaci) míru technické chyby v proceduře
- snažit se předejít rozdílům v intenzitě fluorescence proužků (např. pečlivou standardizací množství použité DNA)
- vyloučit problematické vzorky, neskórovat podezřele se chovající markery (pokud jsou důsledkem technické chyby, její vliv se ještě prohloubí při skórování)
- skórování provádět poloautomaticky, tj. s využitím vhodného hodnotícího softwaru (např. Genographer, Benham et al. 1999)



Při skórování každého markeru je také vhodné soustředit se na nalezení náhlého poklesu v intenzitě fluorescence (přibližně na 10% intenzity nejvyššího píku u příslušného markeru), který ukazuje hranici mezi nespecificky (= šumem) a specificky namnoženými fragmenty (Bonin et al. 2004).

### 5.3.2 Využití AFLP

Díky vysoké variabilitě a spolehlivosti jsou AFLP markery velmi oblíbené v populačně biologických studiích pro identifikaci jedince (např. při odhadování populační velikosti, určování rodičovství). Široké uplatnění nacházejí také ve fylogeograficky zaměřených pracích. Z AFLP dat je možné odvodit (i) rozdělení jedinců/populací do geneticky definovaných skupin (Bayesovské klastrování, PCoA, fenetické metody, *multilocus assignment test*), (ii) zjistit míru vnitropopulační variability (Shannonův index diverzity, podíl vzácných a unikátních fragmentů) a (iii) zjistit genetickou strukturu populací ( $F_{ST}$  index, AMOVA) a z ní nepřímo odvodit míru genového toku (Eidesen et al 2007, Ouborg et al. 1999, Tribsch et al. 2002). Například Tribsch et al. (2002) pouze na základě AFLP dat (porovnáním různých charakteristik genetické variability mezi populacemi a mezi feneticky definovanými skupinami) identifikovali pravděpodobná glaciální refugia a směry poledového šíření alpského druhu *Saponaria pumila*. AFLP data také umožnila rozluštit složitou glaciální historii arкто-aplinského druhu *Vaccinium uliginosum*, když zcela selhaly jaderné (ITS) a částečně také chloroplastové markery (odhalené genealogické vztahy v cpDNA se vztahovaly k historicky starším procesům) (Eidesen et al. 2007).

Variabilní AFLP markery poskytly velmi užitečné informace i při odvozování příbuzenských vztahů. Například Despres et al. (2003) při studiu fylogeneze v rámci rodu *Trollius* narazili na problém nízké variability chloroplastových i jaderných (ITS) markerů. Až AFLP data poskytla podklady pro robustní kladistické a fenetické stromy (Despres et al. 2003). AFLP úspěšně aplikovali také Koopman et al. (2001) na fylogenezi v rodě *Lactuca*. Autoři využili svých dobrých výsledků a argumentují proti kritice aplikace kladistických metod na AFLP data (zvýšená přítomnost homoplázií – díky anonymnímu a dominantnímu charakteru markerů): pokud dojdou kladistické stromy ke shodnému výsledku s fenogramy, svědčí to o zanedbatelném vlivu homoplázií na topologii těchto stromů. V případě vyšší frekvence homoplázií budou konfliktní místa odhalena permutačními analýzami (např. bootstrap) a dále se nimi stejně pracovat nebude (Koopman et al. 2001). Pro odvozování vztahů na vyšších taxonomických úrovních však metoda AFLP není vhodná neboť nebezpečně narůstá pravděpodobnost nehomologie fragmentů (Robinson & Harris 1999)

Zatím možná ne zcela doceněný je význam AFLP pro studium polyploidních komplexů. Přitom u polyploidů mohou snáze převážet výhody AFLP nad kodominantními markery (SSR) díky značně omezeným možnostem kodominantních markerů při určování heterozygotního genotypu u polyploidů (Guo et al. 2005). Hedrén et al. (2001) vidí hlavní přínos AFLP pro studium polyploidie v možnosti identifikace rodičovských druhů allopolyploidního taxonu. Guo et al. (2005) využili potenciálu AFLP v širší míře při studiu polyploidního komplexu *Achillea*. Ze získaných molekulárních dat vytvořili kladistické a fenetické stromy a také porovnali distribuci druhově výjimečných stabilizovaných proužků (tj. proužků fixovaných v populacích některého z druhů). Z takto zanalyzovaných dat se podařilo určit rodičovské taxony některých allopolyploidů, odhalit několik případů dávné i současné, homoploidní i heteroploidní hybridizace a detekovat novou diferenciaci allopolyploidních taxonů (Guo et al. 2005).

## 5.4 Sekvenování nekódujících úseků DNA

Znalost sekvencí nekódujících úseků DNA může přinést zcela nové vhledy do mikroevołuční problematiky. Sekvence jsou vhodným „materiálem“ pro kladistické analýzy. Navíc, s využitím sekvencí nemusíme zjišťovat jen fylogenetické vztahy jednotlivých jedinců/populací zkoumaného taxonu, ale také genealogické vztahy mezi jednotlivými variantami (alelami) studovaného sekvenčního úseku. Tím, že poskytují genealogicky uspořádaná data, se sekvence zásadně liší od dat z většiny jiných typů molekulárně biologických analýz, kde je takřka nemožné správně odhadnout genealogické vztahy mezi jednotlivými alelami (danými např. velikostí fragmentu)(Schaal & Olsen 2000).

Příprava vzorku k sekvenování začíná namnožením zvoleného úseku DNA prostřednictvím PCR se dvěma specifickými primery. Následuje přečištění a pak vlastní sekvenační reakce (vlastně modifikovaná PCR) pouze s jedním primerem. Kromě deoxyribonukleotidů (dNTP) jsou v reakční směsi přítomny rovněž fluorescenčně značené dideoxyribonukleotidy (ddNTP). Vznikají fragmenty, které se liší právě o jednu bázi, což umožňuje stanovení přesného pořadí nukleotidů v řetězci DNA. Konečná vizualizace je prováděna po elektroforetickém rozdělení na automatickém sekvenátoru (Macholán & Munclinger 2004).

### 5.4.1 Chloroplastová DNA

Unikátní genetika a strukturální vlastnosti chloroplastové DNA (cpDNA) činí z chloroplastových markerů velmi důležitý nástroj pro studium mikroevołuce rostlin. Molekula cpDNA je kruhová, poměrně malá (135-160 kilobází u krytosemenných) a strukturálně značně stabilní. Z mutací převažují jen bodové změny, v nekódujících úsecích bývají také indely (Olmstead & Palmer 1994, Wakasugi et al. 1998). Jeden chloroplast obsahuje více kopií kruhové molekuly a jedna buňka má víc chloroplastů. Výsledkem je vysoký počet kopií cpDNA, který usnadňuje použití PCR pro amplifikaci zvoleného úseku (*high-copy* sekvence jsou snáze dostupné pro polymerázu) (Small et al. 2004). Chloroplastový genom je haploidní (a to i u polyploidních jedinců), nedochází zde k rekombinaci a přenáší se uniparentálně, u krytosemenných v mateřské linii (existují však výjimky, viz Harris & Ingram 1991<sup>\*</sup>).

#### 5.4.1.1 Limitace chloroplastových markerů

Největší limitací ve využití chloroplastové DNA pro studie na druhové a nižší úrovni je nízká mutační rychlost (v kódujících oblastech je přibližně poloviční až třetinová oproti jaderným genům) a s tím související nízká variabilita chloroplastových markerů (Ennos et al. 1999, Schaal et al. 1998, Small et al. 2004). Proti předsudku příliš nízké variability se však ohrazují Shaw et al. (2005). V rozsáhlém průzkumu cpDNA variability v 21 nekódujících úsecích u 10 skupin semenných rostlin odhalili značnou heterogenitu v mutačních rychlostech mezi jednotlivými oblastmi. Co více, dva zdaleka „nejpopulárnější“ (tj. nejčastěji sekvenované) úseky cpDNA (*trnL-trnF* a *trnK/matK*) vykazovaly podstatně nižší variabilitu, než řada jiných

---

<sup>\*</sup> Harris & Ingram (1991) podávají rozsáhlý literární přehled výjimek z pravidla maternálního přenosu cpDNA u krytosemenných. Výhradně paternální přenos (tedy pylem) zaznamenali jen ve třech případech, avšak uvádějí mnoho příkladů biparentálního transferu. Některé z citovaných pramenů se však opíraly pouze o nepřímé důkazy, které neposkytovaly jistotu, že k přenosu paternální cpDNA do potomka skutečně došlo (např. detekovaná přítomnost chloroplastů v buňkách v pylu).

testovaných oblastí (Shaw et al. 2005). Možným řešením problému nízké variability tak může být sekvenování jiného než tradičně používaného úseku.

S pomalou mutační rychlostí chloroplastové DNA souvisí i další nevýhoda (nebo spíše limitace, které si musíme být vědomi). Zatímco pozorovaná genetická diverzita chloroplastových sekvencí z valné většiny vznikla v dobách před miliony let, současné geografické rozšíření této diverzity bývá důsledkem procesů řádově mladších (desítky tisíc let v případě glaciálních a postglaciálních migrací)(Ennos et al. 1999). Výsledný genealogický strom haplotypů tak zdaleka nemusí odpovídat vztahu populací, kterými jsou tyto haplotypy přenášeny (Schaal & Olsen 2000).

Protože chloroplastová DNA nepodléhá rekombinaci, pohlížíme na celou molekulu z populačně genetického hlediska jako na jediný obrovský „supergen“. Data o populačně genetické struktuře získaná studiem cpDNA markerů tak postrádají opakování (Ennos et al. 1999). Také uniparentální způsob dědičnosti se stane nevýhodou v okamžiku, kdy v evoluci studované skupiny budou hrát důležitou roli retikulární procesy, např. hybridizace či polyploidizace (Small et al. 2004). V tom případě je nezbytné porovnání cpDNA dat s informacemi z nějakého jaderného markeru.

### 5.4.1.2 Využití chloroplastových markerů

Chloroplastové sekvence poskytují vhodná data pro klasické fylogenetické analýzy, neboť evoluce cpDNA probíhá formou dichotomického větvení linií a není zatíženo vlivy retikulární evoluce, např. hybridizací (Small et al. 2004). Maternální způsob přenosu je hojně využíván při studiích genového toku (např. porovnání genového toku pylem a semeny, McCauley 1995) nebo dynamiky hybridních zón (např. otázka rodičovství hybridních jedinců či allopolyploidů, Popp 2004). Pro studium evoluční historie *Knautia arvensis* mohou být chloroplastové markery přínosné zejména v kontextu jejich využití ve fylogeografii (geografická distribuce haplotypů, popř. souvislosti s jejich genealogickými vztahy) a také mohou výrazně napomoci při detekci opakované polyploidizační události.

#### Využití cpDNA ve fylogeografii

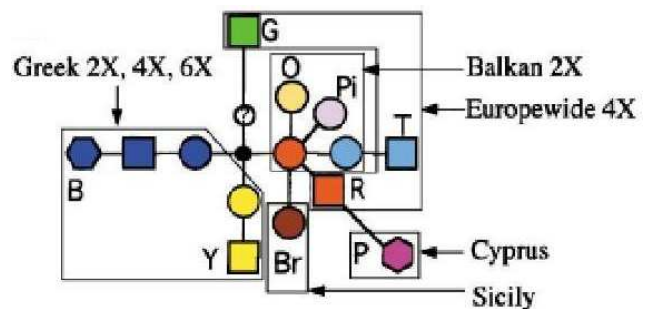
Obrovský význam mají chloroplastové markery při objasňování vztahu geografie a evoluční (obzvláště migrační) historie populací a druhů. Nezastupitelnou roli chloroplastových markerů ve fylogeografických studiích zajistilo především několik vlastností cpDNA, které ji zvyhodňují oproti jaderným markerům při „stopování“ migračních linií:

- Díky absenci rekombinace mohou být snadno odvozovány genealogické vztahy jednotlivých variant (haplotypů) studovaného úseku cpDNA (Schaal et al. 1998).
- Protože je chloroplastový genom haploidní, jeho efektivní populační velikost dosahuje nejvýše 1/2 efektivní populační velikosti genů jaderných (to v případě diploidního oboupohlavného a cizoprašného druhu). Díky menší efektivní populační velikosti se silněji prosazuje genetický drift a v malé izolované populaci (např. v místě refugia) se chloroplastový haplotyp snáze zafixuje. Diferenciace mezi dvěma izolovanými populacemi se proto projeví výrazněji na úrovni chloroplastových markerů, než u markerů jaderných (Ennos et al. 1999).
- Genový tok maternálně děděné organely je zajišťován semeny, jejichž schopnost šíření na dlouhé vzdálenosti je ve srovnání s možnostmi pylové disperze (přenášející jadernou DNA) zpravidla značně omezená. V místech sekundárních kontaktů různých migračních linií (např. po rozsáhlé expanzi areálu z původních refugií) se genetické rozdíly v chloroplastové DNA budou „smývat“ mnohem pomaleji a původní geografický *pattern* jejich genových linií zůstane déle patrný (Ennos et al. 1999).

Základem klasických fylogeografických studií je porovnání *pattern* genealogických vztahů haplotypů s jejich reálnou geografickou distribucí. V případě studia polyploidních komplexů přináší velmi zásadní informaci také porovnání haplotypového či geografického *pattern* s rozložením jednotlivých cytotypů – výsledkem může být např. detekce opakované polyploidizační události, popř. i místa, kde se tak stalo (Segraves et al. 1999, Trewick et al. 2002, obr. 9 blíže viz následující oddíl). Úspěšné odvozování genealogických vztahů je však velmi často limitováno nízkou variabilitou chloroplastových markerů. V tom případě může velmi užitečnou informaci přinést znalost o rozložení genetické variability a diverzity v rámci areálu daného druhu (zde se mohou kromě vlastních cpDNA haplotypů uplatnit i genealogicky neuspořádané avšak mnohem variabilnější markery, např. AFLP). Zvýšená míra variability či vyšší frekvence unikátních haplotypů/fragmentů může indikovat polohu refugií, nízké hodnoty naopak poukazují na nedávnou expanzi určité geneticky omezené linie apod. (např. Eidesen et al. 2007, Koch et al. 2006). Cennou informaci může přinést také porovnání výše zmiňovaných *pattern* (geografické, haplotypové, cytotypové) s rozdělením do skupin definovaných na základě AFLP markerů (Eidesen et al. 2007).

### Detekce opakované polyploidizace

Pokud to dovolí dostatečná variabilita chloroplastového markeru, můžeme minimální počet polyploidizačních událostí odvodit přímo z haplotypového stromu cpDNA. Doplnkovou „podpůrnou“ informaci pak může poskytnout znalost geografické distribuce obou cytotypů. Van Dijk & Bakx-Schotman (1997) takto určili minimálně tři nezávislé polyploidizační události u *Plantago media*. Na základě faktu, že žádný z haplotypů nebyl sdílen jedinci obou ploidních úrovní, také byla vyslovena hypotéza o dávném původu polyploidních linií (Van Dijk & Bakx-Schotman 1997). Při fylogeografickém studiu *Asplenium ceterach* (Trewick et al. 2002) byly dokonce nalezeny cytotypově nesespecifické, avšak geograficky lokalizované haplotypy (např. 2x, 4x i 6x populace od téhož haplotypu z Řecka, viz obr. 9 ). To znamená, že ancestrální diploidní haplotyp se ještě zachoval v „mateřských“ diploidních populacích, respektive že haplotypy vzniklých polyploidních populací ještě nestačily divergovat. Genealogický strom haplotypů strom se zakomponovanou cytotypovou strukturou ukazuje obr. 9 Na jeho základě byl odhadnut nejméně šestinásobný nezávislý vznik (auto)polyploidů *A. ceterach* (Trewick et al. 2002)



Obr 9 – Strom genealogických vztahů haplotypů (tzv. minimum-spanning tree) znázorňující nalezené kombinace devíti haplotypů a třech ploidních úrovní (2x – kolečko, 4x – čtverec, 6x – šestiúhelník) u populací *Asplenium ceterach*. (Trewick et al. 2002)

Problémy může přinášet hybridizace a následná introgrese chloroplastové DNA. Rozsáhlý tok chloroplastové DNA mezi různými druhy (téže ploidie) zaznamenali např. Petit et al. (2002) v rodě *Quercus* a Palme et al (2004) u *Betula*. Při silné míře genového toku může dokonce dojít k zafixování chloroplastové DNA v „cizí“ populaci. Příslušníci této populace pak mají jaderný genom náležející jednomu druhu/linii a chloroplasty od jiného druhu/linie. Tento jev, nazývaný *chloroplast capture*, není mezi rostlinami výjimečný (Rieseberg & Soltis 1991). Pokud je umožněn tok genů mezi ploidními úrovněmi, může docházet k introgresi cpDNA následované *chloroplast capture* i na meziploidní úrovni. Výsledný stav pak vlastně připomíná situaci po nezávislé polyploidizační události: haplotyp typický pro 2x rostliny se vzácně vyskytuje i v populaci tetraploidů. K rozluštění tohoto problému je potřeba využít

nějaký nezávislý jaderný marker, pomoci může i znalost geografie. Například v případě cirkumpolárního polyploidního druhu *Vaccinium uliginosum* došlo k polyploidizačním událostem poměrně dávno, a tak *pattern* cpDNA haplotypů silně koresponduje s cytotypovou distribucí (Eidesen et al. 2007). Výjimkou je několik tetraploidních rostlin (z různých částí areálu), u nichž se podařilo nalézt jinak výhradně „diploidní“ haplotypy. Porovnání s AFLP daty však jednoznačně přiřadilo tyto sporné rostliny k ostatním tetraploidům z dané oblasti a bližší geografický pohled odhalil blízkost styčné (a nejspíše i hybridní) zóny mezi 2x a 4x cytotypy (Eidesen et al. 2007).

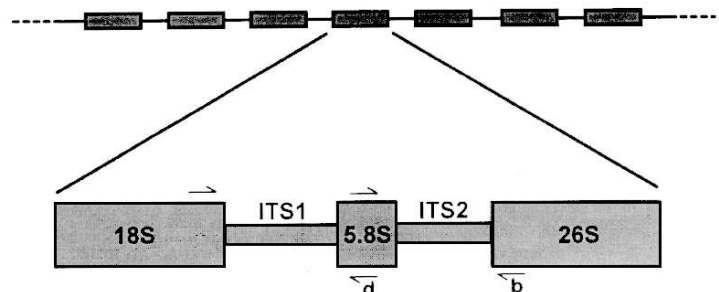
Možnosti využití dalších metod k odhalení opakované polyploidizace záleží například na reprodukčně-biologické a geografické situaci daného druhu. Pomoci mohou například AFLP, izozymy, či morfologické srovnání (viz příklady v review Brochmann et al. 2004)

## 5.4.2 Jaderná DNA

Jaderný genom poskytuje takřka nevyčerpatelný zdroj potenciálně informativní genetické variability (Schaal et al. 1998). Skládá se z úseků lišících se úrovní variability, strukturou i způsobem evoluce a výběr konkrétní oblasti již (teoreticky) záleží pouze na typu pokládané otázky a taxonomické úrovni, na které se pohybujeme. Jaderné markery je vhodné využívat už jenom jako další zdroj informace, nezávislý k chloroplastovým markerům. Díky biparentálnímu způsobu dědičnosti mohou jaderné markery vnášet světlo do procesů retikulární evoluce (např. Popp et al. 2005).

Obtíže při práci s jadernými sekvencemi obecně vyplývají z přítomnosti minimálně dvou kopií téhož úseku/genu (diploidní stav), které jsou příčinou intra-individuálního polymorfismu. U heterozygotních jedinců může být nutné obě alternativní alely (haplotypy) analyzovat jako individuální jednotky. Ještě větší potíže způsobuje rekombinace. V případě, že k ní dojde v rámci studovaného úseku, vznikají smíšené, tzv. chimérické sekvence, částečně tvořené sekvencí jedné alely a částečně sekvencí z alely druhé (Schaal et al. 1998). Komplikovaný stav také navozují situace, kdy se evoluce genů „oddělí“ od evoluce jedinců a v rámci genomu dojde (např. genovými duplikacemi) ke vzniku nezávisle se vyvíjejících paralelních sekvencí téhož úseku (genu). Přítomnost genových paralogií v prvních fázích především ztěžuje orientaci v evolučních vztazích mezi jedinci. Při důkladném seznámení se s konkrétní situací však znalost evoluce paralogů může zásadně přispět k odhalení spletitých evolučních historií druhů (např. Popp et al. 2005). Pro fylogeografické studie je také nevýhodou větší (oproti cpDNA minimálně dvojnásobná) efektivní populační velikost jaderného genomu. Časy koalescence jsou delší, což snižuje míru diferenciací jednotlivých populací a zvyšuje pravděpodobnost přetrvávání ancestrálního polymorfismu, který může být mylně vykládán jako genový tok (Schaal et al. 1998, Schaal & Olsen 2000).

Následující část bude zaměřena na oblast DNA, která obsahuje geny pro ribozomální RNA (zkráceně ribozomální DNA nebo rDNA) a jejíž součástí je asi nejoblíbenější zdroj jaderných markerů pro studium evoluce a fylogeneze na nižších taxonomických úrovních – ITS (*internal transcribed spacer*). Sekvenování ITS úseku bude také



Obr. 10 – Organizace rDNA u vyšších rostlin. 18S–5,8S–26S cistron (dole) je na DNA uložen v tandemově se opakujících repeticích (nahore). Šipky nad RNA geny označují univerzální primery, kterými je možné namnožit ITS1, ITS2 nebo celý ITS úsek. Délka celého ITS úseku se u krytosemenných rostlin pohybuje mezi 50–700 bp. Podle Wendel et al. (1995), upraveno

využito při studiu evoluční historie *Knautia arvensis*.

Struktura ribosomální DNA je v porovnání s jinými oblastmi jaderné DNA v mnoha ohledech výjimečná. U vyšších rostlin je rDNA organizována ve dvou odlišných sadách tandemových řad (*arrays*). První sada se sestává z opakujících se 5S rRNA genů a mezigenových spacerů, druhý typ řad je tvořen tandemově se opakujícím v celku transkribovaným cistronem 18S–5,8S–26S rDNA. V rámci tohoto cistronu, v prostoru mezi jednotlivými rDNA geny (18S, 5,8S a 26S) se nacházejí dva *internal transcribed spacers* – ITS1 a ITS 2 (viz obr. 10)(Alvarez & Wendel 2003, Small et al. 2004).

### 5.4.2.1 Výhody a limitace využití ITS

Specifické vlastnosti rDNA poskytují řadu výhod (viz Baldwin et al. 1995), díky nimž se ITS úsek stal asi nejpopulárnějším zdrojem jaderných markerů. V poslední době se však ukazuje, že s těmito výhodami jsou bezprostředně spojeny i jistá úskalí (viz Alvarez & Wendel 2003 a Small et al. 2004), která mohou někdy až zcela znemožnit úspěšné využití ITS pro řešení daného mikroevolučního problému:

- **snadnost izolace a amplifikace** – vysoký počet rDNA repetice (stovky až tisíce) v rámci jaderného genomu značně usnadňuje PCR-amplifikaci i izolaci DNA (díky tomu je možné pracovat i s méně kvalitním rostlinným materiálem, např. herbářovými položkami)
- **univerzalita** – protože okolní kódující úseky jsou vesměs velmi konzervativní, je možné oba ITS (popř. celou oblast ITS1–5,8S–ITS2) amplifikovat pomocí sady univerzálních primerů (obr. 10) Nevýhodou univerzálních primerů je nebezpečí namnožení sekvence od nesprávného organismu v kontaminovaném vzorku (příčinou kontaminace může být nepořádek v laboratoři, ale i endofytické houby přítomné v některých pletivech).
- **vysoká variabilita** – vysoká míra nukleotidového polymorfismu, ale také časté indely přispívají k vysoké variabilitě ITS markeru. Na vnitrodruhové úrovni však někdy zklame i ITS (Schaal et al. 1998).
- **nízké funkční omezení** – ITS je sice transkribován, ale při následném sestřihu je odstraňován. Teoreticky by tedy měl podléhat pouze procesům neutrální evoluce. Ukázalo se však, že sekundární struktura ITS hraje roli v průběhu sestřihu a proto je nutné počítat i s jistými evolučními (např. selekčními) omezeními částí ITS sekvencí.
- **uniformalita v rámci genomu** – přestože se v rámci genomu vyskytují tisíce kopií rDNA, všechny bývají sekvenčně uniformní. Homogenizaci případných změn (ať už vzniklých mutacemi či hybridizací) by měly zajišťovat mechanismy takzvané *concerted evolution*. U řady druhů však nejsou „chování“ a směr působení *concerted evolution* snadno predikovatelné a v rámci genomu tak přetrvává větší množství do různé míry zhomogenizovaných avšak stále ještě odlišných paralogních ITS úseků. Další komplikace do tohoto problému mohou vnášet artefakty PCR či přítomnost chimérických sekvencí a pseudogenů. Intra-individuální polymorfismus představuje zásadní problém pro využití ITS v rostlinné biosystematice.

K řešení situací, kdy při sekvenaci nalezneme odlišné paralogní sekvence rDNA, můžeme přistupovat několika způsoby. První možností je optimalizace PCR metody. Alvarez & Wendel (2003) doporučují přidávat do reakční směsi různá chemická aditiva (např. DMSO), která mohou v daném případě snížit chybové působení PCR procedury. Určitě nejlepším způsobem „optimalizace“ je designování primerů specifických pro daný typ repetice (tímto způsobem detekoval i velmi vzácně zastoupené typy sekvencí např. Rauscher

et al. 2002). Tento postup je však složitý a časově i finančně náročný a proto řada výzkumníků volí jednodušší variantu – zaklonování primárního PCR produktu. Sekvenací jednotlivých klonů pak získáme „čisté“ sekvence z jednotlivých typů paralogních sekvencí, které můžeme považovat za haplotypy (resp. ribotypy). Identifikace jednotlivých haplotypů otevírá široké možnosti v oblastech fylogeografie. K ribotypům můžeme do jisté míry přistupovat stejně jako k cpDNA haplotypům – odvozovat genealogické vztahy (Koch et al. 2006), nebo detekovat přítomnost refugií na základě prostorového rozložení variability ribotypů (Rosello et al. 2007).

Nevýhody klonovacího přístupu spočívají v tom, že ne vždy se nám může podařit „sesbírat“ všechny přítomné typy haplotypů (Alvarez & Wendel 2003). I když se však podaří identifikovat všechny ribotypy, stále přetrvává nebezpečí, že některý z nich bude představovat chimérickou sekvenci nebo pseudogen. V obou případech je nutné danou sekvenci rozpoznat a z dalšího uvažování ji vyloučit, jinak bychom mohli dojít ke značně pozměněným výsledkům fylogenetických analýz. Rozpoznání pseudogenu (alespoň v jeho pozdějších stádiích degradace) nemusí být obtížné – na jeho přítomnost může poukazovat např. zvýšená rychlost mutací (dlouhé větve ve vytvářených klado- a fenogramech), přítomnost mutací v jinak konzervativní oblasti 5.8S, veliké indely či změny v předpokládané sekundární struktuře ITS (Alvarez & Wendel 2003, Eidesen et al. 2007). Na přítomnost chimér (tedy rekombinací vzniklých „směsných“ sekvencí) nás může upozornit už samotný nezvykle vysoký počet nalezených odlišných typů sekvencí (Rosello et al. 2007). Další možností je provést předběžnou kladistickou analýzu všech izolovaných ribotypů a z dalších analýz vyloučit všechny „podezřelé“ se chovající sekvence, projevující se jako dlouhé terminální větve (Eidesen et al. 2007). Obtížně řešitelným problémem může být situace, kdy u nějaké vývojové linie došlo k zafixování chimérické sekvence vlivem homogenizačních procesů *concerted evolution*.

Krátce se zastavme u působení *concerted evolution* v případě polyploidů. Zde může docházet k obzvláště komplikovaným situacím zejména tehdy, když se homogenizační procesy ubírají různým směrem v různých liniích studovaného komplexu. Případy tzv. dvousměrné *concerted evolution* zaznamenali např. Wendel et al. (1995) u allotetraploidních bavlníků, *Gossypium* (genomy A a D). U různých druhů bavlníků, které divergovaly ze společného předka (s kompletním genomem AD) výrazně převládal vždy pouze jeden typ ITS sekvence (buď A nebo D, Wendel et al. 1995)\*. Zvláštní případ ploidii zatížené chyby, pravděpodobně také v důsledku dvousměrné *concerted evolution*, zaznamenali Eidesen et al. (2007) u autopolyploidního komplexu *Vaccinium uliginosum*. Diploidní a polyploidní (4x, 6x) cytotypy silně „tíhly“ k homogenizaci odlišného typu paralogní sekvence, což dokonce vedlo k rozdělení diploidů a polyploidů do samostatných kladů v sestaveném ITS stromu. Až po vyizolování jednotlivých ribotypů (klonováním) se ukázalo, že většina zkoumaných jedinců má v sobě jak „diploidní“ tak i „polyploidní“ sekvenci. ITS data pak byla z dalších úvah této fylogeografické studie vyloučena (Eidesen et al. 2007).

### 5.4.2.2 *Low copy alternativa*

Vhodnou alternativou k mnohdy nespolehlivým *high copy* rDNA úsekům mohou být nekódující části (introny a mezigenové spacery) jaderných *low copy* genů (lcnDNA). Hlavní výhodou je takřka nepřeberné množství jaderných genů, ze kterých můžeme volit vhodné, vzájemně nezávislé markery (Small et al. 2004). Předpokládá se, že lcnDNA také slaběji

---

\* Přímé sekvenování primárního PCR produktu dokonce odhalilo vždy pouze jediný typ (A nebo D) a přítomnost druhého (vzácnějšího) typu sekvence detekovaly až jiné, citlivější postupy – FISH a Southernova hybridizace (Small et al. 2004). V tomto případě tedy došlo ke sečtení vlivu metodické chyby a dvousměrné *concerted evolution*.

podléhá nevyzpytatelným procesům *concerted evolution* (Popp 2004). Nevýhodami může být složitější (a mnohdy takřka neznámá) genetická struktura a evoluční dynamika těchto úseků, a především obtížný způsob získávání *low-copy* markerů (Small et al. 2004). V současné době neexistuje nějaký spolehlivý a univerzálně použitelný metodický postup a amplifikace konkrétního lcnDNA markeru u určité skupiny se tak neobejde bez náročného designování specifických primerů a optimalizace PCR podmínek (Popp 2004)

## 6. Závěr

### **Jedinečnost studované problematiky**

Reliktní populace *Knautia arvensis* představují unikátní příklad rychlé postglaciální alopatrické speciace na ostrovních biotopech. Výjimečnost tomuto případu dodává zatím neznámá role edaficky extrémního hadcového substrátu a výrazné zapojení mikroevolučních mechanismů běžně působících v rámci celého rodu *Knautia*, zejména polyploidizace a homoploidní hybridizace. *K. arvensis* proto může sloužit i jako vhodná modelová skupina pro objasnění některých obecných mikroevolučních otázek. V kontextu evropských fylogeograficky zaměřených prací je studie hadcové *K. arvensis* také poměrně výjimečným případem. Středem zájmu této studie je evoluční historie holocénního (postglaciálního) reliktního taxonu a nikoliv problematika glaciálních refugií, horských reliktních nebo rozsáhlých postglaciálních expanzí, kterou studuje současná evropská fylogeografie především. Evoluční historie našeho chřastavce začíná tam, kde řada fylogeografických prací končí – migrací do otevřené středoevropské krajiny po ústupu kontinentálního ledovce.

### **Vhodné metodické přístupy**

Ucelenější pohled na evoluční historii reliktních populací *K. arvensis* zprostředkuje pouze kombinace více odlišných avšak vzájemně se doplňujících metodických přístupů. V žádném případě nelze spoléhat na jedinou vše řešící metodu a to ani v oblasti molekulárních přístupů. Vhodnou kombinací několika markerů odpovídajících na jednotlivé dílčí otázky však můžeme dospět k poměrně komplexní představě (viz např. Eidesen et al. 2007, Koch et al. 2006, Trewick et al. 2002). Na závěr tedy shrňme možné přínosy výše diskutovaných metod pro řešení nastíněných otázek naší studie a také zdůrazněme hlavní omezení, kterými tyto metody trpí.

- **Morfometrické přístupy** (klasické i geometrické) poskytují cennou informaci o míře a případných trendech v morfologické proměnlivosti studovaných populací. Studium morfologie může definovat znaky, které budou vhodné pro odlišení jednotlivých taxonů *K. arvensis* přímo v terénu. Komplikaci představuje zejména vysoká fenotypická plasticita morfologických znaků.
- **Průtoková cytometrie** především umožní rychlé stanovení stupně ploidie u velkého množství vzorků. Masivní cytometrický *screening* na populační úrovni objasní cytotypovou strukturu studovaných populací (např. výskyt minoritně zastoupených cytotypů, triploidních kříženců). S využitím FCM je také možné stanovit absolutní velikost genomu studovaných rostlin a využít případné rozdíly v této charakteristice jako dalšího (např. determinačního) markeru. Nevýhodou FCM je především potřeba analyzovat čerstvý materiál.



- AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) dovolí rychle a v rozsáhlém měřítku stanovit míru vnitro- a mezipopulační genetické variability, určit genetickou strukturu populací (a z ní nepřímo odvodit genový tok) a zjistit příbuznost jednotlivých populací (rozdělením do geneticky podobných skupin). Pro populačně genetické otázky je velkou nevýhodou dominantní povaha AFLP markerů, pro rekonstrukci příbuzenských vztahů představuje hlavní nebezpečí nejistá homologie sledovaných proužků.
- Sekvenování nekódujících úseků DNA (cpDNA a jaderné rDNA) může v první řadě otevřít pohled do spleti fylogenetických vztahů mezi jednotlivými populacemi a taxony. V případě dostatečné variability markerů bude možné zjistit genealogické vztahy mezi variantami (haplotypy) sekvenovaných úseků a porovnat je se současným geografickým *pattern* vylišených linií. Kritické porovnání chloroplastových dat s daty jadernými (rDNA) a celogenomovými (AFLP) také umožní určit minimální počet polyploidizačních událostí ve studované skupině. Nevýhodou cpDNA je často velmi nízká variabilita, hlavní nebezpečí pro využití nekódujících oblastí rDNA (ITS) představují nezhomogenizované paralogní úseky a vliv rekombinace.

# Literatura

- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. (2004): Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. – *Italian Journal of Zoology* 71: 5-16
- Alvarez I, Wendel JF. (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434
- Antonovics J, Bradshaw AD, Turner RG (1971): Heavy metal tolerance in plants. – *Advances in Ecological Research* 7: 1-85
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC. (1987): Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522
- Baldwin BG. (2005): Origin of the serpentine-endemic herb *Layia discoidea* from the widespread *L. glandulosa* (Compositae). – *Evolution* 59(11): 2473–2479:
- Baldwin BG., Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbel CS, Donoghue MJ. (1995): The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. – *Annals of Missouri Botanical Garden* 82: 247-277
- Barow M, Meister A. (2002): Lack of correlation between AT frequency and genome size in higher plants and the effect of nonrandomness of base sequences on dye binding. – *Cytometry* 47: 1–7.
- Benham J, Jeung JU, Jasieniuk M, Kanazin V, Blake T (1999): Genographer: a graphical tool for automated fluorescent AFLP and microsatellite analysis. – *Journal of Agricultural Genomics* 4: 399  
[<http://hordeum.oscs.montana.edu/genographer/>]
- Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P. (2004): How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. – *Molecular Ecology* 13, 3261-3273
- Boyd RS, Martens SN. (1998): Nickel hyperaccumulation of *Thlaspi montanum* var. *montanum* (Brassicaceae): A constitutive trait. – *American Journal of Botany* 85:259–65
- Brady KU, Kruckeberg AR, Bradshaw HD Jr. (2005): Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. – *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 36: 243-266
- Breton Sintes S (1975): Contribution cytogenétique a l'étude des *Knautia* (Dipsacaceae) du Plateau Central Français – *Annee Biologique* 14: 45-67
- Breton Sintes S, Cauderon Y. (1969): Analyse morphologique et cytogenétique d'hybrides expérimentaux entre *Knautia* tetraploïde. – *Bulletin de la Societe Botanique de France* 117: 221-242
- Breton Sintes S, Cauderon Y. (1969): Analyse morphologique et cytogenétique d'un hybride triploïde (*Knautia basaltica* x *K. arvernensis*). – *Bulletin de la Societe Botanique de France* 116: 125-136
- Breton Sintes S. (1969): Etude cytotaxonomique du *Knautia arvensis* (L.) Coult. diploïde (2n=20). Sa répartition en Auvergne. – *Bulletin de la Societe Botanique de France* 116: 189-193
- Breton Sintes S. (1974a): Etude biosystematique du genre *Knautia* (Dipsacaceae) dans le Massif Central français. I. Analyse morphologique, phytosociologique et cytogenétique des especes. – *Annales des sciences Naturelles, Botanique* 12: 197 - 254.
- Breton Sintes S. (1974b): Etude biosystematique du genre *Knautia* (Dipsacaceae) dans le Massif Central français. I. Analyse morphologique et cytogenétique d'hybrides expérimentaux. – *Annales des sciences Naturelles, Botanique* 12: 277-320
- Briggs D., Walters S.M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin.– Vydavatelství UP, Olomouc.; orig. Briggs D., Walters S.M. (1997): *Plant variation and evolution*. – Cambridge University Press, 3rd. ed.
- Brochmann C, Brysting AK, Alsos IG, Borgen L, Grundt HH, Scheen AC, and Elven R. (2004): Polyploidy in arctic plants. – *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 521-536.
- Cobon AM., Murray BG. (1983): Evidence for the Absence of Chromosome Differentiation in Populations of *Silene maritima* with. Growing on Heavy-Metal-Contaminated Sites. – *New Phytologist*. 94: 643-646
- Coulaud J, Barghi N, Lefèbvre C, Siljak-Yakovlev S. (1999): Cytogenetic variation in populations of *Armeria maritima* (Mill.) Willd. in relation to geographical distribution and soil stress tolerances – *Canadian Journal of Botany*, 77: 673-686
- Čech L., Šumpich J., Zabloužil V., et al. (2002): Jihlavsko. In: Mačkovčín P. & Sedláček M. (eds.): *Chráněná území ČR, svazek VII. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a EkoCentrum Brno, Praha.*

- Després L, Gielly L, Redoutet B, Taberlet P (2003): Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 185-196.
- Doležel J, Bartoš J. (2005): Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. – *Annals of Botany* 95: 99 – 110
- Doležel J, Gohde W. (1995): Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. – *Cytometry* 19: 103 – 106
- Doležel J. (1991): Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. – *Phytochemical Analysis* 2: 143 – 154
- Doležel J. (2007): Application of flow cytometry for the study of plant genomes. – *Journal of Applied Genetics* 38: 285 – 302
- Doležel J., Greilhuber J., Suda J. (2007): Flow Cytometry with Plants - an Overview. – In: Doležel J., Greilhuber J., Suda J. [eds.]: *Flow Cytometry with Plant Cells. Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*, pp. 41-65. Wiley
- Dvořák R. (1940): Překvapující rozdíl ve vzrůstu rostlin. Giganti a trpaslíci. – *Příroda* 33: 238-240
- Ehrendorfer F. (1962a): Beiträge zur Phylogenie der Gattung *Knautia* (Dipsacaceae), I. Cytologische Grundlagen und allgemeine Hinweise. – *Österreichische Botanische Zeitschrift* Z. 109: 276-343.
- Ehrendorfer F. (1962b): Cytotaxonomische Beiträge zur Genese der mitteleuropäischen Flora und. Vegetation. – *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 75: 137-152
- Ehrendorfer F. (1964): Evolution and karyotype differentiation in a family of flowering plants: Dipsacaceae. – In: *Genetics today (Proceedings of the XI International Congress of Genetics)*, p. 399-407, Oxford, London, Edinburgh, New York, Paris, Frankfurt
- Ehrendorfer F. (1965): Dispersal mechanisms, genetic systems, and colonizing abilities in some flowering plant families. – In H.G Baker and G.L. Stebbins [eds.]: *The genetics of colonizing species*, p.331-352, Academic Press, New York.
- Ehrendorfer F. (1976): *Knautia* L. – In: Tutin, T. et al. [Eds.]: *Flora. Europaea*, Vol. 4, p. 60–67, Cambridge University Press
- Ehrendorfer F. (1981): Neue Beiträge zur Karyosystematik und Evolution der Gattung *Knautia*. (Dipsacaceae) in den Balkanländern. – *Botanische Jahrbuch der Systematischen Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 162: 225-238
- Eidesen PB, Alsos IG, Popp M, Suda J, Stensrud O, Brochmann C (2007): Nuclear versus plastid data: complex Pleistocene history of a circumpolar key species. – *Molecular Ecology* (accepted)
- Ennos RA, Sinclair WT, Hu XS, Langdon A. (1999): Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. – In P. M. Hollingsworth, R. M. Bateman, and R. J. Gornall [eds.]: *Molecular systematics and plant evolution.*, p. 1–19. Taylor & Francis, London, UK
- Forde MB., Faris DG. (1962): Effect of introgression on the serpentine endemism of *Quercus durata*. – *Evolution*. 16(3):338-347
- Gottlieb LD. (2004): Rethinking classic examples of recent speciation in plants. – *New Phytologist* 161: 71-82.
- Greilhuber J, Tensch E, Loureiro J. (2007): Nuclear DNA content measurement. – In: Doležel J., Greilhuber J., Suda J. [eds.]: *Flow Cytometry with Plant Cells. Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*, pp. 67–102. Wiley
- Greilhuber J. (2005): Intraspecific variation in genome size in angiosperms: Identifying its existence. – *Annals of Botany* 95: 91-98
- Guo Y-P, Saukel J, Mittermayr R, Ehrendorfer F. (2005): AFLP analyses demonstrate genetic divergence, hybridization, and multiple poly-ploidization in the evolution of *Achillea* (Asteraceae-Athemideae). – *New Phytologist* 166: 273-289.
- Harris SA, Ingram R (1991): Chloroplast DNA and biosystematics: The effects of intraspecific diversity and plastid transmission. – *Taxon*, 40, 393–412
- Hedrén M, Fay M, Chase MW. (2001): Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). – *American Journal of Botany* 88: 1868–1880.
- Hegi G. (1918): *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*, Vol. 6(1), J.F. Lehmann, Munchen.

- Holub J., Procházka F. (2001): Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). – Příroda, 18: 1–166.
- Hrudička J (1937): Klimatografie jihozápadní Moravy se zřetelem k poměrům refugia mohelenského. [Mohelno: soubor prací věnovaných studiu významné památky přírodní]. – Archiv svazu ochrany přírody a domoviny v zemi Moravskoslezské vol. 1a: 5-47
- Husband BC, Sabara HA. (2003): Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium*. – *New Phytologist* 161:703-713.
- Iwata H, Ukai Y (2002): SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. – *Journal of Heredity* 93: 384-385
- Kachidze N. (1929): Karyologische Studien über die Familie der Dipsacaceen. – *Planta* 7: 482-502
- Kaplan Z. (1998): Relict serpentine populations of *Knautia arvensis* s. l. (Dipsacaceae) in the Czech Republic and an adjacent area of Germany. – *Preslia* 70: 21–31.
- Karp A, Seberg O, Buiatti, M. (1996): Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. – *Annals of botany* 78: 143-149
- Koch M, Kiefer C, Vogel J, Ehrich D, Brochmann C, Mummenhoff K. (2006): Three times out of Asia Minor - the phylogeography of *Arabis alpina* L. (Brassicaceae). – *Molecular Ecology*; 15: 825-839.
- Koopman WJM, Zevenbergen MJ, Van den Berg RG. (2001): Species relationships in *Lactuca S. L.* (Lactuceae, Asteraceae) inferred from AFLP fingerprints. – *American Journal of Botany* 88: 1881-1887.
- Krahulcová A. (1998): Karyologie cévnatých rostlin při aplikaci metod klasického barvení chromosomů. – Ms.
- Krahulcová A., Štěpánková J. (1998): Serpentine and polyploid differentiation within *Galium pumilum* agg. (Rubiaceae) in Eastern C. Europe. – *Folia Geobotanica* 33: 87–102
- Kron P, Suda J, Husband BC. (2007): Applications of flow cytometry to population biology. – *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38 (accepted)
- Kruckeberg AR. (1954): The ecology of serpentine soils: A symposium. III. Plant species in relation to serpentine soils. – *Ecology* 35: 267–74
- Kruckeberg AR. (1957): Variation in fertility of hybrids between isolated populations of the serpentine species *Streptanthus glandulosus* Hook. – *Evolution* 11: 185-211
- Kruckeberg AR. (1967): Ecotypic response to ultramafic soils by some plant species of north- western United States. – *Brittonia* 19:133–151
- Kruckeberg AR. (1984): California Serpentine: Flora, Vegetation, Geology, Soils and Management Problems – University of California Press.
- Kruckeberg AR. (1986): An essay: The stimulus of unusual geologies for plant speciation. *Systematic Botany* – 11: 455–463.
- Kruckeberg AR. (1991): An essay: Geoedaphics and island biogeography for vascular plants -*Aliso* 13: 225-238.
- Kruckeberg AR.(1951): Intraspecific variability in response of certain native plant species to serpentine soil. – *American Journ. Botany* 38: 408-419
- Kruckeberg AR., D. Rabinowitz. (1985): Biological aspects of endemism in higher plants. –*Annual Reviews of Ecology and Systematics* 16: 447–479.
- Křísa B. (1988): *Asplenium*. – In: Hejný, S. & Slavík, B. [eds.]: *Květena ČR.*, Vol. 1. – Academia, Praha.
- Leitch IJ, Bennet MD (2007): Genome Size and its Uses: the Impact of Flow Cytometry – In: Doležel J., Greilhuber J., Suda J. [eds.]: *Flow Cytometry with Plant Cells. Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*, pp.153–176. Wiley
- Leitch IJ, Bennett MD. (2004): Genome downsizing in polyploid plants. – *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 651–663
- Lewis H. (1962): Catastrophic selection as a factor in speciation – *Evolution* 16: 257–271
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C. (2006): Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. – *Annals of Botany* 98: 679 – 689
- Macků J. (1960): Mohelenská hadcová step. – *Živa* 1960/2: 42-45
- Macholán M, Munclinger P. (2004): Analýzy nukleových kyselin. – In: Zima J, Macholán M, Munclinger P, Piálek J.: *Genetické metody v zoologii.*, p. 117-159, Karolinum, Praha.
- Macholán M. (1999): Prokrustes, deformace a nová morfometrie. – *Vesmír* 78: 35–39

- Marhold K. & Suda J. (2002): Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody). Karolinum
- Mayer MS., Soltis PS. (1994): The evolution of serpentine endemics: a cpDNA phylogeny of *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae). – *Systematic Botany* 19: 557–574.
- Mayer MS., Soltis PS. (1999): Intraspecific phylogeny analysis using ITS sequences: insights from studies of the *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae). – *Systematic Botany* 24: 47–61.
- Mayer MS., Soltis PS., Soltis DE. (1994): The evolution of the *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae): genetic divergence and gene flow in serpentine endemics. – *American Journal of Botany* 81: 1288–1299.
- McCauley DE. (1995): The use of chloroplast DNA polymorphism. in studies of gene flow in plants. – *Trends in Ecology and Evolution* 10: 198–202
- Mengoni A., Gonnelli C., Brocchini E., Galardi F., Pucci S., Gabbriellini R., Bazzicalupo M. (2003): Chloroplast genetic diversity and biogeography in the serpentine endemic Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. – *New Phytologist*. 157: 349-356
- Mueller UG., Wolfenbarger L. (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. – *Trends in Ecology and Evolution* 14: 389-394
- Neustupa J. (2006): Co je to geometrická morfometrika. – *Živa* 54: 54-56.
- Novák FA. (1928): Ekologické úvahy o hadcových rasách a hadcové vegetaci. – *Věda přírodní* 9: 18-21, 46-51, 81-88, 176-192, 239-242, 268-287, 310-314
- Nyberg Berglund A-B (2005): Postglacial colonization and parallel evolution of metal tolerance in the polyploid *Cerastium alpinum*. PhD thesis. [Dept. of Plant Biology and Forest Genetics, SLU, Uppsala]
- Nyberg Berglund A-B., Dahlgren S., Westerbergh A. (2003): Evidence for parallel evolution and site-specific selection of serpentine tolerance in *Cerastium alpinum* during the colonization of Scandinavia. – *New Phytologist* 161: 199–209.
- O'Dell R.E., James J.J., Richards J.A. (2006): Congeneric serpentine and nonserpentine shrubs differ more in leaf Ca:Mg than in tolerance of low N, low P, or heavy metals. – *Plant and Soil Journal* 280: 49-64.
- Olmstead RG, Palmer JD. (1994): Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. – *American Journal of Botany* 81:1205-1224
- Otto F. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. – In: Crissman H.A. & Darzynkiewicz Z. (eds.): *Methods in Cell Biology*. Vol. 33. - Academic Press, New York. Pp. 105-110.
- Ouborg NJ, Piquot Y, Groenendael JM. (1999): Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. – *Journal of Ecology* 87: 551-568
- Palme AE, Su Q, Palsson S, Lascoux M (2004): Extensive sharing of chloroplast haplotypes among European birches indicates hybridization among *Betula pendula*, *B. pubescens* and *B. nana*. – *Molecular Ecology* 13, 167-178
- Pepper AE., Norwood LE. (2001): Evolution of *Caulanthus amplexicaulis* var. *barbarae* (Brassicaceae), a rare serpentine endemic plant: A molecular phylogenetic perspective. – *American Journal of Botany* 88:1479–89
- Petit RJ, Csaikl UM, Bordács S, Burg K, Coart E, Cottrell J et al (2002): Chloroplast DNA variation in European white oaks. Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. – *Forest Ecology and Management* 156: 5-26
- Plaksina TI. (1999): Samarskaya luka as a natural phenomenon of the middle Povolzhje. – *Vestnik Samarskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Matematika, Mekhanika, Fizika, Khimiya* 2: 158-171
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005): Genotyping errors: causes, consequences and solutions. – *Nature Reviews Genetics* 6, 847-859
- Popp M, Erixon P, Eggens F, Oxelman B. (2005): Origin and evolution of a circumpolar polyploid species complex in *Silene* (Caryophyllaceae) inferred from low copy nuclear RNA polymerase introns, rDNA, and chloroplast DNA. – *Systematic Botany* 30(2) 302-313.
- Popp M.(2004): Disentangling the reticulate history of polyploids in *Silene* (Caryophyllaceae) – PhD thesis [Department of Evolutionary Biology, Systematic Botany, Uppsala University] Uppsala, Sweden.
- Price HJ, Hodnett G, Johnston JS. (2000): Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce Propidium Iodide Fluorescence. – *Annals of Botany* 86: 929-934.

- Proctor J, Woodell SRJ. (1975): The ecology of serpentine soils. – *Advances in Ecological Research*. 9:255–365
- Proctor J. (1999): Toxins, nutrient shortages and droughts: the serpentine challenge. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 334–35
- Rajakaruna N. (2004): The edaphic factor in the origin of plant species. – *International Geology Review* 46: 471-478
- Rajakaruna, N., Siddiqi, MY., Whitton, J., Bohm, BA., Glass ADM. (2003): Differential responses to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> in two edaphic races of the *Lasthenia californica* complex (Asteraceae): A case for parallel evolution of physiological traits. – *New Phytologist* 157: 93-103
- Rauscher JT, Doyle JJ, Brown AH. (2002): Internal transcribed spacer repeat-specific primers and the analysis of hybridization in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploid complex – *Molecular Ecology* 11: 2691-2702
- Raven PH. (1964): Catastrophic selection and edaphic endemism – *Evolution* 18: 336-338.
- Rieseberg LH, Soltis DE. (1991): Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. – *Evolutionary Trends in Plants*, 5: 65-84
- Robinson JP, Harris SA. (1999): Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective. – In: Gillet E.M.[ed.]: *Which DNA Marker for Which Purpose?* [<http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>]
- Rosello JA, Lazaro A, Cosin R, Molins A. (2007): A phylogeographic split in *Buxus balearica* (Buxaceae) as evidenced by nuclear ribosomal markers: when ITS paralogues are welcome. – *Journal of Molecular Evolution* 64: 143–157
- Segraves KA, Thompson JN, Soltis PS, Soltis DE (1999): Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossulariifolia*. – *Molecular Ecology* 8: 253-262.
- Sernander R (1906): Entwurf einer Monographie der europäischen Myrmekochoren. – *Kungl. Svensk. Vetenskapsakad. Handl.* 41: 1-410
- Shaw J., Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL. (2005): The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. – *American Journal of Botany* 92:142-166
- Schaal B., Olsen K. (2000): Gene genealogies and variation within plant populations. – *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 7024-7029
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT, Smith WA. (1998): Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. – *Molecular Ecology* 7: 465–474
- Slingsby D. (1988): The Serpentine Problem: Too Much 'Stress'? – *Journal of Biogeography* 15: 389-390
- Small RL, Cronn RC, Wendel JF. (2004): L.A.S. Johnson Review No. 2. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants – *Australian Systematic Botany* 17:145-170
- Soják J. (1960): *Potentilla crantzii*, nový relikv v české květeně. – *Preslia* 32: 369-388
- Suda J. & Trávníček P. (2006): Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry: new prospects for plant research. – *Cytometry Part A* 69A/4: 273-280
- Suda J. 2004. An employment of flow cytometry into plant biosystematics. – PhD thesis [Faculty of Natural Sciences, Charles University], Praha.
- Suda J., Kron P., Husband B. C., & Trávníček P. (2007): Flow Cytometry and Ploidy: Applications in Plant Systematics, Ecology and Evolutionary Biology. – In: Doležel J., Greilhuber J., Suda J. [eds.]: *Flow Cytometry with Plant Cells. Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*, pp. 103-130. Wiley
- Suza J. (1928): Geobotanický průvodce serpentinovou oblastí u Mohelna na jihozápadní Moravě. – *Rozpravy II. třídy České akademie věd* 37, č. 31
- Szabo Z. (1905): Monographie der Gattung *Knautia* – *Botanische Jahrbuch* 36: 389-442
- Šmarda P, Bureš P. (2006): Intraspecific DNA content variability in *Festuca pallens* on different geographical scales and ploidy levels. – *Annals of Botany* 98: 665-678
- Štěpánek J. & Procházka F. (1999): *Knautia arvensis* (L.) Coulter subsp. *pseudolongifolia* (Szabó) O. Schwarz. – In: Čeřovský J., Feráková V., Holub J., Maglocký Š. & Procházka F. [eds.]: *Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů ČR a SR*. 5. Vyšší rostliny, p. 205, Příroda, Bratislava.
- Štěpánek J. (1979): Příspěvek k řešení taxonomicko-chorologické problematiky komplexu *Knautia arvensis* v ČSSR. – Msc. thesis [Katedra Botaniky Přírodovědecké Fakulty UK], Praha

- Štěpánek J. (1982): Die Chromosomenzahlen von tschechoslowakischen Arten der Gattung *Knautia* L. (Dipsacaceae) – *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 17: 359-386
- Štěpánek J. (1983): Rozšíření chrastavce křovištního (*Knautia drymeia* Heuffel subsp. *drymeia*) v Českoslovenku. – *Zprávy Československé Botanické Společnosti* 18: 161-172.
- Štěpánek J. (1989): Chrastavec rolní krkonošský – *Knautia arvensis* (L.) Coulter subsp. *pseudolongifolia* (Szabó) O. Schwarz. – In: Slavík B. et al. [eds.]: Vybrané ohrožené druhy flóry ČSR, *Studie ČSAV* 10: 25–36, Academia, Praha.
- Štěpánek J. (1997): *Knautia* L. – chrastavec. – In: Slavík B. [ed.]: Květena České republiky, Vol. 6, p. 543–554, Academia, Praha.
- Štěpánek J. (1985): *Knautia* L. – In: Bertová L. [ed.]: Flóra Slovenska, Vol. IV/2, p.154–177, Veda, Bratislava
- Štěpánková J. (1996): Karyological variation in the group of *Myosotis alpestris* (Boraginaceae). – *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 31: 251–262
- Štěpánková J. (1997): The effect of serpentine on morphological variation in the *Galium pumilum* group (Rubiaceae). – *Thaiszia* 7: 29-40
- Taylor SI., Levy F. (2002): Responses to soils and a test for preadaptation to serpentine in *Phacelia dubia* (Hydrophyllaceae). – *New Phytologist* 155:437–47
- Těšitel J. (2005): Variabilita *Melampyrum sylvaticum* agg. v části Střední Evropy. – BSc thesis [Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích] České Budějovice, Czech Republic
- Trewick SA, Morgan-Richards M, Russell SJ, Henderson S, Rumsey FJ, Pinter I, Barrett JA, Gibby M, Vogel JC (2002): Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: Evidence from chloroplast DNA. – *Molecular Ecology* 11: 2003-2012
- Tribsch A, Schönswetter P, Stuessy TF. (2002): *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the ice-age in the Eastern Alps. – *American Journal of Botany*, 89: 2024-2033
- Unar J. (1996): Přehled druhové skladby dřevinné a bylinné vegetace NPR Mohelenská hadcová step. – Přírodovědný sborník Západomoravského muzea v Třebíči 37: 1–99
- Van Dijk P, Bakx-Schotman T. (1997): Chloroplast DNA phylogeography and cytotype geography in autopolyploid *Plantago media*. – *Molecular Ecology* 6: 345-352
- Vandvik V, Vange V. (2003): Germination ecology of the clonal grassland herb *Knautia arvensis*: regeneration strategy and geographic variation. – *Journal of Vegetation Science* 14: 591-600.
- Vange V. (2002): Breeding system and inbreeding depression in the clonal plant species *Knautia arvensis* (Dipsacaceae): implications for survival in abandoned grassland. – *Biological Conservation* 108: 59-67.
- Verlaque R. (1975): Contribution a l'etude caryologique des Dipsacaceae de la. Mediterranee orientale. – *Biologia Gallo-Hellenica* 6: 75-100
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414
- Wakasugi T., Sugita M., Tsudzuki T., Sugiura M. (1998): Updated gene map of tobacco chloroplast DNA. – *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 231–241
- Wendel JF, Schnabel A, Seelanan T. (1995): Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). – *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:280-284.
- Westerbergh A., Rune O. (1996): Genetic relationship among *Silene dioica* (Caryophyllaceae) populations on and off serpentine - a review. – *Symbolae Botanicae Upsalienses* 31: 277-284
- Westerbergh A., Saura A. (1992): The effect of serpentine on the population structure of *Silene dioica* (Caryophyllaceae). – *Evolution* 46: 1537-1548
- Yoshioka Y, Iwata H, Ohsawa R, Ninomiya S (2004): Analysis of petal shape variation of *Primula sieboldii* E. Morren by elliptic Fourier descriptors and principal component analysis. – *Annals of Botany* 94: 657-664.
- Zima J, Macholán (2004): Analýza fenotypu. – In: Zima J, Macholán M, Munclinger P, Piálek J.: *Genetické metody v zoologii.*, p. 117-159, Karolinum, Praha.

# Příloha

## Lokality populačních sběrů *Knautia arvensis*

Kód	Název	Lokalita	Datum
<b>Hadcové diploidní populace</b>			
RANS	Staré Ransko	Staré Ransko, okraje lesních cest poblíž rozcestí v záhybu asfaltové cesty St. Ransko - Ranská jezírka, 500 m VSV kóty 642,8 m (U Obrázku); 2 km J obce; a borový les a okraj asfaltové cesty Ranská jezírka - Radostín, v úseku mezi rozcestím s odbočkou do Havlíčkovy Borové a jezírkem v JV cípu PR Ranská jezírka; ca 1,5 km SZ kóty 639,2 (Synkův kopec); 305 km JJZ obce	26.6.2006
BORO	Borovsko	Bernartice u Dol. Kralovic, borový les na vršku mezi potokem tekoucím z obce do vodní nádrže Želivka a levým břehem nádrže; 1 km S kaple v obci; a borový les na plošině a svazích nad vodní nádrží Želivka, mezi silnicí Bernartice-Borovsko, dálnicí a levým břehem zátoky nádrže; cca 2 km SZ kaple v obci	26.6.2006
<b>Hadcové tetraploidní populace</b>			
BORI	Bořinka	Křemže, borový les na plošině nad levým břehem Křemežského potoka, ve střední části PP 12.7.2006 Bořinka; 1,3 km J kostela v obci	
PLAV	Planý vrch	Mnichov, světliny v boru v dolní části PR Planý vrch, 50 - 400 m JZ malých lomů na hadec; 22.7.2006 1,5 km Z kostela v obci	
VLCE	Viček	Prameny, světliny v boru 0 - 100m SV vrcholu Vičí hřbet (882,9) a okraje asfaltové spojnice cest Prameny - Sítiny a Prameny - M. Lázně, ca 600 m SZ Vičího hřbetu; 2 km J obce	22.7.2006
PLBO	Pluhův bor	Mnichov, světliny v boru v JZ, Z a střední části NPR Pluhův bor, ca 1 km J-JJV kóty 803,9; 23.7.2006 2 km SSZ kostela v obci	
<b>Nehadcové diploidní populace</b>			
KOLI	Kolířany	Kolířany, strážky na levé straně hlavní silnice Nitra - Zlaté Moravce, do vzdálenosti 50 m od nadjezdu silnice Kolířany - Nitrianske Hrnčiarovce; 1 km Z kostela v obci	3.7.2006
PODR	Podrečany	Podrečany, strážka nad žel. tratí, 50 m S ŽST Podrečany	3.7.2006
GEPA	Gemerská Panica	Gemerská Panica, loučka mezi hlavní silnicí Tornaľa - Plešivec a odbočkou do obce, 20 m S ŽST Gemerská Panica	4.7.2006
PLES	Plešivec	Plešivec, zarůstající pasienky ca 200 m S křižovatky silnic Plešivec - Domica a odbočky do Sillickej Brezovej; 1 km JV kostela ve městě	7.7.2006
<b>Nehadcové tetraploidní populace</b>			
BENE	Benešov n. Černou	Dluhoště u Benešova n. Černou, louka na Z obráceném svahu v lokalitě Mlýnský vrch, 200m J mostu silničky Desky - Benešov přes řeku Černá, 2 km JJZ osady	22.6.2006
PLAN	Planá u Mar. Lázní	Planá, silniční okraje u křižovatky silničního obchvatu města a silnice Planá - Kyjov; 0,5 km SZ zámku	23.7.2006
ZDIR	Ždírec n. Doubravou	Ždírec n. Doubravou, stráž nad hlavní silnicí Ždírec - Havlíčkův Brod; 200m JZ kruhového objezdu na Z okraji obce	26.6.2006
KLAD	Kladská	Prameny, louky na levé straně silnice Lázně Kynžvart - Prameny, 1,5 km před odbočkou silnice na Mar. Lázně; 2 km JZ středu obce	22.7.2006
HOLU	Holubov	Holubov, okraj asfaltové cesty Holubov - Chlum a přilehlé polní cesty odbočující k Holubovskému mlýnu; ca 700 m Z obce	12.7.2006