

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Morfometrická a genetická analýza skupiny
Centaurea macroptilon

Diplomová práce

Bc. Veronika Otisková

Školitel: Mgr. Petr Koutecký, PhD.

České Budějovice 2015

Otisková V., 2015: Morfometrická a genetická analýza skupiny *Centaurea macroptilon*. [Morphometric and genetic analysis of group *Centaurea macroptilon*, Mgr. Thesis in Czech] – 54 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: Skupina okruhu *Centaurea macroptilon* zahrnuje taxony *Centaurea macroptilon*, *Centaurea oxylepis*, *Centaurea indurata* a křížence. V této diplomové práci byla porovnána morfologická a genetická variabilita mezi taxony této skupiny. Na základě výsledků morfometrické a molekulární analýzy bylo zváženo současné taxonomické pojetí studovaných druhů a byly navrženy změny.

Annotation: *Centaurea macroptilon* group includes taxa *Centaurea oxylepis*, *Centaurea macroptilon*, *Centaurea indurata* and hybrids. In this master thesis we compared morphological and genetic variation among taxa of this group. Based on the results of morphometric and molecular analyzes we re-considered current taxonomic concept of studied species and suggested changes.

Klíčová slova: Chrpa, *Centaurea macroptilon*, *Centaurea oxylepis*, *Centaurea indurata*, morfometrická analýza, genetická variabilita, AFLP.

Keywords: Knapweed, *Centaurea macroptilon*, *Centaurea oxylepis*, *Centaurea indurata*, morphometric analysis, genetic variation, AFLP.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. 12. 2015

Bc. Veronika Otisková

Poděkování

Děkuji svému školiteli Petru Kouteckému za všechnen čas, který mi věnoval při vedení mé diplomové práce, za užitečné rady, za pomoc při statistických analýzách a také za poskytnutý materiál a fotografie. Dále bych chtěla poděkovat všem níže jmenovaným za poskytnutí vzorků: Milan Štech, Alexandru Badarau, Ghizela Vonica, Libor Ekrt. A na závěr bych chtěla poděkovat přátelům a své rodině za podporu nejen během psaní diplomové práce, ale i během celého studia.

1. Úvod	1
1.1. O rodu <i>Centaurea</i>	1
1.2. Studium DNA u rodu <i>Centaurea</i>	2
1.3. Hybridizace	4
1.4. Studované taxony	5
2. Cíle práce	9
3. Metodika	10
3.1. Rostlinný materiál	10
3.2. Morfometrická analýza	11
3.3. Průtoková cytometrie	14
3.4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	14
4. Výsledky	18
4.1. Průtoková cytometrie	18
4.2. Morfometrická analýza	20
4.2.1. PCA	20
4.2.2. Diskriminační analýza	22
5. Diskuze	35
5.1. Výběr populací	35
5.2. Průtoková cytometrie	36
5.3. Morfometrická analýza	36
5.4. AFLP	38
5.5. Shrnutí morfometriky a AFLP	38
5.6. Nomenklatura	39
6. Závěr	41
7. Literatura	42
8. Přílohy	46

1. Úvod

1.1. O rodu *Centaurea*

Rod *Centaurea* patří do čeledi *Asteraceae*. Tento rod zahrnuje přibližně 400-500 druhů (podle některých zdrojů se udává i více než 700 druhů). Je rozšířen v Evropě, jihozápadní Asii a severní Africe, nejvíce druhů je udáváno z jihozápadní Asie, z Turecka a přilehlých oblastí, sekundární diverzitní centrum tohoto rodu je ve Středozeří v oblasti Iberského poloostrova (Dostál 1976, Meusel & Jäger 1992, Hellwig 2004, Garcia-Jacas et al. 2006).

V rámci rodu *Centaurea* jsou problémy s různým vymezením skupin na vnitrorodových taxonomických úrovních (především na úrovni sekcí a nižších). Jednotliví autoři (Garcia-Jacas et al. 2006; Hilpold et al. 2014a, 2014b) vymezují několik různých skupin, mezi tři velké skupiny patří *Centaurea*, *Cyanus* a *Colymbada* (= *Centaurea* podrod *Lopholoma* = *C.* sekce *Acrocentron*). Vymezení těchto skupin je poměrně stabilní, ale jejich vnitřní členění (vymezení sekcí a zařazení druhů do sekcí) se v různých studiích liší na základě molekulárních, taxonomických, geografických, ekologických a karyologických poznatků. Hellwig (2004) rozlišuje tři hlavní skupiny jako samostatné rody a rod *Centaurea* dělí dále do pěti podskupin (*Jacea-Lepteranthus*, *Acrolophus*, *Seridia-Melanoloma*, orientální taxony a podskupina s ostatními úbory), které se dále člení přibližně do 30 sekcí. Podle jiných studií (Garcia-Jacas et al. 2001, 2006; Hilpold et al. 2014b) jsou hlavní tři skupiny podrody rodu *Centaurea*, a to podrody *Cyanus*, *Centaurea* (odpovídá skupině *Jacea* podle Garcia-Jacas et al. 2001, 2006) a *Lopholoma*. Garcia-Jacas et al. (2006) rozdělují dále skupinu *Jacea* (= podrod *Centaurea*) do tří skupin založených na geografii a fylogenetických datech: na široce rozšířenou skupinu (zahrnující Středozeří/Eurosibiřské sekce), západní skupinu (zahrnující sekce s hlavním rozšířením v západním Středozeří) a východní skupinu (zahrnující sekce s hlavním rozšířením ve východním Středozeří) a navrhují také sloučení několika sekcí do větších skupin. Vnitřní členění na úrovni sekcí a nižších se tedy podle různých autorů liší.

Studovanou skupinu *Centaurea macroptilon* zahrnujeme do sekce *Jacea* (v této práci bude použito vymezení sekce podle Štěpánek & Koutecký 2004 a Koutecký 2008), která je ve střední Evropě nejrozšířenější a taxonomicky komplikovaná sekce z podrodu *Centaurea*. Tato sekce odpovídá podrodu *Jacea* podle Flora Europaea (Dostál 1976) a rodu *Jacea* podle Dostála (1989). Dostál (1976) použil další členění podrodu *Jacea* na čtyři sekce, které zahrnovaly 31 taxonů. Podle Dostála (1976) jsou sekce vymezené tvarem přívěšků: sekce

Jacea – okrouhlé celistvé přívěšky, listeny převážně zakrývající, nažky bez chmýru; sekce *Lepteranthus* – kopinaté třásnitě přívěšky, listeny převážně zakrývající, terminální brva delší než boční, nažky s chmýrem; sekce *Nigrescentes* – trojúhelníkovité třásnitě přívěšky, listeny převážně nezakrývající, terminální brva kratší než boční, nažky bez chmýru nebo s krátkým chmýrem; zbývající sekce *Fimbriatae* - trojúhelníkovité třásnitě přívěšky, listeny zakrývající, terminální brva delší než boční, nažky jsou bez chmýru nebo jen s krátkým chmýrem, v této sekci bylo zahrnuto deset taxonů (mezi nimi i taxon *C. macroptilon*), některé z nich se v současnosti považují za hybridy (viz níže). Podle posledních významných fylogenetických studií sekce *Jacea* odpovídá skupině *Jacea-Lepteranthus* (podle Hellwig 2004, Garcia-Jacas et al. 2006) a sekci *Phrygia* podle Hilpold et al. (2014a). López-Alvarado et al. (2014) se pokoušeli vyřešit fylogenetické vztahy v sekci *Phrygia* a sekci *Jacea*. Výsledky nebyly dobře podpořené, přesto vyvodili z dat závěry. Navrhli sloučení obou sekcí do jedné společné sekce *Phrygia* (odpovídalo by to tedy skupině *Jacea-Lepteranthus* podle Hellwig 2004 a sekci *Jacea* podle Koutecký 2008). Tato skupina (sekce) je morfologicky i molekulárně dobře vymezená, ale vztahy mezi taxony této skupiny ani nomenklatura na úrovni sekce nejsou dořešené a všeobecně akceptované, takže v této práci označujeme tuto skupinu tradičním názvem jako sekci *Jacea*. Garcia-Jacas et al. (2000, 2001, 2006) a Hilpold et al. (2014a) do svých fylogenetických studií nezahrnuli žádné taxony ze sekcí *Nigrescentes* a *Fimbriatae* z podrodu *Jacea* (v Dostálově pojetí), jejich taxonomické závěry tedy nemusí úplně odpovídat realitě.

Rostliny ze sekce *Jacea* jsou vytrvalé byliny, většinou v horní polovině větvené. Listy jsou celistvé nebo dolní peřenolaločné až peřenodílné. Významné jsou přívěšky zákrovních listenů, které jsou u sekce *Jacea* nesbíhavé, to znamená, že nesbíhají po okraji listenu, ale jsou pouze na konci listenu. V rámci této sekce mají přívěšky rozmanité tvary. Jsou okrouhlé, celistvé až třásnitě nebo trojúhelníkovité až čárkovité, pravidelně hřebenitě třásnitě. Barva koruny je růžovo-fialová (v různých odstínech). Nažky jsou obvykle bez chmýru nebo jen s krátkým chmýrem cca do 1-2 mm (Dostál 1976, Štěpánek & Koutecký 2004).

1. 2. Studium DNA u rodu *Centaurea*

S nástupem molekulárních metod a nových postupů narostl také zájem o studium DNA u rodu *Centaurea*. V posledních letech se rozšířily fylogenetické studie týkající se vymezení rodu *Centaurea* a snaha o zjištění vzájemných vztahů v tomto komplikovaném rodě (Garcia-Jacas et al. 2000, 2001, 2006; Hilpold et al. 2014a, 2014b; López-Alvarado et al. 2014). Rod

Centaurea byl na základě molekulárních studií, po odstranění některých skupin a změně typu rodu (místo taxonu *Centaurea centaurium* L. = *Rhaponticoides centaurium* (L.) M. V. Agab. & Greuter na taxon *Centaurea paniculata* L.; Garcia-Jacas et al. 2006), vymezen jako monofyletický (Garcia-Jacas et al. 2001, 2006). Poslední nejnovější vymezení rodu *Centaurea* a vnitřní členění sekcí na základě molekulárních dat je popsáno v Hilpold et al. (2014b). Další vymezení rodu jiných autorů je popsáno v předchozí kapitole (viz výše).

Při studiu fylogeneze byly zkoumány úseky jaderné i chloroplastové DNA (Garcia-Jacas et al. 2000, 2001, 2006; Hilpold et al. 2011, 2014a; López-Alvarado et al. 2014). Z jaderné ribozomální DNA se používaly nejčastěji úseky ITS 1 a ITS 2 (Garcia-Jacas et al. 2000, 2001, 2006; Hilpold et al. 2014a), z chloroplastové DNA zkoušeli Garcia-Jacas et al. (2001) úsek *matK*. Hilpold et al. (2011) vyzkoušeli několik chloroplastových markerů, ale jen *rpl32-trnL* byl dostatečně variabilní, ostatní testované úseky byly málo variabilní nebo nebyly vůbec variabilní. Stejný úsek (*rpl32-trnL*) použili Hilpold et al. (2014a) znovu v kombinaci s ITS. López-Alvarado et al. (2014) se pokoušeli vyřešit fylogenetické vztahy v sekci *Phrygia* a sekci *Jacea* na základě několika vybraných jaderných (ITS, ETS) a chloroplastových markerů (*trnL^(UAG)-rpl32*, *ycf3-trnS*). Topologie cpDNA nesouhlasila s nrDNA ani s morfologií rostlin, proto si autoři mysleli, že byly vybrány málo variabilní markery. Výběr správných dostatečně variabilních markerů není vždy jednoduchý (jak dokazuje práce López-Alvarado et al. 2014 nebo práce Hilpold et al. 2011), proto je lepší u chrp při studiu vztahů na nižších taxonomických úrovních využít jiné variabilnější markery než sekvence chloroplastové nebo jaderné ribozomální DNA, jako například u AFLP, metody vhodné ke zkoumání variability celého genomu.

Úspěšné použití metody AFLP je zaznamenáno například v práci Hilpold et al. (2011), kde se snažili vyřešit vztahy v menší skupině z rodu *Centaurea*, skupině *Centaurea cinerea*. Molekulární data poskytla poměrně dobré rozlišení a ukázala genetickou podobnost mezi geograficky blízkými populacemi než mezi morfologicky podobnými populacemi. To ukazuje na alopatickou speciaci skupiny *C. cinerea*. Populace byly prostorově izolované, takže znaky se v každé populaci mohly vyvíjet odlišně, a proto jsou geneticky podobné skupiny morfologicky rozdílné. Skupina *C. cinerea* je morfologicky poměrně málo variabilní, takže taxony jsou často vymezené na základě jednoho nebo jen několika málo znaků, které ale neodráží příbuznost jednotlivých populací, takové vymezení taxonů nemá moc smysl. Znaky, které by dobře odlišily taxony a shodovaly se s molekulárními informacemi, zatím nebyly nalezeny nebo takové znaky ani nejsou. Další použití AFLP je

popsáno v Olšavská et al. (2011), kde studovali variabilitu genomu jiné menší taxonomicky komplikované skupiny - *Centaurea triumfetti* ve střední Evropě. Molekulární data odlišila tři alopatrické skupiny, v rámci jedné skupiny a v rámci taxonu *C. axillaris* data z AFLP nekorelovala s morfologií taxonů, ale ukázala geografickou strukturu. Za příčinu takového výsledku považují Olšavská et al. (2011) biogeografickou historii taxonů, možnost dávné hybridizační události a přirozený výběr některých kvantitativních znaků. V další práci Blair & Hufbauer (2010) pomocí AFLP zkoumali hybridy mezi *Centaurea stoebe* a *Centaurea diffusa*. Data získaná z AFLP odhalila u některých severoamerických populací mezidruhové hybridy a také možnost introgrese neznámého taxonu u *C. diffusa*. Protože se v této diplomové práci zabývám malou skupinou blízkých taxonů, tak pro studium DNA ve skupině *Centaurea macroptilon* byla zvolena metoda AFLP.

1. 3. Hybridizace

Řada chrp ze sekce *Jacea* se nachází v různém stádiu speciace, často nejsou dostatečně vyvinuty reprodukční bariéry, takže v kontaktních oblastech dochází k hybridizaci (Štěpánek & Koutecký, 2004). Základní chromozomové číslo v této sekci je jedenáct, je jednotné v celé sekci (Hellwig 2004) a nejčastěji se taxony vyskytují jako diploidi nebo tetraploidi. V populacích se však vyskytují i jiné ploidie - triploidi, pentaploidi a hexaploidi (Koutecký et al. 2011, 2012). Tyto typy ploidii vznikají v populacích náhodně díky neredukovaným gametám, bývají kvůli triploidnímu bloku neplodné a v populacích se vyskytují jen vzácně jako jednotlivé rostliny.

V sekci *Jacea* se vyskytuje řada polyploidních komplexů, v některých případech dochází v kontaktních zónách dvou různých cytotypů k hybridizaci (Hardy et al. 2001; Koutecký 2007; Koutecký et al. 2011, 2012). Jak dokládají tyto práce, křížení mezi diploidním a tetraploidním cytotypem v rámci druhu je možné, ale dochází k němu jen velmi zřídka díky silné reprodukční bariéře (Hardy et al. 2001; Koutecký et al. 2011, 2012). Pokud však dojde k hybridizaci mezi dvěma cytotypy, tak vznikají triploidní (z redukovaných gamet) nebo mnohem častěji tetraploidní hybridy (neredukované gamety diploidního cytotypu). Tetraploidní hybridy bývají na rozdíl od triploidních hybridů vitální a plodní (Koutecký et al. 2011). Na rozdíl od heteroploidní hybridizace je homoploidní hybridizace mezi druhy v sekci *Jacea* díky nedostatečné mezidruhové reprodukční bariéře běžná (Koutecký et al. 2011). Většina homoploidních hybridů chrp je plodná a často se zpětně kříží s rodičovskými taxony za vzniku variabilních hybridních rojů (Koutecký et al. 2011). Existuje mnoho hybridních zón, kde díky zpětnému křížení a introgresi jsou populace morfologicky velmi

variabilní (Koutecký 2007, Koutecký et al. 2012). Homoploidní hybridizace je častá i v jiných sekcích, např. v sekci *Acrolophus* (Blair & Hufbauer 2010). Hybridizace tedy může výrazně ovlivňovat morfologickou a genetickou variabilitu populací i díky introgresi, kdy morfologicky jedinec nevypadá jako hybrid, ale přesto má určitý podíl genů od jiného taxonu.

Speciální případ homoploidní hybridizace byl zaznamenán v kontaktní zóně dvou tetraploidních taxonů *C. aspera* a *C. seridis* (Garmendia et al. 2015), hybridů mezi rodičovskými taxony vznikají, ale jsou neplodní, což je neobvyklý jev v sekci *Jacea* a některých dalších sekcích (Blair & Hufbauer 2010). U jiných skupin to zase tak neobvyklé není, například u chrp z rodu *Cyanus* je homoploidní hybridizace také omezená (Olšavská & Löser 2013).

1. 4. Studované taxony

Tato práce se zaměřuje na druhy souhrnně označované jako skupina *Centaurea macroptilon*, do které můžeme zahrnout taxony *C. macroptilon* Borbás s. str. (synonyma *C. macroptilon* Borbás subsp. *macroptilon*, *C. jacea* subsp. *macroptilon* (Borbás) Hayek), *C. oxylepis* (Wimm. et Grab.) Hayek (synonyma *C. macroptilon* subsp. *oxylepis* (Wimm. et Grab.) Soó, *C. jacea* subsp. *oxylepis* (Wimm. et Grab.) Hayek) a taxon v Rumunsku tradičně označovaný jako *C. indurata* Janka. Tyto taxony bychom mohli řadit morfologicky mezi *C. jacea* agg. a *C. phrygia* agg. Podle posledního souhrnného přehledu (Dostál 1976), kde můžeme nalézt všechny významné evropské druhy z rodu *Centaurea*, byly *C. oxylepis* a *C. macroptilon* řazeny do sekce *Fimbriatae* z podrodu *Jacea*, která je charakterizována následujícími znaky: přívěsky zákrovních listenů jsou trojúhelníkovité nebo vejčitě trojúhelníkovité, kopinaté nebo vejčitě kopinaté, listeny zakrývající, okraje přívěsků jsou třásnitě, terminální třásně delší než boční a nažky jsou bez chmýru nebo jen s krátkým chmýrem. Pokud se u druhů ze skupiny *C. macroptilon* objeví dlouhý chmýr, může to být způsobeno hybridizací s některým druhem z okruhu *C. phrygia* agg. (Koutecký et al. 2012). V sekci *Fimbriatae* byly, kromě druhu *C. macroptilon* (*C. oxylepis* je zde popsána jako *C. macroptilon* subsp. *oxylepis*), ještě středoevropský druh *C. subjacea* a dva západoevropské druhy *C. decipiens*, *C. microptilon* a dále jsou zmíněna jména několika dalších nejasných druhů, které však Dostál (1976) považoval za hybridy od *C. macroptilon*. O *C. subjacea* se zjistilo, že takto vymezený nehybridní druh neexistuje a jméno patří k hybridovi *C. ×preissmannii*, tj. *C. macroptilon* × *C. jacea* (Koutecký 2009). V této práci řadíme celou skupinu

C. macroptilon do sekce *Jacea* vymezenou podle Štěpánek & Koutecký (2004) a Koutecký (2008), toto pojetí přibližně odpovídá podrodu *Jacea* podle Dostála (1976).

Všechny tři studované taxony jsou vytrvalé byliny s přímou lodyhou 30-90 cm dlouhou, v horní části větvenou. Úbory jsou 15-17×12-14 mm velké, se zelenými a vynikle žilnatými zákrovními listeny, přívěsky zákrovních listenů jsou 5-8 mm dlouhé. Tyto znaky jsou podobné u všech druhů v celé sekci *Jacea* (v pojetí sekce podle Štěpánek & Koutecký 2004). Celá skupina se od ostatních druhů ze sekce *Jacea* odlišuje zejména tvarem přívěsků zákrovních listenů. Přívěsky zákrovních listenů jsou úzce trojúhelníkovité, hřebenitě členěné do pravidelných třásní po 8-15 na každé straně, jsou obloukovitě vyhnuté od zákrovu. Barva nedělené části přívěsku je převážně hnědá (Dostál 1989, Štěpánek & Koutecký 2004). Taxony *Centaurea macroptilon* a *C. oxylepis* jsou si morfologicky velmi podobné, často jsou přiřazovány k jednomu druhu *Centaurea macroptilon* a rozlišují se pouze na úrovni poddruhů subsp. *macroptilon* a subsp. *oxylepis* (Dostál 1976, 1989). Oba taxony se od sebe rozlišují na základě několika znaků, mezi hlavní rozdíly patří velikost zákrovů, velikost přívěsků zákrovních listenů a viditelnost zákrovních listenů (Dostál 1976, 1989). *Centaurea macroptilon* by měla mít zákrovy menší o rozměrech 15×12 mm, přívěsky maximálně 5 mm dlouhé a listeny zcela nezakrývající. *C. oxylepis* na rozdíl od *C. macroptilon* má mít větší zákrovy o rozměrech 16-17×13-14 mm, přívěsky 6-8 mm dlouhé a listeny téměř zcela zakrývající. Třetí taxon z této skupiny, rumunskými botaniky tradičně označován jako *Centaurea indurata* (P. Koutecký, ústní sdělení), je morfologicky podobný *C. macroptilon*; v této diplomové práci používám jméno *C. indurata* v tomto smyslu. Problémy s nejasným rozlišováním taxonů způsobily, že se jméno *C. indurata* používá pro dva různé taxony. Kromě taxonu morfologicky podobnému *C. macroptilon* se v současnosti častěji používá pro taxon ze skupiny *C. phrygia* agg. morfologicky podobný *C. stenolepis* (Dostál 1976, 1989; Ciocârlan 2009). Taxon také označován jako *C. indurata* je uváděn také z Bulharska (Bancheva & Greilhuber 2006), ale nejspíš se jedná o jiný taxon z okruhu *C. phrygia* agg. (P. Koutecký, ústní sdělení). Z Rumunska bylo dříve popsáno také dalších pět druhů (Dostál 1976), které byly zařazeny v sekci *Fimbriatae* s *C. macroptilon* a morfologicky se tomuto druhu podobají. Dostál (1976) je však považoval za nejasně vymezené druhy a předpokládal, že se jedná o hybridy *C. macroptilon* a jiných druhů chrp.

Všechny tři taxony se vyskytují jako tetraploidní cytotypy: $2n = 4x = 44$ (Dostál 1989, Sharkova 1996, Štěpánek & Koutecký 2004, Bancheva & Greilhuber 2006, Koutecký 2007, Koutecký 2008, Dydak et al. 2009). Podle cytologické studie taxonů *C. oxylepis* a *C. jacea*

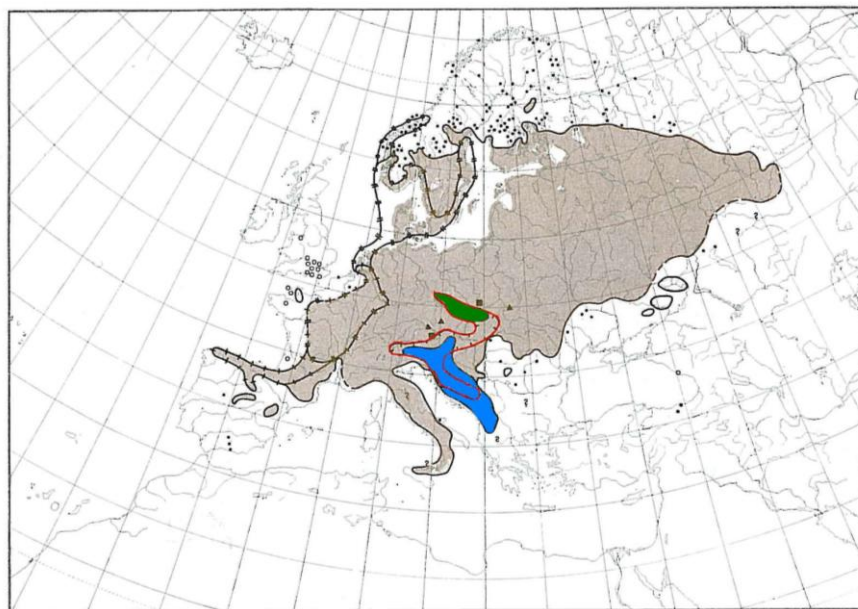
(Dydač et al. 2009), mají tyto dva taxony podobnou velikost genomu, podobnou morfologii chromozomů a podobný počet lokusů rDNA. Tyto podobné vlastnosti mohou znamenat blízký vztah mezi taxony a tím také snadnější hybridizaci. V současnosti se v České republice vyskytuje několik hybridů *C. oxylepis* s ostatními taxony (Štěpánek & Koutecký 2004, Koutecký 2008, Danihelka et al. 2012). Nejčastěji se tento taxon kříží s *C. jacea* za vzniku hybridu *C. ×fleischeri* Hayek. Tento hybrid se vyskytuje běžně v oblasti výskytu *C. oxylepis*, vytváří hybridní roje a od rodičovských taxonů se odlišuje tvarem přívěšků, kdy vytváří velkou škálu intermediálních tvarů a rozměrů mezi rodičovskými taxony. Mezi další hybridy patří *Centaurea ×javorkae* Budai et J. Wagner (*C. nigrescens* × *C. oxylepis*), *Centaurea ×kupcsokiana* (*C. oxylepis* × *C. stoebe*) hybrid zaznamenaný ze střední Moravy (Koutecký 2008). Častá je hybridizace s *C. erdneri*, na severní Moravě je hybridní zóna mezi *C. oxylepis* a *C. erdneri*, a také se zde potkávají s *C. jacea*, za vzniku složitějších hybridů (Štěpánek & Koutecký 2004, Koutecký 2008, Danihelka et al. 2012). Z Rakouska jsou zaznamenáni hybridní *Centaurea ×preissmannii* Hayek (*C. macroptilon* × *C. jacea*) (Koutecký 2009).

Studované taxony se také odlišují areálem rozšíření, viz obrázek 1 (Meusel & Jäger 1992, Dostál 1976, 1989). *Centaurea macroptilon* byla popsána ze SZ části uherské župy Váas - dnes se jedná o Rakousko, spolkovou zemi Burgenland, okolí měst Pinkafeld, Oberwart a Lockenhaus (Borbás 1887). Je rozšířena od Černé Hory přes Bosnu a Hercegovinu, západní Chorvatsko, Slovinsko, východní Itálii, západní a jižní Maďarsko až po jižní a jihovýchodní Rakousko (Dostál 1976, Meusel & Jäger 1992) a podle některých zdrojů (Dostál 1989) její výskyt zasahuje až na východní a střední Slovensko, kde často hybridizuje s *J. pratensis*.

Centaurea oxylepis je původně popsána z oblasti polského Slezska bez konkrétní lokality (Wimmer & Grabowski 1829). V České republice se centrum rozšíření vyskytuje v severovýchodních Čechách, dále je *C. oxylepis* rozšířená v Karpatech na Slovensku, v navazující části Polska a v severním Maďarsku (Koutecký 2008), udáván je i výskyt v Rumunsku (Ciocârlan 2009) – zde není jasné, jestli se jedná o stejný taxon. V oblasti jižního a středního Slovenska jsou tedy v některých pracích (např. Dostál 1989) udávány oba taxony.

Taxon *C. indurata* je popsán z Rumunska z oblasti Mezöség konkrétně z okolí města Sic (v popisu použit původní maďarský název Szég; Janka 1858), které se nachází cca 20 km SV od města Cluj-Napoca.

Ve skupině *Centaurea macroptilon* odlišujeme tedy tři samostatné taxony. Tyto taxony se morfologicky rozlišují pouze na základě dvou kvantitativních znaků (respektive na základě tří znaků: výška a šířka úboru a délka nejdelšího přívěsku), kdy reálné hodnoty nemusí odpovídat hodnotám udávaným v literatuře, a jednoho binárního znaku, který může být hodnocen dosti subjektivně (viditelnost zákrovních listenů). Jako jediné jednoznačné rozlišení taxonů se nabízí geografické oddělení, ale jak se zmiňuje Dostál (1976, 1989) *C. macroptilon* by mohla zasahovat až na jižní a střední Slovensko, tedy až k areálu *C. oxylepis*. V oblasti zahrnující areál *C. oxylepis* a rozšířený areál *C. macroptilon* (podle Dostál 1976), byl popisován výskyt taxonu *C. subjacea* (Meusel & Jäger 1992), zjistilo se ale, že tento taxon je hybrid *C. macroptilon* s *C. jacea* (*C. ×preissmannii*) (Koutecký 2009). Areály taxonů by tedy mohly být blíže u sebe a případně i propojené. Nabízí se tedy otázka, jestli by se v případě těchto tří taxonů, nemohlo jednat pouze o jeden totožný taxon. Proto je cílem této diplomové práce porovnat morfologické znaky všech tří taxonů, zároveň porovnat i genetickou variabilitu taxonů a poté na základě získaných výsledků zhodnotit vztahy ve skupině *C. macroptilon*.



Obr. 1: Areál rozšíření podle Meusel & Jäger (1992), *C. macroptilon* - modře označená oblast, *C. oxylepis* - zeleně označená oblast, *C. subjacea* – červeně ohraničená oblast.

2. Cíle práce

Cílem této práce bylo morfometricky a geneticky porovnat taxony z okruhu *Centaurea macroptilon*.

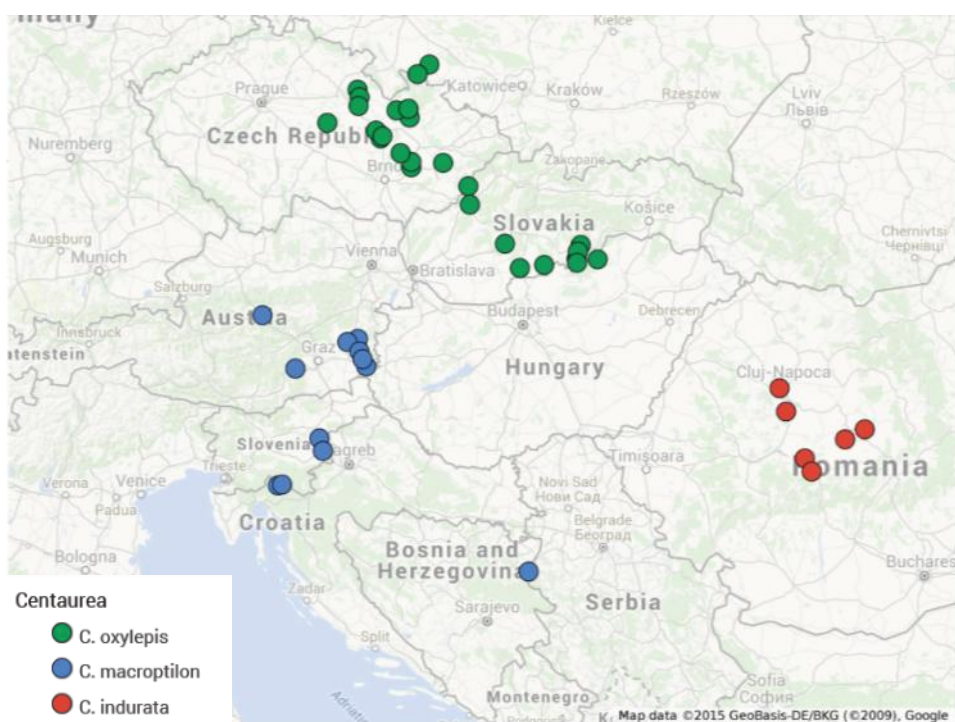
- 1) Pomocí morfometrické analýzy porovnat morfologickou variabilitu taxonů *Centaurea oxylepis*, *Centaurea macroptilon* a *Centaurea indurata*.
- 2) Porovnat genetickou variabilitu všech taxonů pomocí molekulární metody AFLP.
- 3) Na základě morfometrické analýzy a molekulární analýzy zvážit současné taxonomické pojetí studovaných druhů a případně navrhnout změny.

3. Metodika

3. 1. Rostlinný materiál

Na základě záznamů z herbářových položek a literatury jsme vytypovali lokality vhodné pro sběr rostlinného materiálu. Mezi tyto lokality patřily i lokality z původních popisů obou taxonů. U *Centaurea macroptilon* (originální popis viz Borbás 1887) to jsou sesbírané populace Buchsachen, Hartberg, Ollersdorf, Eisenhuttel a Heiligenkreuz. Tyto populace se nacházely v blízkosti obcí z originálního popisu druhu, a to obcí Pinkafeld (Pinkafő) a Buchschachen (Bükkösd), sousední vsi Loipersdorf im Burgenland (Lipótfalva); obce Güssing a sousední Langzeil (Németújvár a Lángszál), maďarské názvy v závorkách pochází z originálního popisu. Od obcí Buchsachen a Oberwart pochází i typová položka *C. macroptilon* (BP 504089, informace od školitele). U *Centaurea oxylepis* nebyla v původní práci (Wimmer & Grabowski 1829) popsána konkrétní lokalita. Jednalo se o oblast Slezska, které tehdy zahrnovalo současné České Slezsko (zahrnující oblast Hrubého Jeseníku, část Nízkého Jeseníku až po severní část Moravskoslezských Beskyd), větší část se nacházela v Polsku (západní hranice procházela od Zielone Góry po Jizerské hory, severní hranice sahala za Wrocław a na východ sahalo Slezsko za Katowice), z této oblasti jsme získali populace z lokalit Rapotín, Kalkow a Nysa. Výběrem lokalit jsme se snažili pokrýt celkový výskyt taxonů v Evropě a případnou kontaktní zónu mezi *C. oxylepis* a *C. macroptilon*, resp. oblast s údaji o výskytu obou taxonů, která by se měla nacházet v oblasti jižního až středního Slovenska. Z této oblasti jsme sesbírali rostlinný materiál na lokalitách Bizovo, Rimavská Sobota, Voznica, Sájopüspöki (těsně za státní hranicí v Maďarsku), Dražice, Malé Straciny, Plášťovce a Hajnáčka (přesný popis všech lokalit je zaznamenán v příloze 1). Přehled lokalit, ze kterých rostliny pochází, je také pro ilustraci zaznamenám v mapě na obrázku 2. Z těchto vybraných lokalit byly pro morfometrickou analýzu odebrány celé rostliny. Jedinci byli vybráni náhodně a tak, aby byli od sebe vzdáleni nejméně 1 m (chrpy rostou v trsech, tak tedy, aby jedinci nebyli z jednoho trsu). Z každé populace bylo odebráno cca 10-30 jedinců (přesné počty a seznam všech lokalit viz příloha 1). Rostliny byly využity k morfometrické analýze, do herbáře bylo poté vysušeno jako doklad k populaci 5 celých rostlin, z ostatních jedinců byly založeny pouze horní větve s terminálními úbory. Všechny herbářové doklady jsou uloženy v herbáři katedry botaniky PřF JU (herbář CBFS). Část populací použitá v morfometrické analýze pochází ze starších měření školitele (Koutecký 2007, 2008), jedná se o populace Opatová, Rimavská Sobota a Voznica. Pro průtokovou cytometrii byly odebrány čerstvé listy z 10 jedinců z populace. Z 5 jedinců z populace byl

uložen list do silikagelu pro pozdější genetickou analýzu. Z Rumunska jsme získali rostliny morfologicky podobné taxonu *C. macroptilon*. Díky spolupráci s rumunskými kolegy (A. Badarau a G. Vonica) jsme do morfometrické analýzy zahrnuli 63 herbářových položek celých jedinců, ze kterých byly také odebrány nažky (obvykle alespoň u 5 jedinců z populace). Část nažek byla použita pro průtokovou cytometrii a část byla klíčena v Petriho miskách na vlhkém filtračním papíře. Vyklíčené semenáčky byly pěstovány po dobu asi 2 měsíců a následně z nich byly odebrány listy pro genetickou analýzu a vysušeny v silikagelu.



Obr. 2: Přehled lokalit, ze kterých byli získáni jedinci na morfometrickou analýzu. Podrobný popis lokalit viz příloha 1.

3. 2. Morfometrická analýza

Pro morfometrickou analýzu byly z vybraných lokalit odebrány celé rostliny. Z každé populace bylo odebráno dle její velikosti 10-30 jedinců. Na rostlinách bylo měřeno několik znaků před vysušením rostliny a zbytek znaků byl doměřen po herbářování pod binokulární lupou s měřicím okulárem. Znaky měřené za živa se týkaly velikosti rostliny (VN, VV, VC), velikosti listů (LB, LD, LS, LAP) a zákrovů (UV, US, VVP, VZL), později byly doměřeny

zbývající znaky na zákrovech (ZD, ZS, ZP, ZPD, ZVD, ZVS, ZBD, ZBH), tyto znaky nebylo nutné měřit ihned, protože vysušení nemělo vliv na hodnoty těchto znaků. Výsledná datová matice obsahuje 14 kvantitativních znaků (VN, VV, VC, LD, LS, LAP, UV, US, ZD, ZS, ZP, ZPD, ZVD, ZVS), 5 binárních znaků (LB, VVP, VZL, ZBD, ZBH) a 5 poměrů (VVC, LDS, UVS, ZDS, ZVDS). Celkový přehled všech měřených znaků a jejich popis je zaznamenán v tabulce I.

Data byla upravena a vyhodnocena v programech R (R Core Team 2013) pomocí sady funkcí pro morfometrická data MorphoTools (Koutecký 2015) a Canoco 5.00 (Ter Braak & Šmilauer 2012). Nejdříve bylo třeba zjistit normalitu dat u kvantitativních proměnných znaků, protože některé z použitých statistických metod vyžadují normální rozdělení dat. U znaků VV, LS, LDS, UV, US, UVS, ZS, ZDS, ZP a ZVS bylo zjištěno pozitivně šikmé rozdělení dat, proto byla pro tyto znaky použita logaritmická transformace. Pro jednotlivé populace byly spočítány také průměrné hodnoty všech znaků, protože v některých analýzách byly jako operační taxonomická jednotka (OTU) použity populace. Jedinci i populace byli na základě geografického původu rozděleni do tří hlavních skupin. Severní skupina odpovídá taxonu *C. oxylepis*, jižní skupina *C. macroptilon* a východní skupina *C. indurata* v tradičním pojetí. Pro některé analýzy byla severní skupina rozdělena na dvě geograficky oddělené podskupiny, na českou podskupinu a jihoslovenskou podskupinu. Jihoslovenská podskupina zahrnuje populace z oblasti, kam by měla podle Dostála (1976, 1989) zasahovat *C. macroptilon*, a není tedy zcela jasné, ke kterému taxonu by populace měly být přiřazeny. Pro každý znak v rámci předem dané skupiny byly spočteny základní popisné charakteristiky (počet, aritmetický průměr, minimum a maximum, kvartily, 5% a 95% kvantily, median, směrodatná odchylka). Za účelem zjištění vzájemných vztahů mezi znaky a případné korelace znaků byl spočten pro všechny páry znaků Spearmanův korelační koeficient (viz příloha 3). Pro analýzu hlavních komponent (PCA) byla data standardizována, aby měla nulový průměr a jednotkovou směrodatnou odchylku. PCA byla použita jako první náhled na data, byla spočítána pro jedince a také pro populace. Dále byla použita diskriminační analýza, která se snaží maximalizovat rozdíly mezi předem danými skupinami (rozdělení do skupin by mělo být nezávislé, zde je dáno geograficky). Diskriminační analýza byla spočtena opět pro jedince i populace.

Tab. I: Přehled měřených znaků.

Znak	Popis znaku
VN	Délka nevětvené části lodyhy (cm)
VV	Délka větvené části lodyhy (cm)
VC	Celková výška rostliny (VV+VN)
VVC	Podíl větvené části na celkové výšce (VV/VC)
LB	Tvar báze čepele středních listů (1 – zaoblená, 0 – klínovitá)
LD	Délka čepele středních listů (cm)
LS	Šířka čepele středních listů (cm)
LDS	Poměr délka/šířka čepele středních listů (LD/LS)
LAP	Počet párů laloků
UV	Výška úboru (cm)
US	Šířka úboru (cm)
UVS	Poměr výška/šířka úboru (UV/US)
VVP	Viditelnost vnitřních přívěsků (1 – ano, 0 – ne)
VZL	Viditelnost zákrovních listenů (1 – ano, 0 – ne)
ZD	Délka nejdelších přívěsků středních zákrovních listenů (mm)
ZS	Největší šířka nedělené části nejdelších přívěsků středních zákrovních listenů (mm)
ZDS	Poměr délky a šířky přívěsků středních zákrovních listenů (ZD/ZS)
ZP	Počet postranních třásní přívěsků středních zákrovních listenů
ZPD	Délka nejdelší třásně přívěsků středních zákrovních listenů (mm)
ZVD	Délka vnitřních přívěsků zákrovních listenů (mm)
ZVS	Největší šířka vnitřních přívěsků zákrovních listenů (mm)
ZVDS	Poměr délky a šířky přívěsků středních zákrovních listenů (ZVD/ZVS)
ZBD	Barva dolní části přívěsku středních zákrovních listenů (1 - černá, 0 - hnědá)
ZBH	Barva horní části přívěsku středních zákrovních listenů (1 – černá, 0 - hnědá)

3. 3. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je poměrně rychlá metoda, která se v botanice využívá především na určení ploidie studovaných rostlin. Z každé populace bylo přímo na lokalitě odebráno cca 10 čerstvých listů z různých jedinců na ověření ploidie populace. U rumunských populací *Centaurea indurata*, kde byly k dispozici pouze herbářové položky, byly na ověření ploidie populace použity nažky (3-5, každé z jiné mateřské rostliny, postup přípravy vzorků je stejný jako při přípravě z listů) a listy ze semenáčků napěstovaných na genetické analýzy.

Postup byl použit podle práce Koutecký et al. (2012). Standardem pro *Centaurea* je *Glycine max* 'Polanka' (velikost genomu $2C = 2.50$ pg, Doležel et al. 1994). Bylo použito fluorescenční barvivo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol). Do plastové Petriho misky byl vložen analyzovaný vzorek o velikosti asi $0,25$ cm² listu z měřeného jedince (resp. ekvivalentní množství z jednotlivých rostlin; většina vzorků obsahovala 5-10 jedinců) a interní standard (*Glycine max* 'Polanka'). Poté bylo ke vzorku přidáno 400 μl vychlazeného (na ledu) Otto I pufru (0,1M kyselina citronová, 0,5% Tween-20). Rostlinný materiál byl nasekán v pufru žiletkou na jemné kousky, aby se z buněk uvolnila jádra. Každou stranu žiletky bylo možné použít pouze 1x, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku. Následně byla suspenze pipetováním několikrát promíchána a opláchnuta plocha misky. Suspenze byla poté filtrována do připravené a popsané zkumavky přes 42 μm filtr (textilie Uhelon 130T), aby v roztoku nezůstaly větší částice, které by mohly ucpat kapiláru v cytometru. Objem suspenze po filtraci by měl být cca 200 μl, vzorek se po přefiltrování nechá stát do jedné minuty (doba stání je pro daný druh již empiricky vyzkoušená). Poté bylo ke vzorku přidáno 800 μl barvicího roztoku (Otto II pufr, tj. 0,4M Na₂HPO₄·12H₂O, 2-merkapt ethanol o koncentraci 2 μl/ml a DAPI o koncentraci 4 μg/ml), znovu se zkontroloval výskyt případných nečistot a vzorek se nechal barvit. Na závěr byl vzorek změřen pomocí průtokového cytometru Partec PA II (Partec GmbH, Münster, Německo), zdrojem světla u tohoto přístroje je rtuťová výbojka. Přístroj byl nastaven tak, aby standard byl na kanálu 200 na 1024-kanálové škále a zaznamenávalo se 3000 částic. Data získaná z cytometrie byla zobrazena v programu FloMax verze 2.6 (Partec GmbH, Münster, Německo).

3. 4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Pro srovnání genetické podobnosti populací byla použita metoda AFLP. Jedná se o restriční metodu, která umožňuje analýzu polymorfismu v celkové genomové DNA. Při této metodě není třeba znalosti struktury genomu. Během restrikce je DNA specificky štěpena dvěma

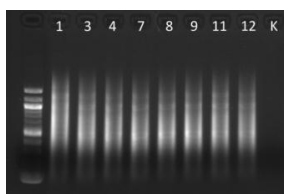
různými restriktčními enzymy, většina protokolů využívá restriktázy EcoRI a MseI. Na konce fragmentů se následně během ligace připojí adaptory (umělé úseky DNA o známé sekvenci). Poté se pomocí primerů komplementárních k sekvenci adaptorů během dvou PCR (preselektivní a selektivní PCR) namnoží z velkého množství jen část fragmentů. Pro druhou PCR se používají fluorescenčně značené primery. Fragmenty jsou pak rozděleny podle délky v automatickém sekvenátoru (Mueller & Wolfenbarger 1999).

Metoda AFLP je poměrně náročná na kvalitu a množství DNA, proto byla DNA izolována pomocí komerčního Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK), postup izolace probíhal podle protokolu od výrobce, který je ke kitu přiložen. Pro izolaci byly použity listy vysušené v silikagelu, které byly odebrány přímo na lokalitách z rostlin později použitých pro morfometrickou analýzu. U rumunských populací *Centaurea indurata*, populace RUM1, RUM2, RUM4, RUM5 a TOPA, byly listy odebrány z rostlin, které jsme vypěstovali z nažek z herbářových položek, listy byly před izolací také vysušeny v silikagelu. Jako porovnání byly vybrány rostliny příbuzných taxonů (přehled lokalit viz příloha 2). Tyto rostliny byly získány z lokalit již dříve v rámci jiných prací školitele. Na AFLP byl použit protokol s využitím AFLP kitů od firmy Invitrogen podle Koutecký & Košnar (2014). Na restrikci byl použit AFLP[®] Core Reagent Kit I. Nejprve byla připravena restriktční směs pro patřičný počet vzorků + 1. Směs byla připravena z 5× Reaction buffer (1 μl), EcoRI/MseI enzyme mixture (0,4 μl), poté byla směs promíchána, krátce centrifugována a rozpipetována po 1,4 μl do PCR stripů. Ke směsi bylo přidáno 3,6 μl vyizolované DNA, směs byla opět promíchána a krátce centrifugována, výsledný objem směsi na vzorek byl 5 μl. Směs s vzorky a zbytek restriktční směsi (sloužící jako kontrola) byl vložen do termocyklieru a inkuboval se 3 hodiny při teplotě 37°C. Na ligaci byl opět použit AFLP[®] Core Reagent Kit I. Byla připravena směs o objemu 5 μl na vzorek z Adaptor/Ligation Solution (4,8 μl) a T4 DNA ligase (0,2 μl), směs byla promíchána, krátce centrifugována a byla přidána po 5 μl ke vzorkům po restrikci (včetně slepé kontroly), výsledný objem byl 10 μl. Směs byla vložena do termocyklieru a byl spuštěn program pro ligaci 16 hodin při teplotě 16°C. Po proběhnutí reakce byla otestována úspěšnost restrikce/ligace na 1,5 % agarosovém gelu. Na gel se nanášelo 1,5 μl směsi po ligaci s 0,8 μl modrého nanášecího pufru („GelRed“) a 3 μl 100 bp ladderu. Na gelu by měl být vidět *smear* restriktčních fragmentů. Po úspěšné restrikci/ligaci pokračuje preselektivní amplifikace. Pro přípravu směsi byl použit AFLP[®] Pre-amp Primer Mix I, směs byla připravena z PA mix (4 μl), PCR buffer 10× (0,5 μl) a DNA polymerasa (Combi Taq DNA polymerasa od firmy Top-Bio,

1U/ μ l) (0,1 μ l), směs byla promíchána, krátce centrifugována a rozpipetována po 4,6 μ l do PCR stripů, zbytek preamplifikační směsi byl použit jako slepá kontrola. K preamplifikační směsi bylo přidáno 0,4 μ l DNA po ligaci, výsledný objem směsi byl 5 μ l. Směs byla vložena do termocykleru a byl spuštěn program na preselektivní amplifikaci: 1 \times 72 $^{\circ}$ C 2 min; 20 \times (94 $^{\circ}$ C 1 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min ramping 2 $^{\circ}$ C/s); 1 \times 60 $^{\circ}$ C 30 min. Úspěšnost preselektivní amplifikace byla ověřena na 1,5 % agarosovém gelu, na který bylo nanášeno 1,5 μ l preamplifikační směsi s 0,8 μ l modrého nanášecího pufu („GelRed“) a 3 μ l 100 bp ladderu. Na gelu by měl být vidět *smear* fragmentů na několika místech intenzivnější (viz obr. 3). Zbytek směsi po preselektivní amplifikaci (3,5 μ l) byl naředěn 10 \times (3,5 μ l preamplifikační směsi + 31,5 μ l sterilní H₂O). Po úspěšné preselektivní amplifikaci byla připravena směs pro selektivní amplifikaci. Pro každý vzorek byly připraveny 4 varianty, které se lišily použitými primery (neznačené MseI a fluorescenčně značené EcoRI). Kombinace primerů byly vyzkoušeny již dříve, jako nejlepší byly vybrány (barva EcoRI \times MseI): (6-FAM modrá) AGT \times CAC, (VIC zelená) AAC \times CTG, (NED žlutá) AGG \times CAT, (PET červená) ATC \times CTG. Mix pro selektivní amplifikaci obsahoval sterilní H₂O (2,55 μ l), PCR buffer 10 \times (0,5 μ l), dNTP 10 mM (0,1 μ l), EcoRI primer 1 pmol/ μ l (0,25 μ l), MseI primer 5 pmol/ μ l (0,25 μ l) a DNA polymerasa - Combi Taq DNA polymerasa Top-Bio, 1U/ μ l (0,1 μ l). Směs byla promíchána, krátce centrifugována a rozpipetována do PCR stripů po 3,75 μ l, ke směsi bylo přidáno 1,25 μ l ředěné DNA po preselektivní amplifikaci, směs byla opět promíchána, krátce centrifugována, následně vložena do termocykleru a byl spuštěn program na selektivní amplifikaci: 1 \times (94 $^{\circ}$ C 2 min, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min ramping 2 $^{\circ}$ C/s); 8 \times (94 $^{\circ}$ C 1 s, 64-56 $^{\circ}$ C 30 s (v každém cyklu teplota snížena o 1 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 2 min ramping 2 $^{\circ}$ C/s); 23 \times (94 $^{\circ}$ C 1 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min ramping 2 $^{\circ}$ C/s); 1 \times 60 $^{\circ}$ C 30 min. Úspěšnost selektivní amplifikace byla ověřena na 1,5 % agarosovém gelu, na který bylo nanášeno 1,5 μ l směsi po selektivní amplifikaci s 0,8 μ l modrého nanášecího pufu („GelRed“) a 3 μ l 100 bp ladderu. Na gelu by měl být vidět *smear* fragmentů na několika místech intenzivnější (viz obr. 3). Po úspěšné selektivní amplifikaci byly smíchány produkty jednoho původního vzorku - od každé fluorescenční barvy po 1 μ l. (U některých pozdějších vzorků byl signál u modré barvy slabší, proto se do výsledné směsi přidalo 1,5 μ l produktu s modrou fluorescenční barvou). Poté se pokračovalo přesrážením vzorku octanem sodným, u některého materiálu je možné přesrážení vynechat, ale u několika vzorků *Centaurea* jsme vyzkoušeli, že u vzorků po přesrážení jsou výsledky lepší než bez přesrážení. Při přesrážení bylo na stěnu 1,5 ml eppendorfky pipetováno 1 μ l 3M octanu sodného, do této kapky byly přidány 3 μ l směsi DNA po selektivní amplifikaci

a následně 25 µl vychlazeného 96% ethanolu. Směs byla promíchána na vortexu, krátce centrifugována a nechala se stát 20 min v mrazáku při -20°C. Poté byla centrifugována 30 min ve vychlazené centrifuze (na 4°C) při maximálních otáčkách (13800 rpm), slije se supernatant, DNA zůstává na stěně eppendorfky. Ke vzorku bylo přidáno 100 µl vychlazeného 70% ethanolu, vzorek byl centrifugován 5 min při maximálních otáčkách (13800 rpm) a slije se supernatant. Otevřené eppendorfky se nechaly stát 5 min ve stojánku při laboratorní teplotě, dosušily se 10 min v termobloku při 65°C (ve vzorku nesmí zůstat žádný ethanol), ke vzorku byly přidány 3 µl sterilní H₂O a vzorky byly odeslány na fragmentační analýzu do firmy SEQme. U několika vzorků (cca 10% vzorků) byl zopakován protokol AFLP, aby tyto vzorky posloužily jako kontrola a pro výpočet *error rate*.

Výsledky z fragmentační analýzy byly zpracovány v programu GeneMarker v1.80 (SoftGenetics, LLC, USA), ve kterém byla pro vybrané pozice (zřetelný signál, u všech vzorků možno rozhodnout o prezenci / absenci fragmentu) vytvořena matice přítomnosti / nepřítomnosti fragmentu dané délky. Výsledná matice byla dále analyzována několika metodami. Pro převod datové matice do požadovaných vstupních formátů jednotlivých programů byla použita sada funkcí AFLPdat v programu R (Ehrich 2006). V programu Canoco 5 (Ter Braak & Šmilauer 2012) byla spočítána analýza hlavních koordinát, jako míra nepodobnosti byl použit Jaccardův koeficient převedený na distanci, $D = \sqrt{1 - J}$. Dále byla v programu SplitsTree4 zobrazena fylogenetická síť metodou NeighbourNet, jako míra nepodobnosti byla použita *uncorrected p distance* (základní nastavení programu). Dále bylo provedeno Bayesiánské shlukování (*Bayesian clustering*) pomocí programu Structure 2.3.4 (Pritchard et al. 2000), kde bylo testováno rozdělení do 1–8 shluků (K), pro každou hodnotu K bylo počítáno 10 opakování s následujícími nastaveními: *admixture model*, nezávislé frekvence alel, 100 000 iterací *burn-in*, 1 000 000 iterací při vlastním výpočtu, pro ostatní parametry ponecháno výchozí nastavení. Pro analýzu výstupu z programu Structure byl použit Structure Harvester (Earl & von Holdt 2012) a CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007), výsledný graf (pravděpodobnost zařazení do skupin pro jednotlivé jedince) byl připraven v R 3.1.2.

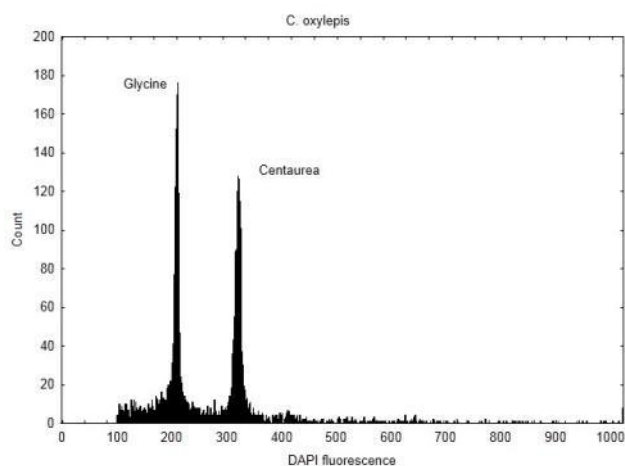


Obr. 3: Vzorky po preselektivní amplifikaci, na gelu je vidět *smear* fragmentů s několika výraznějšími proužky.

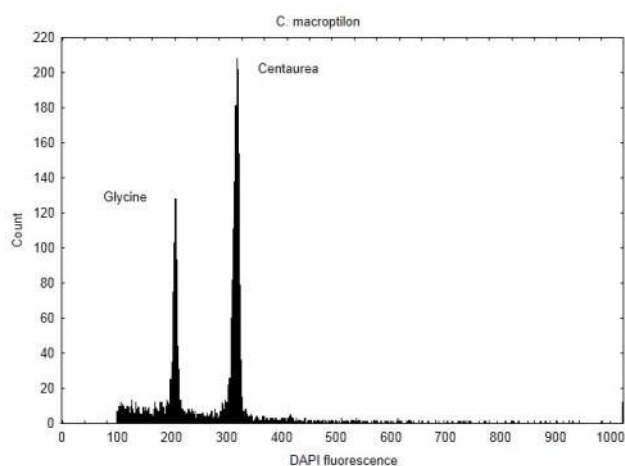
4. Výsledky

4. 1. Průtoková cytometrie

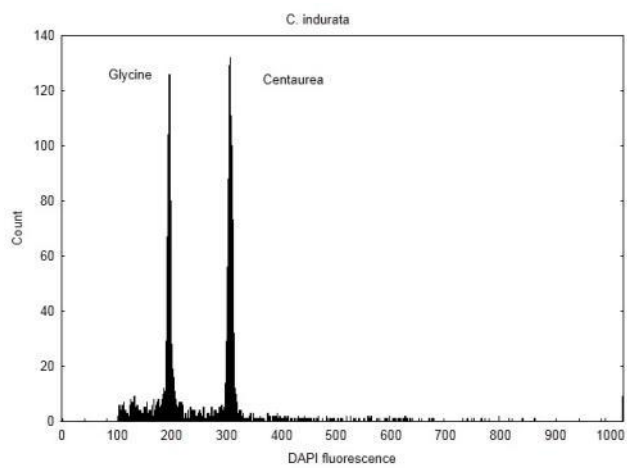
Pomocí průtokové cytometrie jsme ověřili stupeň ploidie u všech sesbíraných populací. Velikosti genomů u všech změřených vzorků odpovídaly tetraploidnímu cytotypu (Koutecký 2007, Koutecký 2008, Koutecký et al 2012). Příklady výstupů z průtokového cytometru jsou uvedeny na obr. 4-6 (jeden pro každou geografickou skupinu populací).



Obr. 4: Výstup z průtokové cytometrie (histogram intenzity fluorescence) pro tetraploidní *Centaurea oxylepis* (populace Štítý).



Obr. 5: Výstup z průtokové cytometrie (histogram intenzity fluorescence) pro tetraploidní *Centaurea macropylon* (populace Hartberg).



Obr. 6: Výstup z průtokové cytometrie (histogram intenzity fluorescence) pro tetraploidní *Centaurea indurata* (populace Padurea Dumbrava Mica, měřeno ze semenáčku).

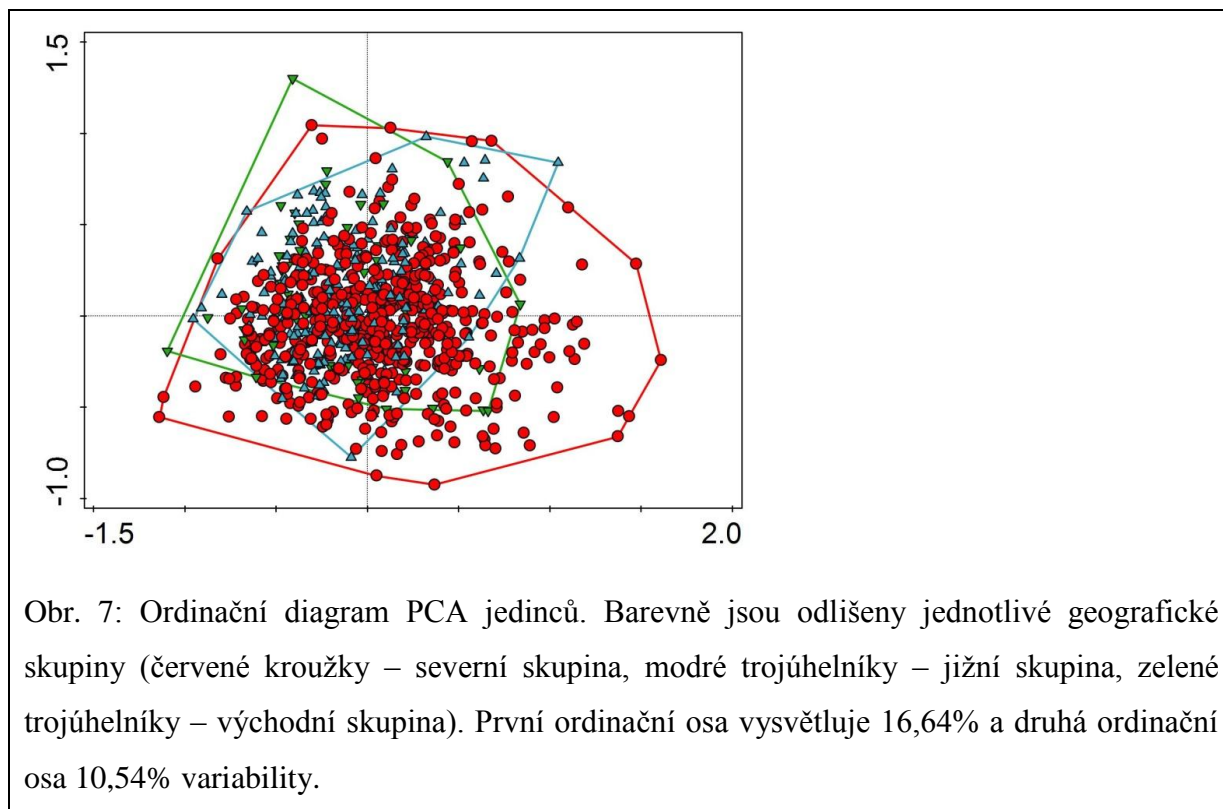
4. 2. Morfometrická analýza

Jedinci v rámci skupiny *Centaurea macrotylon* byli přiřazováni do taxonů na základě geografického původu lokalit. Jedinci i populace byli na základě geografického původu rozděleni do tří hlavních skupin (severní skupina, jižní skupina, východní skupina) nebo pro některé analýzy do čtyř skupin (česká podskupina a jihoslovenská podskupina = severní skupina, jižní skupina, východní skupina).

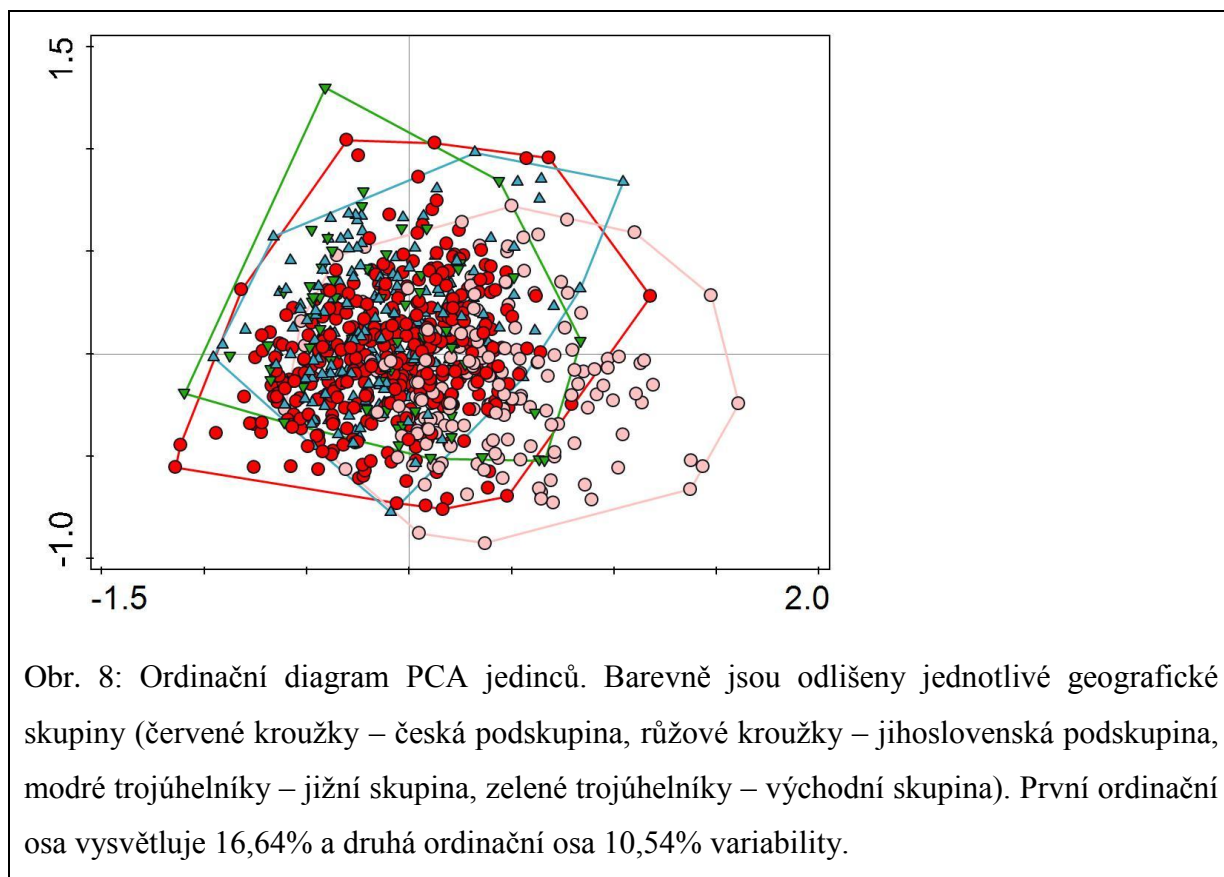
Celkem bylo změřeno 853 jedinců ze 45 populací. Nejprve byla data upravena v programu R, kde byly vytvořeny základní statistiky všech jedinců a poté i populací. Byla vytvořena Spearmanova korelační matice znaků. Žádný ze znaků nebyl silně korelovaný ($r \geq 0,9$) viz příloha 3. Znak, které neodpovídaly normálnímu rozdělení, byly logaritmičticky transformovány, jednalo se o znaky VV, LS, LDS, UV, US, UVS, ZS, ZDS, ZP, ZVS. Data byla analyzována v programu Canoco 5 (Ter Braak & Šmilauer 2012).

4. 2. 1. PCA

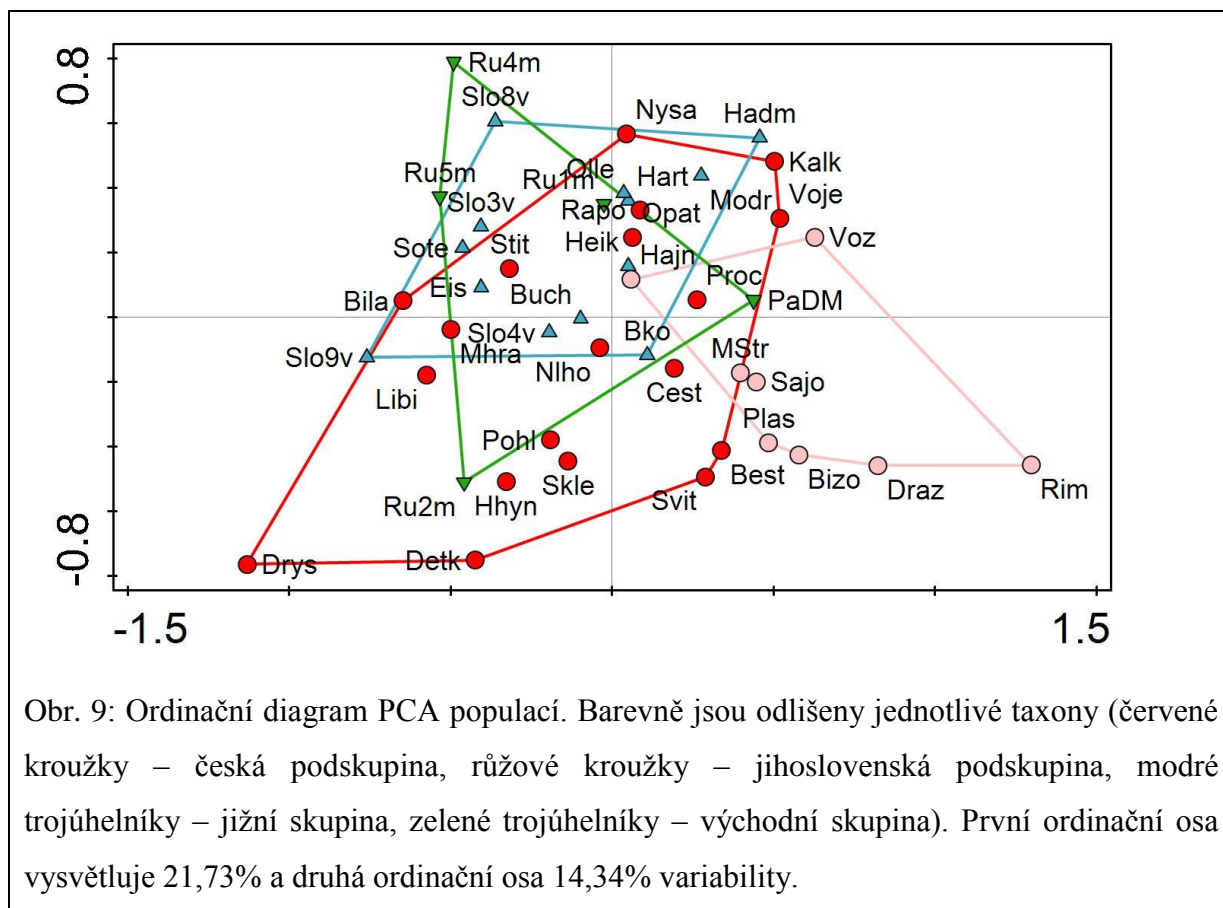
Jako první náhled na data byla provedena analýza hlavních komponent (PCA) všech jedinců. Výsledkem je ordinační diagram na obrázku 7. Diagram znázorňuje pozice 853 změřených jedinců na základě 24 znaků. Jedinci byli obarveni podle svého geografického původu na tři skupiny (viz obr. 7). Z diagramu je patrné, že jedinci ze všech skupin jsou v diagramu rozmístěni v jednom velkém shluku a není možné zde rozeznat nějaké skupiny.



Jedinci ze severní skupiny se však trochu oddělují od většinového shluku, proto jsme severní skupinu rozdělily na dvě podskupiny na českou a jihoslovenskou podskupinu (viz obr. 8). Je vidět, že právě jihoslovenská podskupina se mírně odlišuje od zbytku.

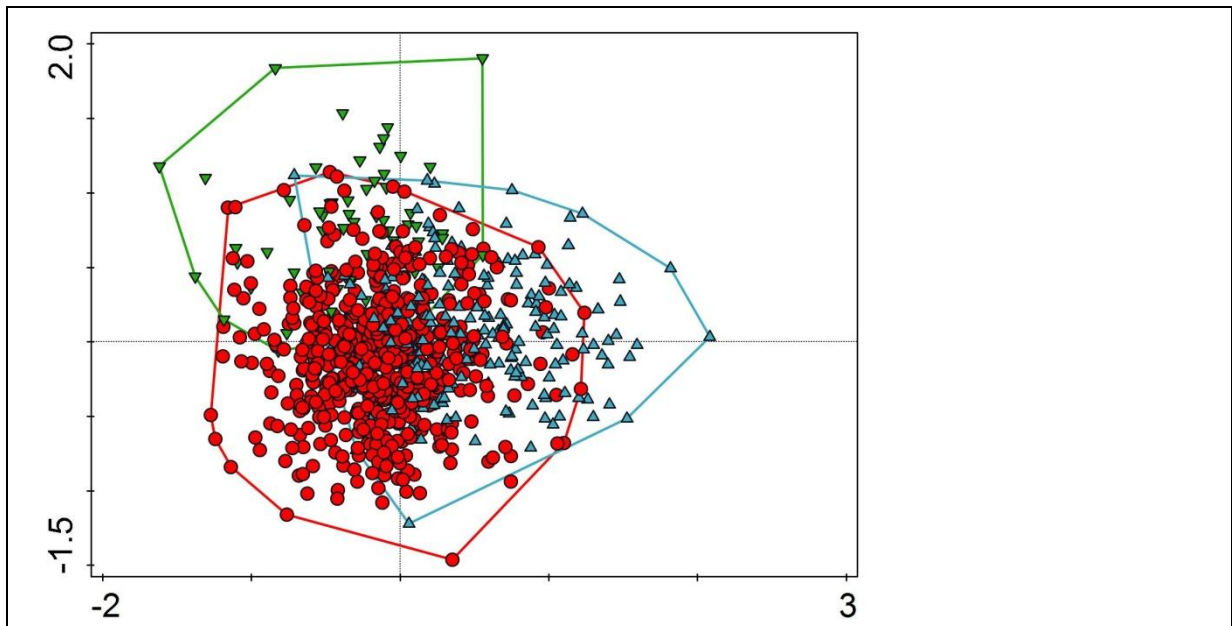


Stejná analýza (PCA) se opakovala i pro populace, výsledný diagram je na obrázku 9. V diagramu je zobrazena pozice 45 populací opět na základě 24 znaků. V tomto diagramu je vidět, že skupiny se z velké části překrývají, přesto je zde malý rozdíl vidět. Jihoslovenská podskupina se částečně odděluje od ostatních skupin.

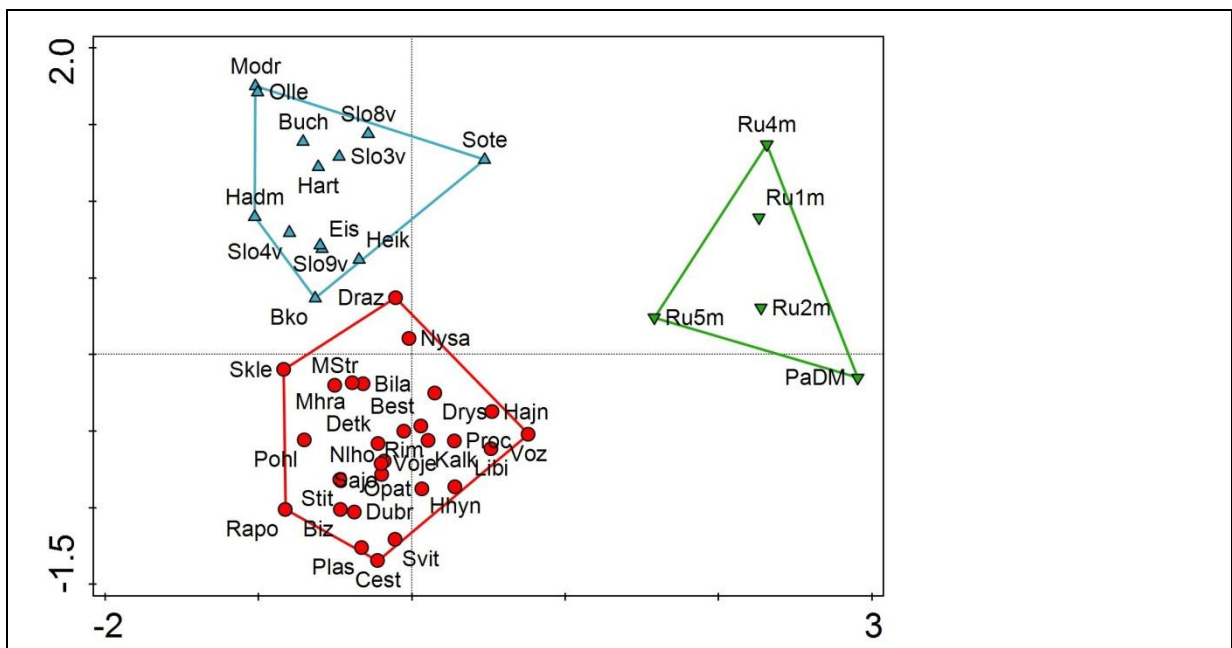


4. 2. 2. Diskriminační analýza

Dalším krokem byla diskriminační analýza, která se snaží maximalizovat rozdíly mezi danými skupinami. Tato analýza byla použita pro jedince i populace, ordinační diagram pro jedince je na obrázku 10 a pro populace na obrázku 11. Na ordinačních diagramech můžeme vidět, že na úrovni jedinců se skupiny výrazně neoddělují, ale na úrovni populací je rozlišení skupin zřetelné.

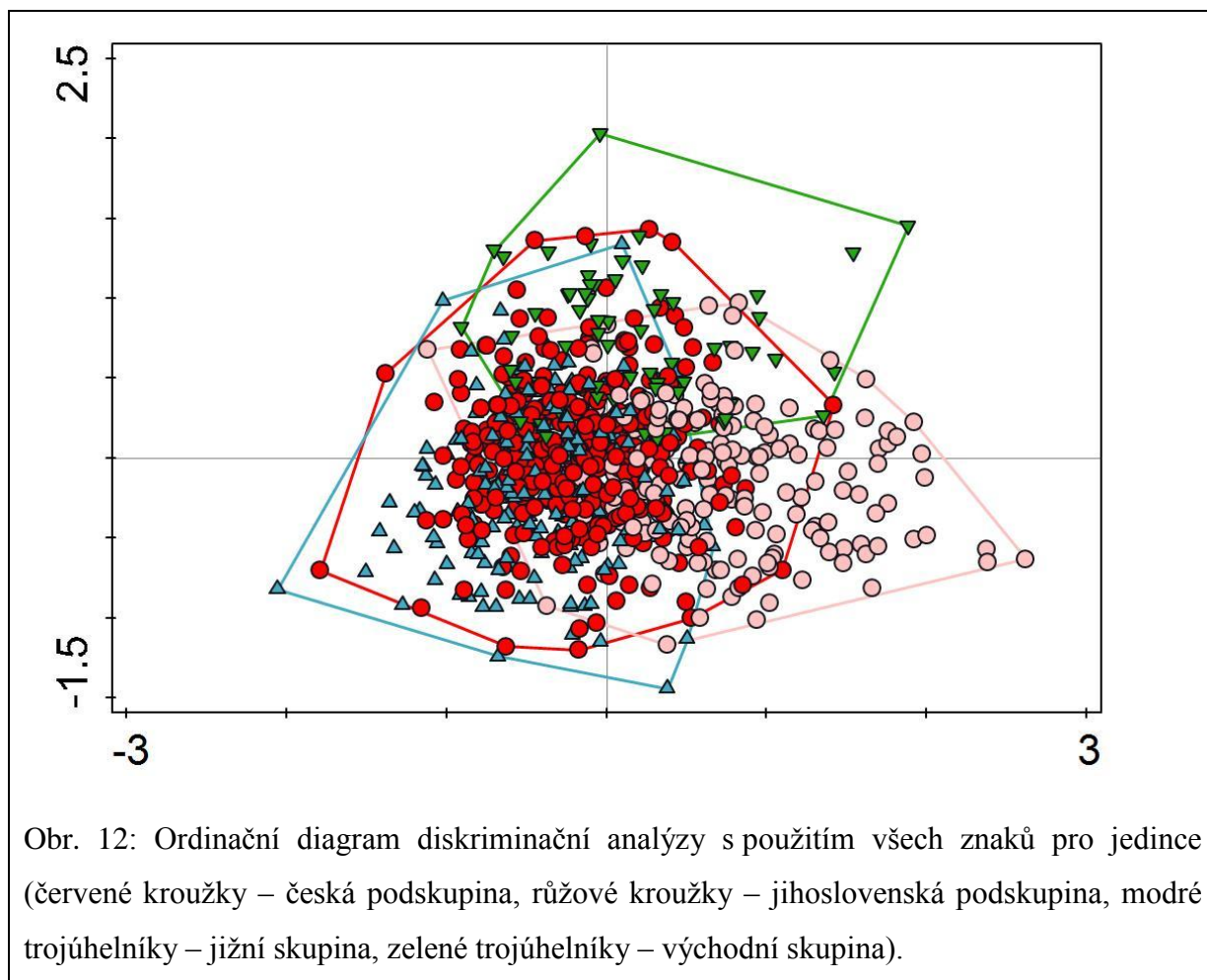


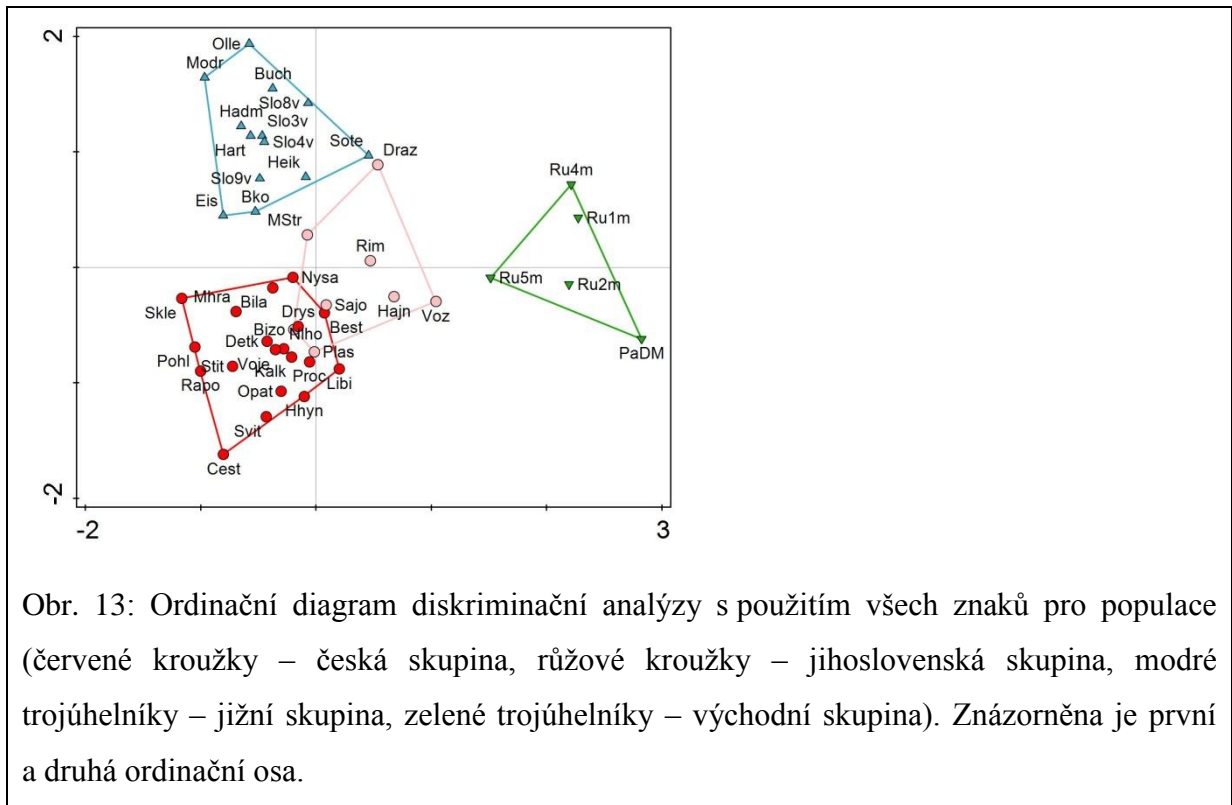
Obr. 10: Ordinační diagram diskriminační analýzy s použitím všech znaků pro jedince (červené kroužky – severní skupina, modré trojúhelníky – jižní skupina, zelené trojúhelníky – východní skupina).



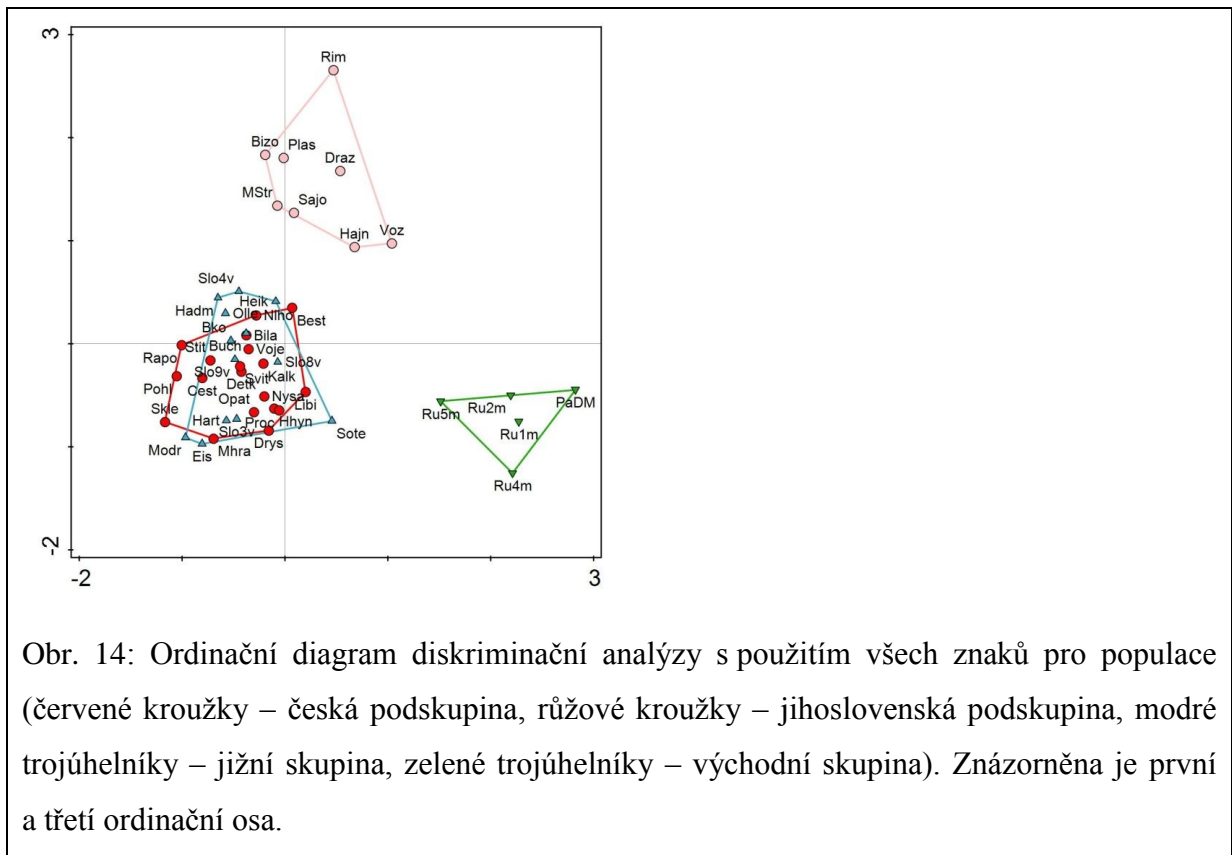
Obr. 11: Ordinační diagram diskriminační analýzy s použitím všech znaků pro populace (červené kroužky – severní skupina, modré trojúhelníky – jižní skupina, zelené trojúhelníky – východní skupina).

V dalším kroku byla oddělena podobně jako u PCA jihoslovenská podskupina. Ordinační diagram pro jedince je na obrázku 12 a pro populace na obrázku 13 a 14. Na úrovni jedinců (obr. 12) se jihoslovenská podskupina částečně odděluje od zbývajících skupin. Na úrovni populací (obr. 13 a 14) je oddělení všech skupin zřetelnější. V trojrozměrném prostoru se všechny čtyři skupiny od sebe oddělily.



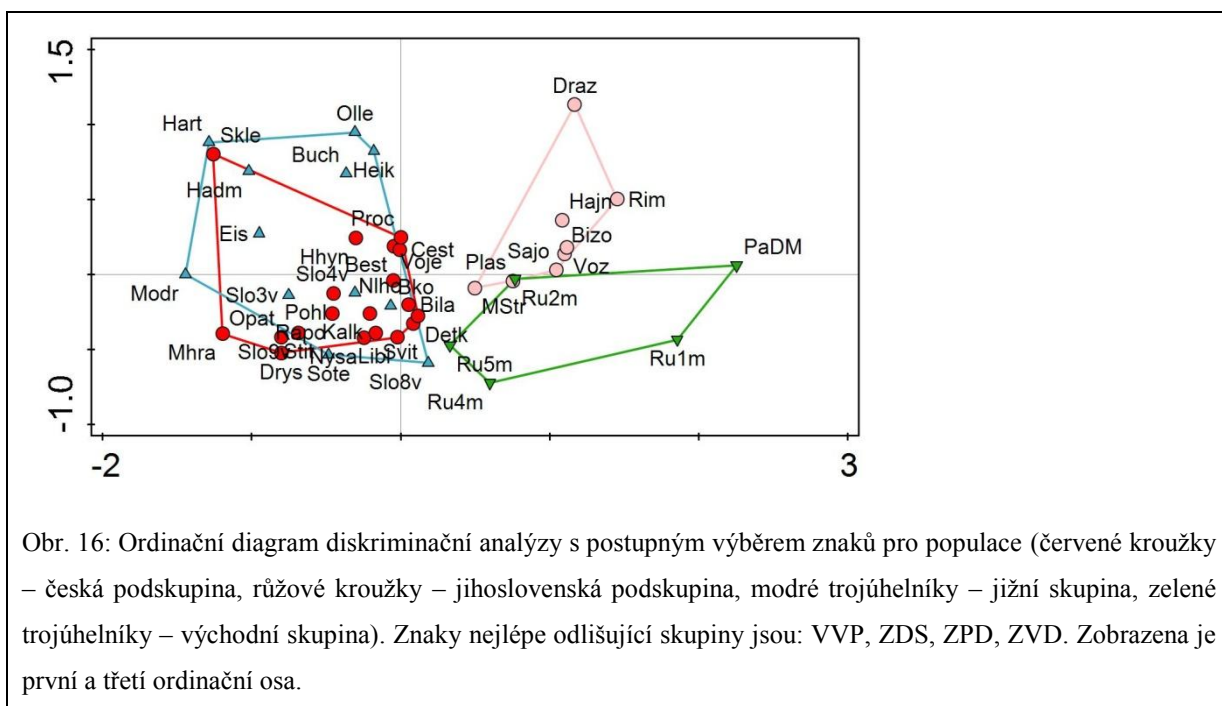
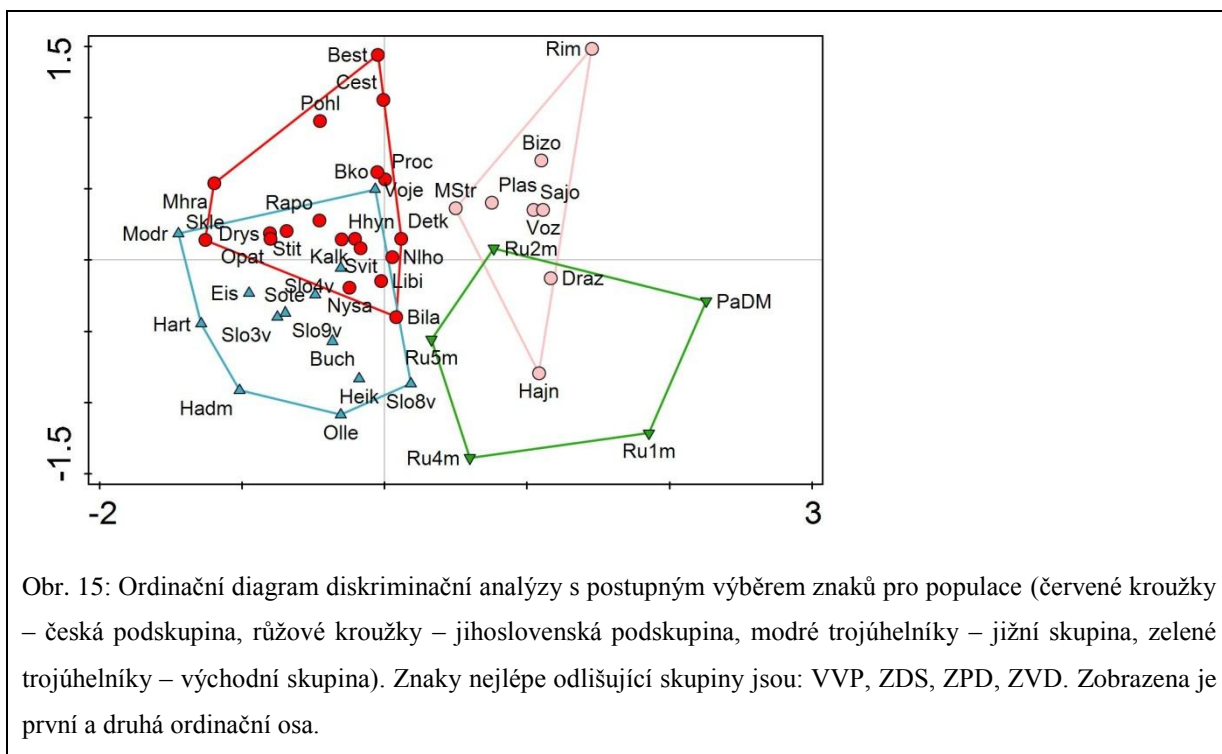


Obr. 13: Ordinační diagram diskriminační analýzy s použitím všech znaků pro populace (červené kroužky – česká skupina, růžové kroužky – jihoslovenská skupina, modré trojúhelníky – jižní skupina, zelené trojúhelníky – východní skupina). Znáznorněna je první a druhá ordinační osa.

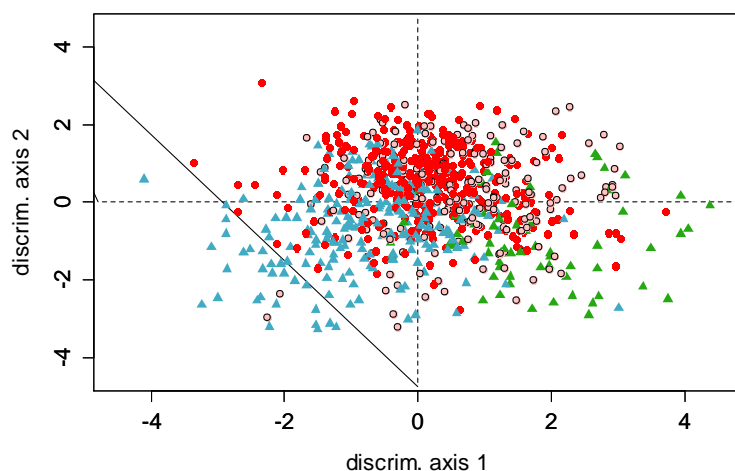


Obr. 14: Ordinační diagram diskriminační analýzy s použitím všech znaků pro populace (červené kroužky – česká podskupina, růžové kroužky – jihoslovenská podskupina, modré trojúhelníky – jižní skupina, zelené trojúhelníky – východní skupina). Znáznorněna je první a třetí ordinační osa.

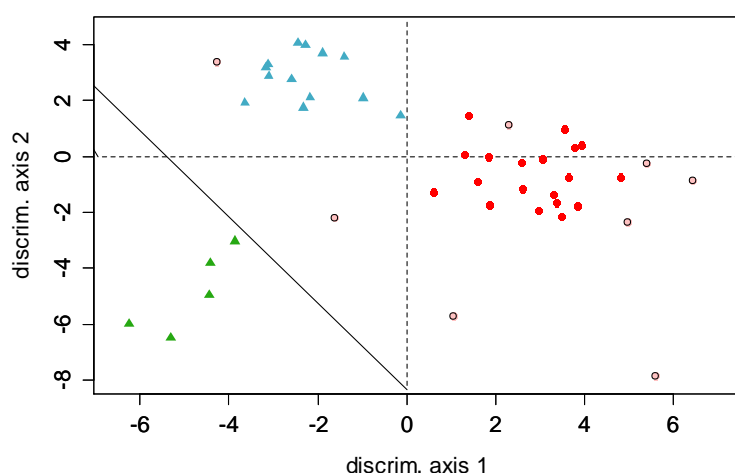
Pro populace byla použita ještě diskriminační analýza s postupným výběrem znaků, jako nejlépe oddělující dané skupiny byly vybrány znaky: VVP, ZDS, ZPD, ZVD (hodnoty znaků jsou zaznamenány na obrázku 21). Ordinační diagram z této analýzy je na obrázku 15 a 16. Jižní skupina a jihoslovenská skupina se v trojrozměrném prostoru oddělují – překrývají se jen z malé části, ale česká podskupina a jižní skupina jsou z velké části překryté.



Pro ověření, ke kterému taxonu bude jihoslovenská podskupina morfologicky patřit, jsme provedli diskriminační analýzu pro jedince (viz obr. 17) i populace (viz obr. 18) pouze se třemi skupinami (jižní, východní, česká podskupina) a jihoslovenskou podskupinu jsme pasivně promítli do ordinačního diagramu. Z diagramu pro jedince je vidět, že jedinci jihoslovenské podskupiny se rovnoměrně přiřadili do společného shluku, i když nejvíce se překrývají s českou podskupinou. Většina populací jihoslovenské podskupiny se v diagramu pro populace zařadila mezi českou podskupinu, ale jedna populace se morfologicky podobá jižní skupině.

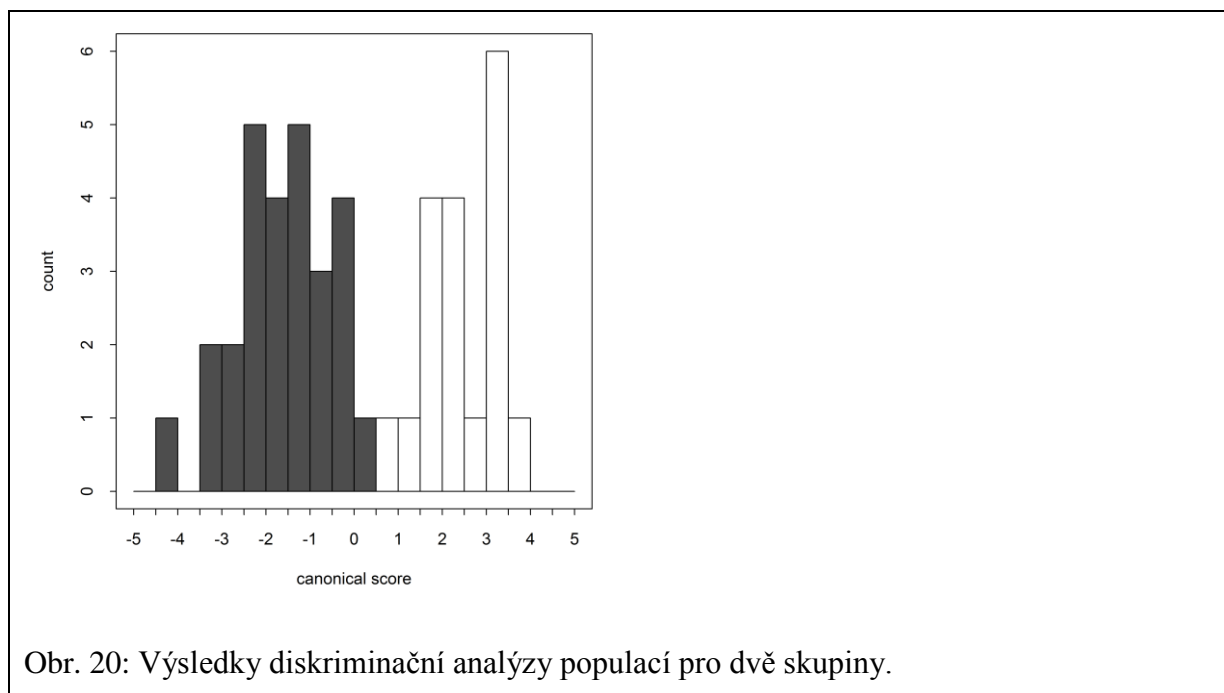
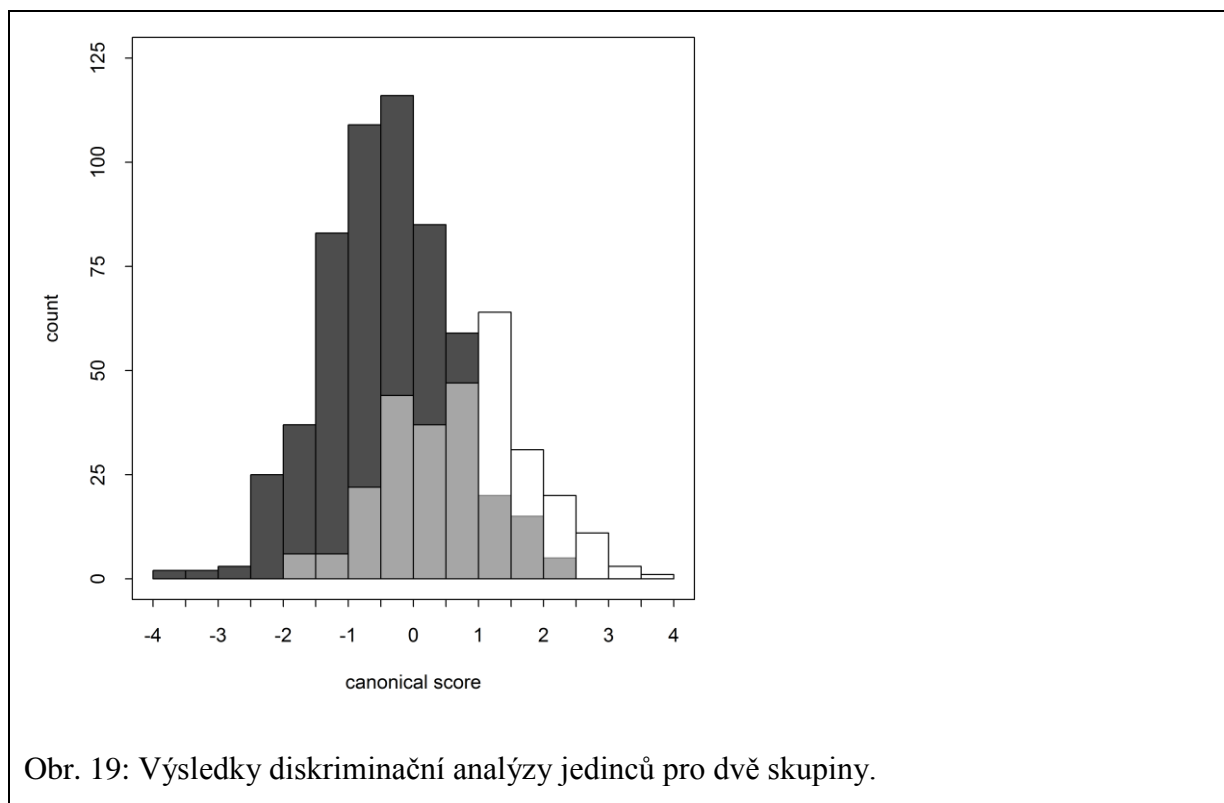


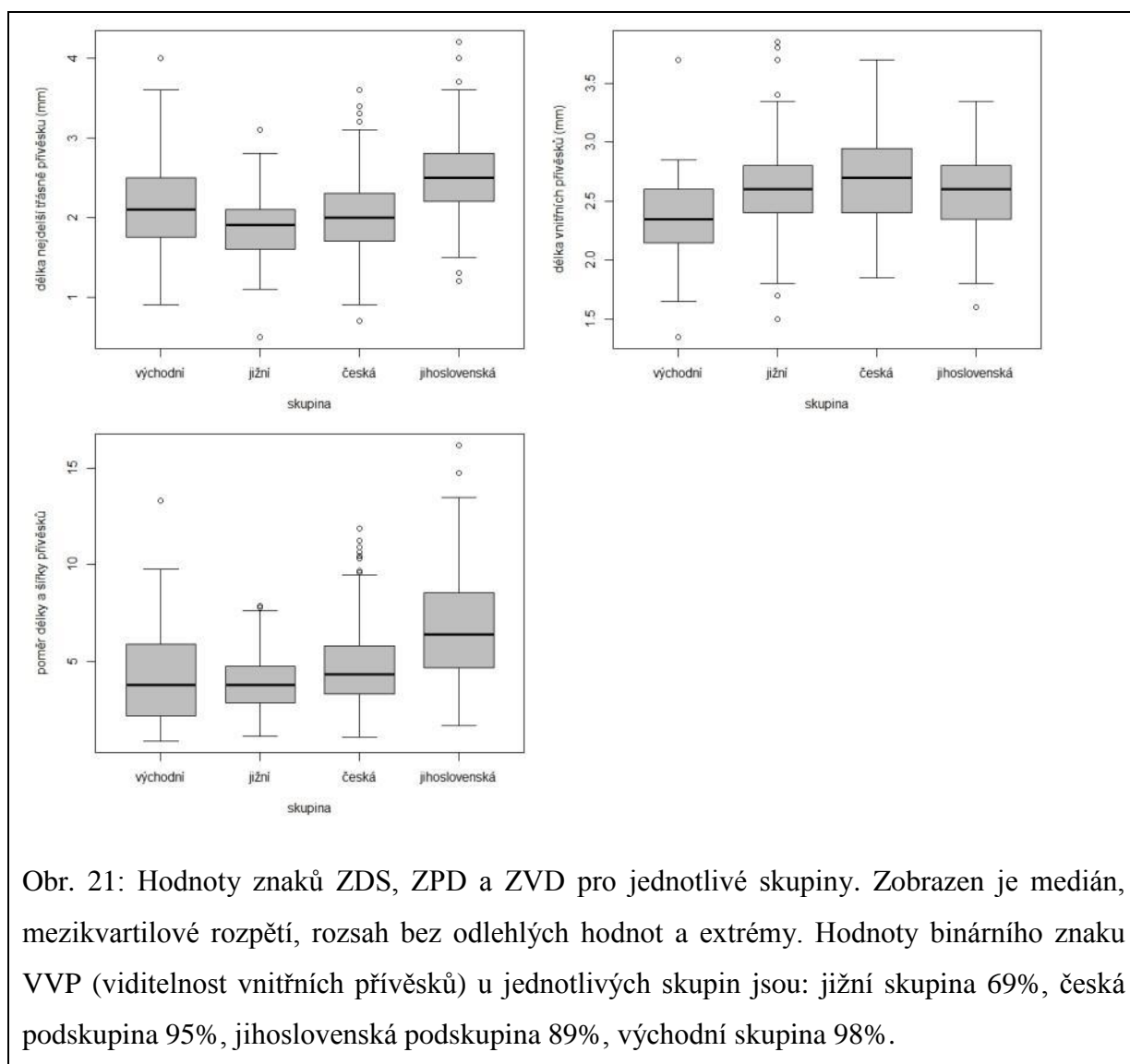
Obr. 17: Ordinační diagram diskriminační analýzy jedinců. Jihoslovenská podskupina je zde pasivně promítnuta. Barevně jsou odlišeny jednotlivé taxony (červené kružky – česká podskupina, růžové kružky – jihoslovenská podskupina, modré trojúhelníky – jižní skupina, zelené trojúhelníky – východní skupina).



Obr. 18: Ordinační diagram diskriminační analýzy populací. Jihoslovenská podskupina je zde pasivně promítnuta. Barevně jsou odlišeny jednotlivé taxony (červené kružky – česká podskupina, růžové kružky – jihoslovenská podskupina, modré trojúhelníky – jižní skupina, zelené trojúhelníky – východní skupina).

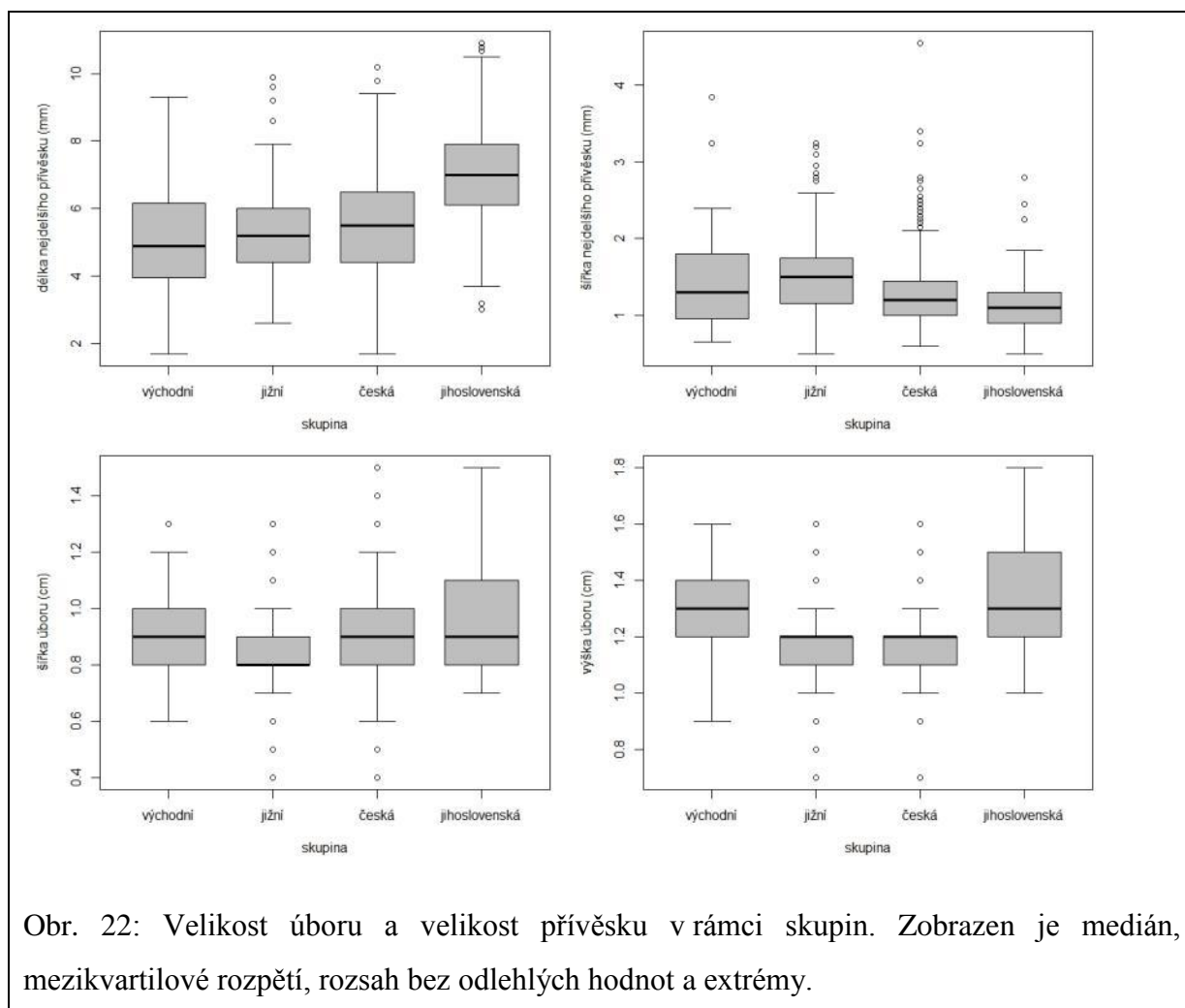
Jedince i populace jsme zkusili rozdělit na základě výsledků z molekulárních dat (viz níže) pouze do dvou skupin (severní skupina, jižní + východní skupina dohromady) a použili jsme na tyto skupiny diskriminační analýzu. Na úrovni jedinců (viz obr. 19) se skupiny výrazně překrývají, ale na úrovni populací (viz obr. 20) se skupiny oddělily.



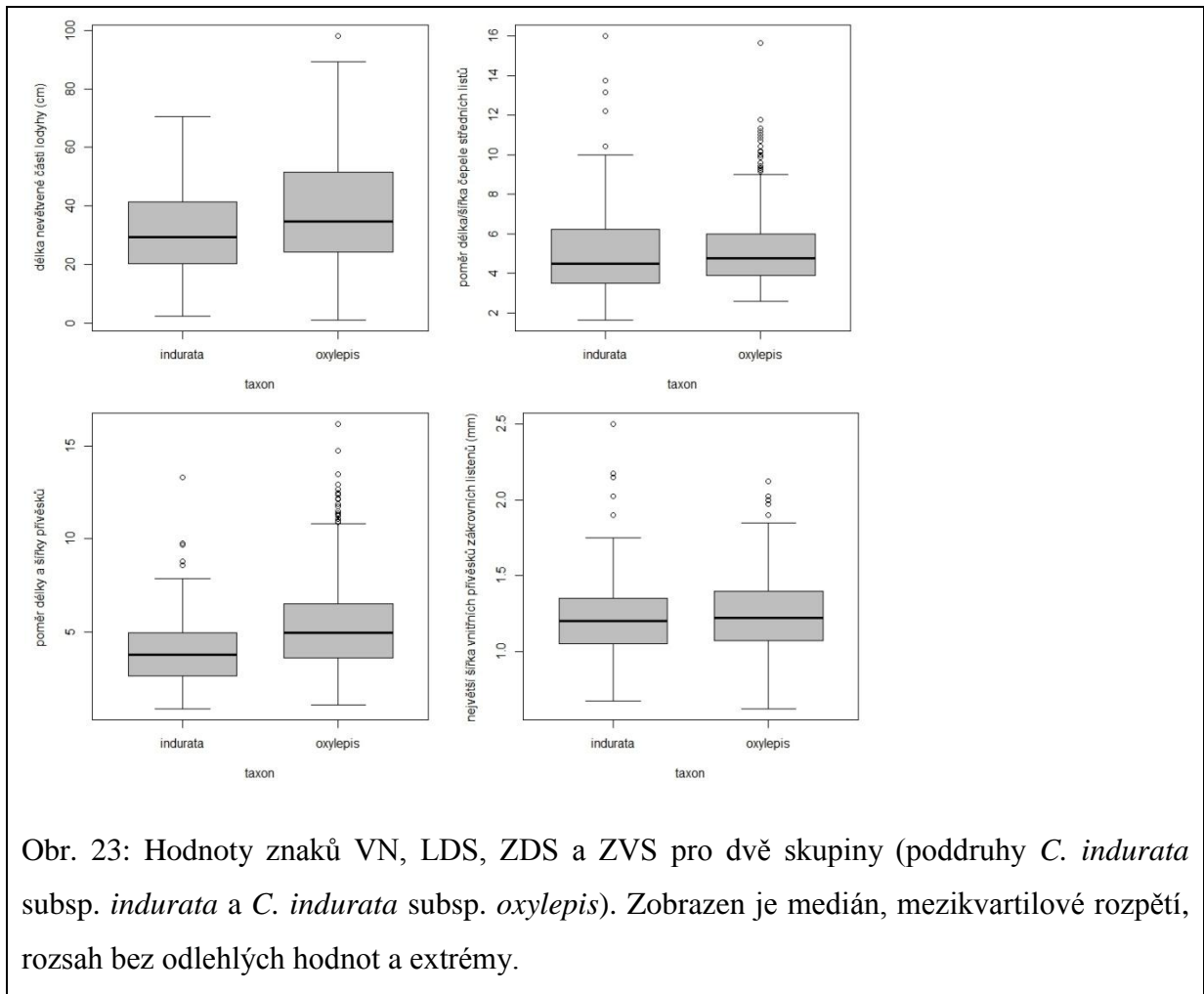


Otestovali jsme také znaky odlišující taxony *C. macroptilon* a *C. oxylepis* podle Dostála (1976, 1989) pro všechny čtyři skupiny. Hodnoty kvantitativních znaků jsou znázorněny na obrázku 22. Je patrné, že hodnoty těchto znaků se většinou překrývají. Hodnoty binárního znaku (viditelnost zákrovních listenů) se mezi skupinami téměř neliší: jižní skupina 92%, česká podskupina 94%, jihoslovenská podskupina 98%, východní skupina 95%. Hodnoty všech znaků pro čtyři skupiny jsou zaznamenány v příloze 4. V diskriminační analýze pro dvě skupiny jsme otestovali všechny znaky a vybrali jsme znaky průkazně odlišující skupiny. Jsou to znaky délka nevětvené části lodyhy (VN), poměr délky a šířky čepele středních listů (LDS), viditelnost vnitřních přívěsků (VVP), poměr délky a šířky přívěsků

středních zákrovních listenů (ZDS), největší šířka vnitřních přívěsků zákrovních listenů (ZVS). Hodnoty kvantitativních znaků z diskriminační analýzy pro dvě skupiny jsou zobrazeny na obrázku 23. Hodnoty znaku VVP jsou: *C. indurata* subsp. *indurata* 75,34 % a *C. indurata* subsp. *oxylepis* 93,22 %. Průkazné marginální efekty měly znaky: ZDS, VVP, ZS, ZD, VC, VN, ZPD, US, ZP, LD, ZVD, UV, ZVS. Hodnoty těchto znaků jsou zaznamenány v příloze 5. Mediány a průměry těchto znaků se mezi skupinami liší, ale celkově se hodnoty překrývají. Znaky, které mají rozdílné mediány a průměry mezi skupinami jsou ZDS, ZS, ZD, ZP, VC, VN, ZPD a VVP, u zbývajících znaků (US, LD, ZVD, UV, ZVS) se hodnoty výrazně překrývají.



Obr. 22: Velikost úboru a velikost přívěsku v rámci skupin. Zobrazen je medián, mezikvartilové rozpětí, rozsah bez odlehlých hodnot a extrémů.

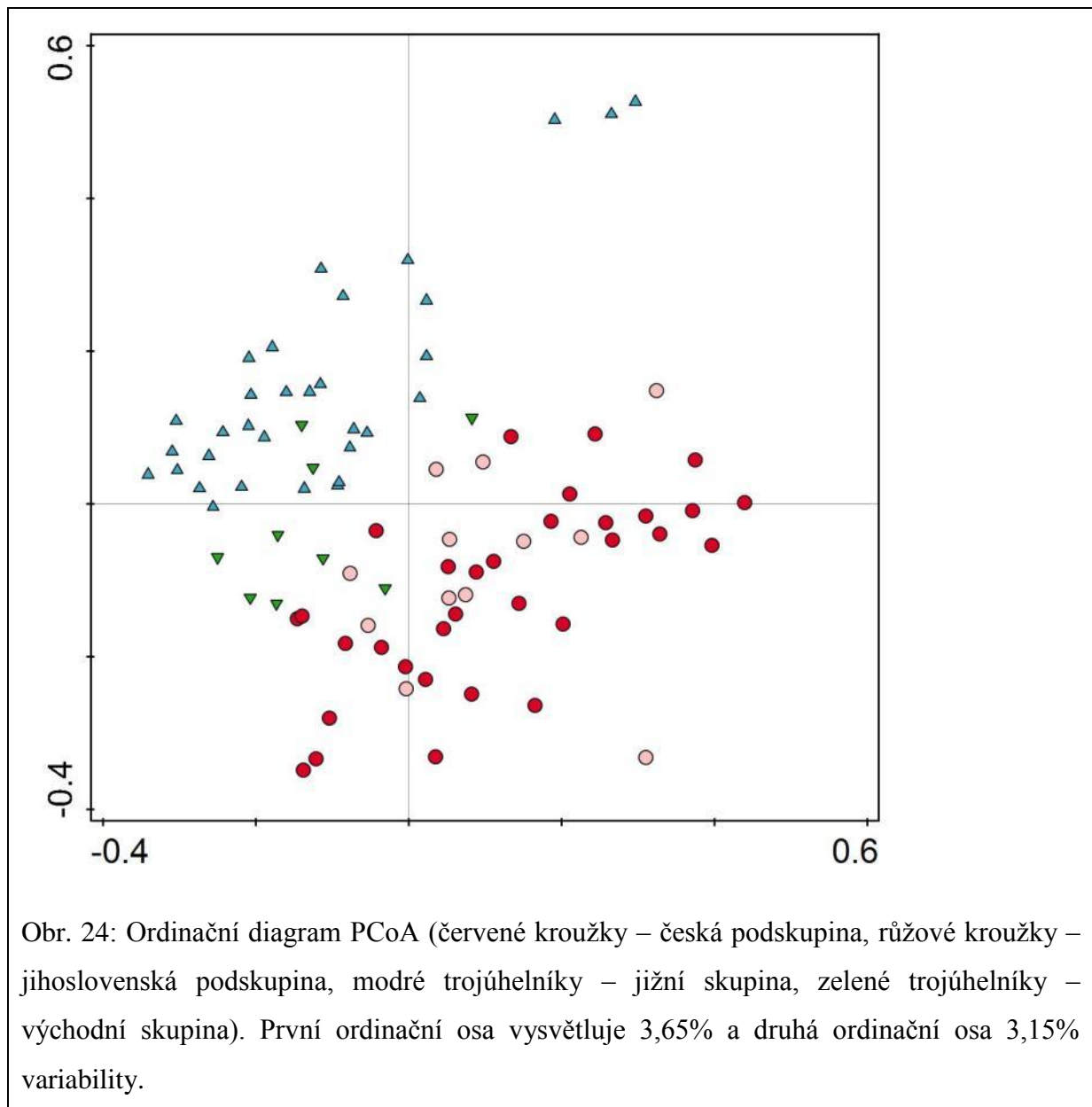


4. 3. AFLP

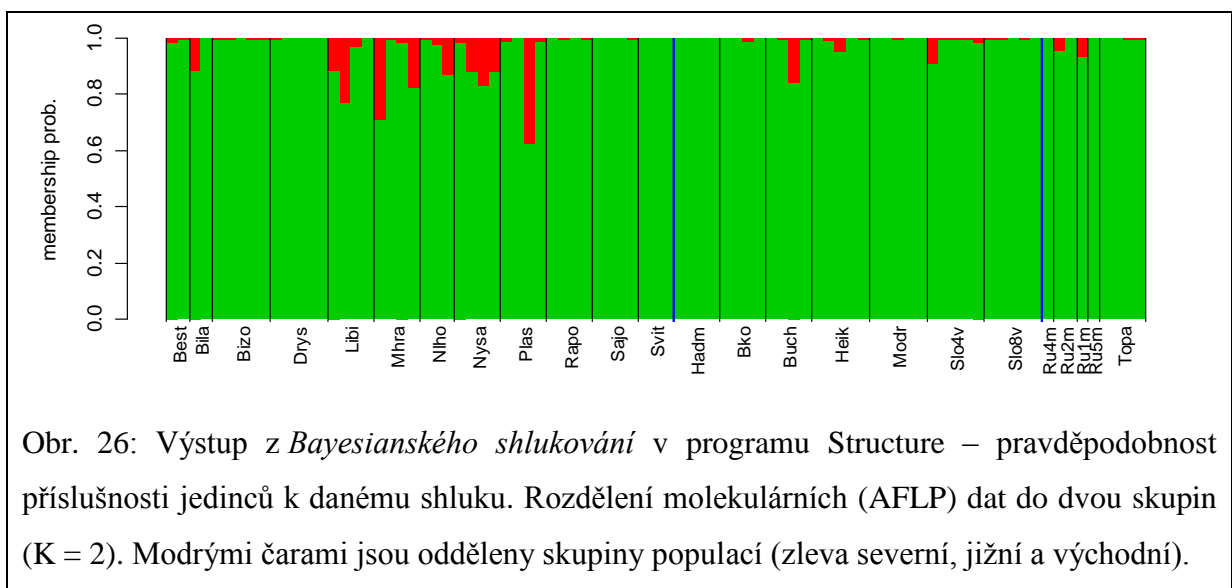
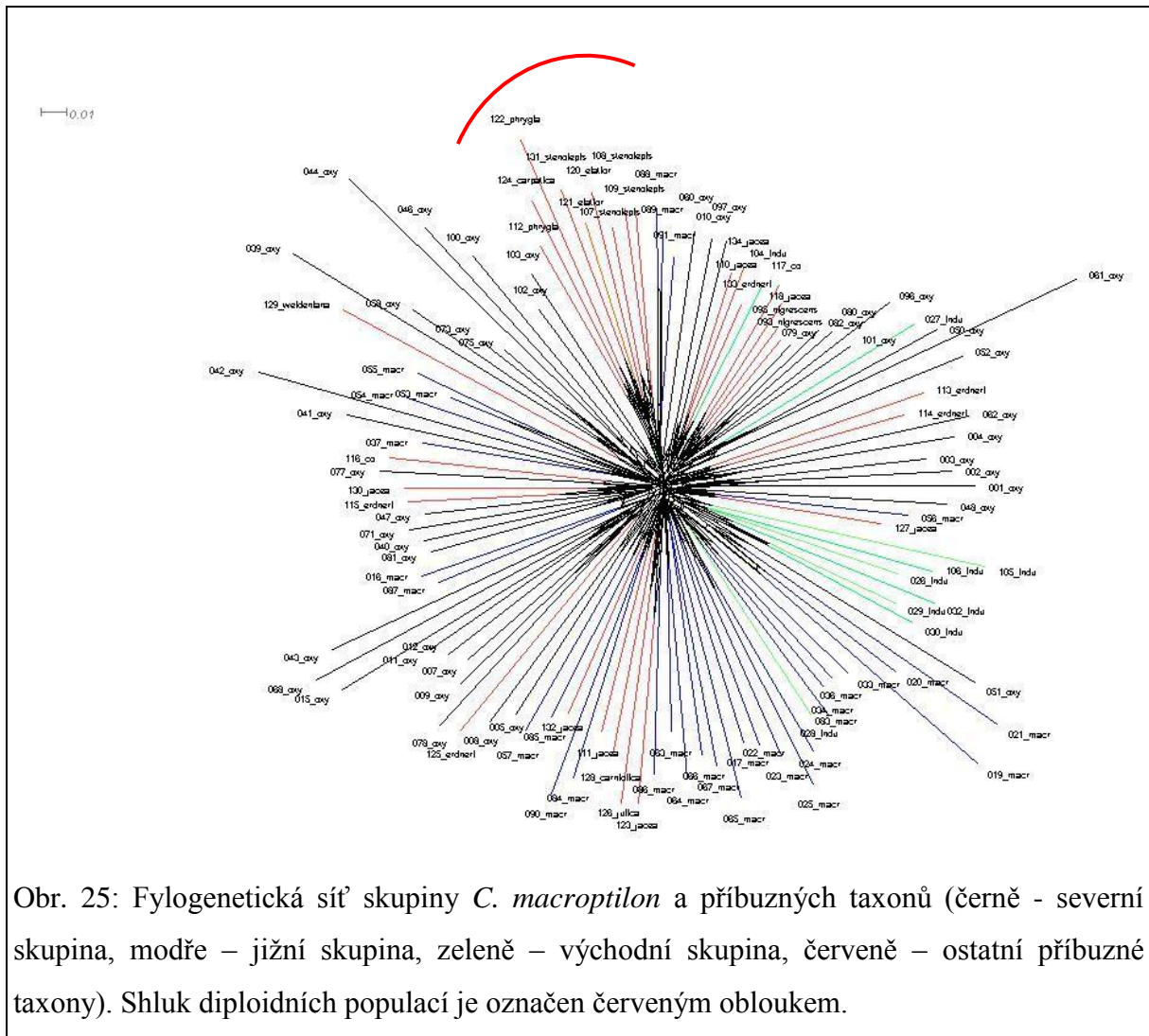
Pro porovnání genetické variability ve skupině *Centaurea macroptilon*, byla použita molekulární metoda AFLP. Na AFLP byly použity vzorky izolované DNA ze 134 jedinců, u 103 vzorků se jednalo o DNA jedinců ze skupiny *Centaurea macroptilon*, zbylých 31 vzorků sloužilo jako kontrolní skupina (jednalo se o příbuzné taxony z rodu *Centaurea*, viz příloha 2). U vzorků byla provedena analýza polymorfismu (AFLP) podle protokolu používaného v Laboratoři molekulární biologie (Koutecký & Košnar, 2014), vzorky byly poté zaslány na fragmentační analýzu do firmy SEQme, od které jsme následně získali výsledky. U několika vzorků (cca 10% vzorků) byl zopakován protokol AFLP, aby tyto vzorky posloužily jako kontrola a pro výpočet *error rate*. Výsledky z fragmentační analýzy byly zpracovány v programu GeneMarker v1.80 (SoftGenetics, LLC, USA), u některých vzorků byl signál slabý nebo nečitelný, proto byly tyto vzorky vyřazeny z následujících analýz. Výsledný dataset obsahuje 114 vzorků, z toho je 85 vzorků jedinců skupiny *Centaurea macroptilon* a zbylých 29 vzorků jedinců z ostatních příbuzných skupin (přehled vzorků ze skupiny *C. macroptilon* je v příloze 1 a přehled z ostatních příbuzných skupin je v příloze 2). Chybovost (*error rate*) byla 3,5%. Z datasetu byly vyřazeny vzácné fragmenty (frekvence výskytu těchto fragmentů byla nižší než *error rate*).

Upravená data byla analyzována v programu Canoco 5 (Ter Braak & Šmilauer 2012). Pro první náhled na data byla nejdříve spočítána analýza hlavních koordinát (PCoA) pouze pro vzorky ze skupiny *Centaurea macroptilon* rozdělené do tří nebo čtyř geografických skupin (rozdělení skupin je stejné jako pro morfometrické analýzy). Pro výpočet vzdáleností vzorků byl použit Jaccardův koeficient převedený na distanci. Ordinační diagram z PCoA je zobrazen na obrázku 24. V diagramu je vidět, že jedinci ze všech skupin sice tvoří jeden společný shluk, ale částečně se oddělují dvě hlavní skupiny, jedna skupina je tvořena jedinci jižní a východní skupiny a druhá skupina je tvořena jedinci z české a jihoslovenské podskupiny. Jedinci z jihoslovenské podskupiny jsou promícháni s českou podskupinou, která odpovídá taxonu *C. oxylepis*, proto můžeme jihoslovenskou podskupinu na základě podobné genetické variability přiřadit také k tomuto taxonu.

Data byla také analyzována v programu Splits Tree (Huson & Bryant 2006) metodou NeighbourNet. Výsledkem je síť, která je na obrázku 25. Z obrázku je vidět, že se nevytvořily žádné skupiny, ani ostatní příbuzné taxony se od skupiny *C. macroptilon* v této analýze neoddelily, pouze diploidní příbuzné taxony vytvořily malou skupinu.



Bayesiánské shlukování v programu Structure také neodhalilo v datech žádnou zjevnou genetickou strukturu. Pro ilustraci je na obrázku 26 nejlepší rozdělení do dvou skupin. Pro více shluků (vyšší hodnoty K) byly výsledky podobné, další shluky byly analýzou rozlišovány v rámci „červené“ skupiny. Je možné, že tento výsledek je důsledkem introgrese jiných taxonů (např. *C. jacea* nebo *C. erdneri*).



5. Diskuze

5. 1. Výběr populací

Rostlinný materiál jsme se snažili získat z oblasti výskytu dvou hlavních taxonů *C. macroptilon* a *C. oxylepis*, nejhojněji je prosbíráná samozřejmě oblast České republiky a Slovenska, z areálu *C. macroptilon* jsme sbírali převážně v Rakousku, materiál jsme získali i ze Slovinska, ale dál na jihovýchod jsme se už nedostali (kromě větších vzdáleností a celkově horší dostupnosti oblasti pro Srbsko a další země neexistuje dostatek konkrétních údajů o lokalitách, na Balkáně situaci komplikuje nedořešená taxonomie a rozsáhlá hybridizace s dalšími druhy). Přesto by vzorky měly být dostatečně sesbírané hlavně v původních oblastech popisu taxonů (Borbás 1887, Wimmer & Grabowski 1829). Počet vzorků z Rumunska je sice nižší, ale na morfometrickou analýzu (63 jedinců z 5 populací) dostatečně reprezentativní pro taxon *C. indurata*.

Znaky, které se měřily za živa (VN, VV, VC, LB, LD, LS, LAP, UV, US, VVP, VZL), byly u rumunských jedinců měřeny až po usušení, protože z Rumunska dorazily již v herbáři, přesto si myslím, že vysušení nemělo na hodnoty znaků vliv. Pokusně jsem změřila několik vysušených jedinců z populací, které měřil již dříve školitel za živa, a nezaznamenala jsem žádný markantní rozdíl mezi hodnotami obou měření. Obtížnější je pouze manipulace s vysušeným materiálem oproti čerstvému materiálu, kdy je třeba větší opatrnosti, aby nebyl usušený jedinec poškozen.

Při výběru populací pro morfometrické měření jsme se vyhýbali oblastem s častým výskytem složitějších hybridů na severní Moravě, kde je hybridní zóna mezi *C. oxylepis*, *C. erdneri* a *C. jacea* (Štěpánek & Koutecký 2004, Koutecký 2008, Danihelka et al. 2012). Podobně na Slovensku a v Rumunsku nemohli být použity vzorky z podhůří vyšších pohoří Karpat. I mimo tato území byly vybírány pouze populace co nejméně postižené hybridizací. Přesto většina populací určitý podíl mezidruhových hybridů obsahovala, nejčastěji hybridy s *C. jacea*. Při sběru jedinců jsme se tedy snažili vyhnout všem mezidruhovým hybridům (*C. ×fleischeri*, *C. ×preissmannii*), kteří byli v populacích přítomní. V některých případech však není snadné odlišit hybridy od rodičovských taxonů, liší se pouze tvarem přívěsku, který může být velmi variabilní a může se blížit některému z rodičovských taxonů (Koutecký et al. 2011). Není tedy vyloučené, že do analýz byli zahrnuti i hybridní jedinci, kteří se morfologicky podobali jednomu z rodičovských taxonů ze skupiny *C. macroptilon*, což mohlo ovlivnit zejména výsledky analýzy genetické variability metodou AFLP.

5. 2. Průtoková cytometrie

Pomocí průtokové cytometrie jsme ověřili ploidii studovaných taxonů. U rumunských populací jsme neměli k dispozici čerstvý rostlinný materiál, proto se ploidie měřila z vypěstovaných semenáčků nebo u části populací přímo ze semínek, kdy je kvalita analýz nižší, ale přesto na určení ploidie dostačující. Ploidie odpovídala již publikovaným údajům (Dostál 1989, Sharkova 1996, Štěpánek & Koutecký 2004, Bancheva & Greilhuber 2006, Koutecký 2007, Koutecký 2008, Dydak et al. 2009), populace všech tří studovaných taxonů jsou tedy tetraploidní $2n = 4x = 44$. Žádné rozdíly ve velikosti genomu mezi taxony jsme nezaznamenali, takže pro rozlišení taxonů nelze velikost genomu použít. V populacích se mohou vyskytovat i jiné typy ploidie (Hardy et al. 2001; Koutecký et al. 2011, 2012), např. mohou vznikat jedinci z neredukovaných gamet, v případě studovaných taxonů by to mohli být hexaploidní jedinci. Frekvence výskytu jedinců s odlišným cytotypem (triploidní, pentaploidní, hexaploidní) je však velmi nízká (Hardy et al. 2001; Koutecký et al. 2011, 2012) a pro samostatné taxony je výskyt těchto typů ploidii nepodstatný. Při měření populací jsme žádné odchylky od tetraploidního cytotypu nezaznamenali.

5. 3. Morfometrická analýza

Jedince v rámci skupiny *Centaurea macroptilon* jsme rozdělili do taxonů na základě jejich geografického původu. Nejprve jsme rozlišili tři hlavní skupiny (severní, jižní, východní). Severní skupina odpovídá taxonu *C. oxylepis*, jižní skupina *C. macroptilon* a východní skupina *C. indurata* v tradičním pojetí. V analýze hlavních komponent všech jedinců se část jedinců severní skupiny odlišovala, proto jsme vzali v úvahu, že jihoslovenské populace nemůžeme s jistotou zařadit do taxonu *C. oxylepis*, protože se nachází v oblasti, kam by podle Dostála (1976, 1989) mohl zasahovat taxon *C. macroptilon*. Proto byla pro další analýzy severní skupina rozdělena na dvě geograficky oddělené podskupiny, na českou podskupinu a jihoslovenskou podskupinu.

Jihoslovenskou podskupinu, která se odlišovala od zbývajících částí severní skupiny (tedy taxonu *C. oxylepis*) jsme po vyhodnocení všech analýz přiřadili k taxonu *C. oxylepis*. Hodnoty znaků u jihoslovenské podskupiny nejvíce odpovídaly hodnotám udávaným v literatuře pro taxon *C. oxylepis* (Dostál 1976, 1989). U české podskupiny se hodnoty znaků někdy více překrývají s jižní skupinou (taxonem *C. macroptilon*) než s jihoslovenskou podskupinou. Tyto rozdíly mohou být vysvětleny několika způsoby. V celé sekci *Jacea*, a tedy i v této skupině, je častá hybridizace. Hybridi se často zpětně kříží s rodičovskými taxony, takže může docházet i k introgresi (Koutecký 2007, Koutecký et al. 2012). Většina

jedinců z jihoslovenských populací se nejvíce blíží popisu taxonu *C. oxylepis* udávaného v literatuře (Dostál 1976, 1989), mají užší a delší přívěsky a větší úbory než zbývající skupiny. Je tedy možné, že jihoslovenská podskupina je nejméně ovlivněna hybridizací. Další možnost je, že jihoslovenská podskupina je také ovlivněna hybridizací a introgresí, ale jiným taxonem než zbývající skupiny. Jihoslovenské populace by mohly být ovlivněny buď hybridizací nebo i částečným zavlečením genů (introgresí) některého taxonu z okruhu *C. phrygia* agg. (pravděpodobně tetraploidní *C. erdneri*), protože taxony z tohoto okruhu mají delší a užší přívěsky než taxony ze skupiny *C. macroptilon*. Zbývající skupiny by pak mohly být ovlivněné hybridizací s taxonem *C. jacea*, ve střední Evropě jsou tyto hybridy dokládány nejčastěji, nebo některé populace s menšími přívěsky by mohly být ovlivněny hybridizací s *C. jacea* a *C. nigrescens*.

Zařazení všech jihoslovenských populací do taxonu *C. oxylepis* není však úplně jednoznačné. V diskriminační analýze s pasivní projekcí jihoslovenské podskupiny se v případě jedné jihoslovenské populace (Dražice) ukázalo, že na jižním Slovensku se vyskytují i jedinci morfologicky podobní populacím z jižní skupiny (*C. macroptilon*). Rozlišení taxonů není tedy geograficky úplně jasné. Jak ukazuje tato populace, tak výskyt *C. macroptilon* je na jižním Slovensku možný.

Zvláštní pozornost jsme věnovali znakům tradičně používaným na rozlišování taxonů (Dostál 1976, 1989): znak výška a šířka úboru (UV a US), délka a šířka nejdelšího přívěsku (ZD a ZS) a viditelnost zákrovních listenů (VZL). Porovnali jsme rozmezí těchto znaků u jednotlivých taxonů, viz obr. 22. Znak týkající se viditelnosti zákrovních listenů vyšel jako nepoužitelný, protože u většiny jedinců jsou zákrovní listeny viditelné: jižní skupina 92%, česká podskupina 94%, jihoslovenská podskupina 98%, východní skupina 95%. Další znaky týkající se velikosti zákrovu a velikosti přívěsků zákrovních listenů se také neukázaly jako vhodné znaky pro rozlišování taxonů. Hodnoty těchto znaků se z velké části překrývají a nelze tedy použít popisované mezní hodnoty pro tyto znaky.

Ve všech analýzách jedinců byly rozdíly mezi danými skupinami minimální, ale v analýzách populací se malé rozdíly mezi skupinami projeví. Rozdíly mezi skupinami tedy existují, ale jsou malé a viditelné hlavně na úrovni populačních průměrů. Když se do analýzy zahrne vnitropopulační (náhodná) variabilita, tak se rozdíly mezi jedinci smazávají. Pokud se skupina *C. macroptilon* rozdělí na 3 skupiny, 4 skupiny nebo 2 skupiny, tak se rozdíl mezi skupinami vždy projeví. V rámci skupiny *C. macroptilon* tedy existuje nějaká geograficky

korelovaná variabilita, která může pocházet například z dávné hybridizace s různými genotypy stejného taxonu (u taxonů *C. oxylepis* a *C. macroptilon* se uvažuje o hybridním původu; Koutecký 2008; je tedy možné, že taxon *C. oxylepis* vznikl hybridizací s jedním genotypem *C. jacea* a taxon *C. macroptilon* s jiným genotypem *C. jacea*). Nebo se může jednat o dva různé taxony. Další struktura uvnitř skupin ale už není.

5. 4. AFLP

Metoda AFLP byla vybrána jako vhodný typ molekulární analýzy pro chrpy na druhové a nižší úrovni (Hilpold et al. 2011, Olšavská et al. 2011, Blair & Hufbauer 2010). Studium genetické variability nabízí dvě možnosti: buď ve většině případů získaná genetická data odpovídají morfologickému vymezení studovaných taxonů, nebo vzácněji neodpovídají (Olšavská et al. 2011). Pokud nejsou genetická a morfologická data shodná (jako v případě skupiny *C. macroptilon*), nabízí se několik různých vysvětlení. V případě skupiny *C. macroptilon* by takový výsledek mohl znamenat, že taxony jsou totožné, což ale analýza hlavních koordinát (PCoA) nepotvrdila. Neodlišily se tři skupiny, ale podle PCoA pouze dvě skupiny, které jsou si blízké (severní geografická skupina a zbývající dvě skupiny, které i geograficky mohou patřit k sobě). Získaná molekulární data tedy nepotvrdila morfologické rozdělení na tři taxony udávané v literatuře (Dostál 1976, 1989). V ostatních analýzách (NeighbourNet a Bayesiánské shlukování) se neukázala žádná struktura v datech. Pouze se od všech tetraploidních taxonů oddělily diploidní příbuzné taxony. Tento výsledek může být způsoben daty, hybridizací nebo introgresí jiných taxonů (např. *C. jacea* nebo *C. erdneri*). Do výsledné datové matice mohlo být vybráno příliš mnoho fragmentů, takže se u jednotlivých vzorků v datové matici může vyskytovat hodně nulových úseků, které mohou vytvářet šum v datech. Výsledek může být ovlivněn také častou hybridizací mezi příbuznými taxony a introgresí, častá hybridizace *C. macroptilon* a *C. oxylepis* s taxonem *C. jacea* může vést k tomu, že jsou si taxony geneticky podobnější a drobné rozdíly mezi taxony v rámci skupiny *C. macroptilon* nejsou v molekulárních datech tak patrné (viz PCoA) nebo se žádná struktura neprojeví (viz NeighbourNet a Bayesiánské shlukování).

5. 5. Shrnutí morfometriky a AFLP

Jak bylo již diskutováno, rozdíly mezi taxony nejsou velké a jsou zřetelně menší než v případě jiných, dobře vymezených druhů chrp (Koutecký 2007, Olšavská et al. 2011, Koutecký et al. 2012). To ukazuje, že není vhodné, aby se tyto tři taxony rozlišovaly na úrovni druhů. Ve všech analýzách jedinců byly rozdíly mezi danými skupinami minimální. Proto se jako nejlepší řešení nabízí sloučení všech tří studovaných taxonů do jednoho druhu.

Ale protože se v analýzách populací rozdíl mezi skupinami projeví a drobné rozlišení taxonů na úrovni populací je patrné, bylo by vhodné zachovat rozlišení taxonů na poddruhové úrovni. Na základě molekulárních a morfologických dat je nejlepší rozdělení do dvou skupin – poddruhů. Jeden poddruh bude zahrnovat severní morfologickou skupinu, která odpovídá taxonu *C. oxylepis*, a druhý poddruh bude zahrnovat jižní a východní skupinu, které odpovídají *C. macroptilon* a *C. indurata* a jsou si nejen morfologicky a geneticky, ale také geograficky bližší. Morfologické rozdíly mezi jihoslovenskou a českou podskupinou se v molekulárních datech neprojevily. Poddruhy se budou rozlišovat na základě znaků získaných z diskriminační analýzy jedinců pro dvě skupiny (viz příloha 5). Jako hlavní rozlišovací kritérium poslouží areál výskytu.

5. 6. Nomenklatura

Na úrovni druhů existují pro tři hlavní taxony ze skupiny *Centaurea macroptilon* tato jména: *Centaurea oxylepis* (Wimm. et Grab.) Hayek, 1901; *Centaurea macroptilon* Borbás, 1887; *Centaurea indurata* Janka, 1858. Z těchto jmen je tedy nejstarší *Centaurea indurata* Janka a mělo by tedy být použito, pokud se všechny tři taxony spojí do jednoho druhu. U jména *C. indurata* je však komplikace s různým použitím jména pro více taxonů. Původně bylo jméno *C. indurata* používáno v Rumunsku pro taxon morfologicky podobný *C. macroptilon*, ale v současnosti se toto jméno používá také pro taxon ze skupiny *C. phrygia* agg. morfologicky podobný *C. stenolepis* (Dostál 1976, 1989; Ciocârlan 2009). Taxon označovaný jako *C. indurata* je udáván také z Bulharska (Bancheva & Greilhuber 2006), ale zde se nejspíš jedná o jiný, morfologicky odlišný taxon z okruhu *C. phrygia* (P. Koutecký, ústní sdělení.). Ze stručného původního popisu autora jména (Janka 1858) je těžké odhadnout přesný vzhled popisovaného taxonu. Rozhodující je originální materiál tohoto jména (ve smyslu definovaném v nomenklatorickém kódu; McNeill J. et al. 2012). Originální herbářový materiál k popisu se bohužel nedochoval a bude nutné stanovit neotyp jména *C. indurata* (P. Koutecký, ústní sdělení). Nabízí se však možnost použít pro neotypifikaci herbářové položky autora jména (BP 181346 a BP 181349, viz příloha 6), které však sbíral později a nejde tedy o součást originálního materiálu jména. Jinak ale dobře odpovídají popisu druhu, byly tak autorem určeny a pochází z oblasti Rumunska. Všechny rostliny na těchto položkách odpovídají jednoznačně rumunskému taxonu ze skupiny *C. macroptilon*.

Nový společný druh bude pojmenován *Centaurea indurata*, poddruhy budou *Centaurea indurata* subsp. *indurata* (pro spojené taxony *C. macroptilon* a *C. indurata*, podruh zahrnující neotyp jména *C. indurata*) a *Centaurea indurata* subsp. *oxylepis*.

6. Závěr

Porovnali jsme morfologickou i genetickou variabilitu mezi taxony ze skupiny *C. macroptilon*. Všechny tři studované taxony (*C. macroptilon*, *C. oxylepis* a *C. indurata*) mají stejnou ploidii ($2n = 4x = 44$), jsou si morfologicky velmi podobné, na úrovni jedinců je velmi těžké je odlišit. Znaky tradičně uváděné v literatuře jako odlišující dva hlavní taxony *C. oxylepis* a *C. macroptilon* se po otestování neprojeví jako vhodné. Znak viditelnost zákrovních listenů je na odlišení taxonů nepoužitelný, a další znaky týkající se velikosti zákrovů a velikosti přívěsků zákrovních listenů se překrývají a není tedy snadné je na odlišení taxonů použít. Analýza genetické variability všech studovaných taxonů neodhalila téměř žádné rozdíly mezi skupinami, pouze malé odlišení mezi taxonem *C. oxylepis* a zbývajícími dvěma taxony. Protože na úrovni jedinců je těžké cytologicky, morfologicky i geneticky rozlišit taxony, jeví se jako nejlepší rozhodnutí sloučit taxony do jednoho druhu. Jako společné druhové jméno pro tyto tři původní druhy bude použito jméno *Centaurea indurata* Janka (nejdříve se však bude muset označit neotyp, viz diskuze). Protože na úrovni populací je však malé odlišení taxonů vidět a taxony se geograficky víceméně odlišují, bylo by vhodné zachovat původní taxony *C. macroptilon* a *C. oxylepis* jako poddruhy *C. indurata* subsp. *indurata* a *C. indurata* subsp. *oxylepis* (znaky na odlišení poddruhů byly získány z diskriminační analýzy, přehled hodnot znaků pro oba poddruhy je v příloze 5).

7. Literatura

- Bancheva S. & Greilhuber J. (2006): Genome size in Bulgarian *Centaurea* s. l. (Asteraceae). – *Plant Syst. Evol.* 257: 95-117
- Blair A. C. & Hufbauer R. A. (2010): Hybridization and invasion: one of North America's most devastating invasive plants shows evidence for a history of interspecific hybridization. – *Evol. Appl.* 3: 40–51.
- Borbás V. (1887): Vásvármegye növényföldrajza és flórája (Geographia atque Enumeratio plantarum comitatus Castriferrei in Hungaria). – Szombathely.
- Ciocârlan V. (2009): Flora Ilustrată a României: Pteridophyta et Spetmatophyta. București: Ceres.
- Danihelka J., Chrtek J. Jr. & Kaplan Z. (2012): Checklist of vascular plants of the Czech Republic. – *Preslia* 84: 647–811.
- Doležel J., Doleželová M. & Novák F. J. (1994): Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid ananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). – *Biologia Plantarum* 36: 351-357.
- Dostál J. (1976): *Centaurea* L. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Valentine D. H., Walters S. M. & Webb D. A. (eds), *Flora Europaea* 4: 254-301, Cambridge University Press, Cambridge.
- Dostál J. (1989): *Nová Květena Československé socialistické republiky*. – Academia, Praha.
- Dydak M., Kolano B., Nowak T., Siwinska D & Maluszynska J. (2009): Cytogenetic studies of three European species of *Centaurea* L. (Asteraceae). – *Hereditas* 146: 152–161.
- Earl D. A. & von Holdt B. M. (2012): Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. – *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- Ehrich D. (2006): AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. – *Molecular Ecology Notes* 6: 603-604

- Garcia-Jacas N., Susanna A., Mozaffarian V. & Ilarslan R. (2000): The natural delimitation of *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae): ITS sequence analysis of the *Centaurea jacea* group. – *Plant Syst. Evol.* 223: 185–199.
- Garcia-Jacas N., Susanna A., Garnatje T. & Vilatersana R. (2001): Generic delimitation and phylogeny of the subtribe Centaureinae (Asteraceae): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis. – *Annals of Botany* 87: 503–515.
- Garcia-Jacas N., Uysal T., Romashchenko K., Suárez-Santiago V. N., Ertuğrul K. & Susanna A. (2006): *Centaurea* revisited: A molecular survey of the *Jacea* group. – *Annals of Botany* 98: 741–753.
- Garmendia A., Ferriol M., Juarez J., Zając A., Kałużny K. & Merle H. (2015): A rare case of a natural contact zone in Morocco between an autopolyploid and an allopolyploid of *Centaurea aspera* with sterile tetraploid hybrids. – *Plant Biology* 17(3): 746–757.
- Hardy O. J., de Loose M., Vekemans X. & Meerts P. (2001): Allozyme segregation and inter-cytotype reproductive barriers in the polyploid complex *Centaurea jacea*. – *Heredity* 87: 136–145.
- Hellwig F. H. (2004): Centaureinae (Asteraceae) in the Mediterranean – history of ecogeographical radiation. – *Plant Syst. Evol.* 246: 137–162.
- Hilpold A., Schönswetter P., Susanna A., Garcia-Jacas N. & Vilatersana R. (2011): Evolution of the central Mediterranean *Centaurea cinerea* group (Asteraceae): Evidence for relatively recent, allopatric diversification following transoceanic seed dispersal. – *Taxon* 60(2): 528–538.
- Hilpold A., Vilatersana R., Susanna A., Meseguer A. S., Boršić I., Constantinidis T., Filigheddu R., Romaschenko K., Suárez-Santiago V. N., Tugay O., Uysal T., Pfeil B. E. & Garcia-Jacas N. (2014a): Phylogeny of the *Centaurea* group (Centaurea, Compositae) - Geography is a better predictor than morphology. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 77: 195–215.
- Hilpold A., Garcia-Jacas N., Vilatersana R. & Susanna A. (2014b): Taxonomical and nomenclatural notes on *Centaurea*: A proposal of classification, a description of new sections and subsections, and a species list of the redefined section *Centaurea*. – *Collectanea Botanica* 33: e001.

- Huson D. H. & Bryant D. (2006): Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. – *Molecular Biology and Evolution* 23 (2): 254-267.
- Jakobsson M. & Rosenberg N. A. (2007): CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. – *Bioinformatics* 23: 1801–1806.
- Janka V. (1858): Bemerkungen über einige Arten der Gattung *Centaurea* aus Ungarn und Siebenbürgen. – *Flora* 28: 441-445.
- Koutecký P. (2007): Morphological and ploidy level variation of *Centaurea phrygia* agg. (*Asteraceae*) in the Czech Republic, Slovakia and Ukraine. – *Folia Geobotanica* 42: 77–102.
- Koutecký P. (2008): Taxonomická studie střeoevropských zástupců *Centaurea* sect. *Jacea* [Taxonomic study of Central European taxa of *Centaurea* sect. *Jacea*]. - Ph.D. Thesis, University of South Bohemia, České Budějovice.
- Koutecký P. (2009): Taxonomic and nomenclatural revision of *Centaurea subjacea* (*Asteraceae-Cardueae*) and similar taxa. – *Phyton-Ann. Rei Bot.* 49(1): 63–76.
- Koutecký P., Baďurová T., Štech M., Košnar J & Karásek J. (2011): Hybridization between diploid *Centaurea pseudophrygia* and tetraploid *C. jacea* (*Asteraceae*): the role of mixed pollination, unreduced gametes, and mentor effects. – *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 93–106.
- Koutecký P., Štěpánek J. & Baďurová T. (2012): Differentiation between diploid and tetraploid *Centaurea phrygia*: mating barriers, morphology and geographic distribution. – *Preslia* 84: 1–32.
- Koutecký P. & Košnar J. (2014): Metody molekulární biologie v rostlinné ekologii a systematice. [Methods of molecular biology in plant ecology and systematics.]. – protocols and instructions for practicum, University of South Bohemia, České Budějovice.
- Koutecký P. (2015): MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. – *Plant Systematics and Evolution* 301(4): 1115-1121.
- López-Alvarado J., Sáez L., Filigheddu R., Garcia-Jacas N. & Susanna A. (2014): The limitations of molecular markers in phylogenetic reconstruction: The case of *Centaurea* sect. *Phrygia* (*Compositae*). – *Taxon* 63(5): 1079–1091.

McNeill J., Barrie F. R., Buck W. R., Demoulin V., Greuter W., Hawksworth D. L., Herendeen P. S., Knapp S., Marhold K., Prado J., Prud'homme van Reine W. F., Smith G. F., Wiersema J. H. & Turland N. [eds. & comps.] (2012): International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. – Koeltz Scientific Books, Königstein, 208 p. [Regnum Veg. 154].

Meusel H. & Jäger E. J. (1992): Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. Band 3. – Gustav Fischer Verlag, Jena.

Mueller U. G. & Wolfenbarger L. L. (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. – Trends in Ecology and Evolution 14: 389-394.

Olšavská K., Perný M., Kučera J., & Hodálová I. (2011): Biosystematic study of the *Cyanus triumfetti* group in Central Europe. – Preslia 83: 59-89.

Olšavská K. & Löser C. J. (2013): Mating system and hybridization of the *Cyanus triumfettii* and *C. montanus* groups (Asteraceae). – Folia Geobot. 48: 537-554

Pritchard J. K., Stephens M. & Donnelly P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. – Genetics 155: 945-959.

R Core Team (2013): R: a language and environment for statistical computing. – R Foundation for Statistical Computing, Vienna, <http://www.R-project.org/>.

Sharkova S. T. (1996): Mediterranean chromosome number reports 6 (767-772). Fl. Medit. 6: 328–333.

Štěpánek J. & Koutecký P. (2004): *Centaurea* L. chrpina, chrpa, In: Slavík B. & Štěpánková J. (eds), Květena České republiky 7: 426-449, Ed. Academia, Praha.

Ter Braak C. J. F. & Šmilauer P. (2012): Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. Microcomputer Power, Ithaca, USA, 496 pp.

Wimmer F. & Grabowski H. (1829): Flora Silesiae. Vol 2/2. – Wroclaw.

8. Přílohy

Příloha 1: Seznam lokalit sbíraných populací (* - měření získaná od školitele).

ID	Zkratka	Jméno	Taxon	Ze mě	Oblast	popis lokality	Alt	N	E	Datum sběru	Legit	počet jedinců
1	BUCH	Buchsachen	Centaurea macroptilon	AT	Burgenland	Riedlingsdorf: travnatý okraj silnice směrem na Buchsachen, cca 1,2 km JZ od obce		47,32958	16,13194	27.7.2014	Koutecký P., Otisková V.	17
2	EIS	Eisenhüttel	Centaurea macroptilon	AT	Štýrsko	Eisenhüttel: travnaté okraje silnice cca 2 km JV od obce		47,09061	16,21731	27.7.2014	Koutecký P., Otisková V.	22
3	HEIK	Heiligen Kreuz	Centaurea macroptilon	AT	Burgenland	Heiligenkreutz im Lafnitztal: travnatý okraj silnice, cca 2,3 km SV od obce směrem k hranici s Maďarskem		47,00142	16,28239	27.7.2014	Koutecký P., Otisková V.	16
4	MODR	Modriach	Centaurea macroptilon	AT	Štýrsko	Modriach: cca 1,8 km SZ od dálničního sjezdu 224 - Modriach		46,97575	15,03544	27.7.2014	Koutecký P., Otisková V.	22
5	SLOV4	4	Centaurea macroptilon	SL	Kočevje	Kočevska Reka: cca 1 km J od obce		45,56575	14,80028	23.7.2014	Štech M.	15
6	BEST	Běstvína	Centaurea oxylepis	CZ	Železné hory	Běstvína: opukové stráně		49,84361	15,59306	4.9.2013	Koutecký P., Otisková V.	22
7	BIZO	Bizovo	Centaurea oxylepis	SK	Cerová vrchovina	Kyselka: travnaté louky u obce, cca 1,1 km Z od obce Bizovo		48,28056	19,98389	28.7.2014	Koutecký P., Otisková V.	15
8	CEST	Čestice	Centaurea oxylepis	CZ	Orlická tabule	Čestice: travnaté stráně		50,13322	16,16194	4.9.2013	Koutecký P., Otisková V.	27
9	DETK	Dětkovice	Centaurea oxylepis	CZ	Hornomoravský úval	Dětkovice: okraj lesa u silnice (zarůstající)	323	49,39958	17,07212	5.9.2013	Otisková V.	14
10	DRYS	Dryšice	Centaurea oxylepis	CZ	Vyškovská brána	Dryšice: lom-suchá stráň na okrajích lomu (zarůstající)	266	49,34102	17,0745	5.9.2013	Otisková V.	16
11	HHYN	Horní Hynčina	Centaurea oxylepis	CZ	Svitavská pahorkatina	Horní Hynčina: travnatá louka u obce		49,66895	16,53632	24.7.2013	Otisková V.	15
12	MHRA	Malé Hradisko	Centaurea oxylepis	CZ	Drahanská vrch.	Malé Hradisko: travnatý svah (sjezdovka)		49,49952	16,88768	5.9.2013	Otisková V.	18
13	OPAT*	Opatová	Centaurea oxylepis	SK	Biele Karpaty	Opatová: suchá stránka nad cestou na začátku Opatovské doliny na JV okraji obce, asi 0,5 km VJV od kostela	250	48,90897	18,10528	1.8.2003	Koutecký P.	29
14	POHL	Pohledy	Centaurea oxylepis	CZ	Svitavská pahorkatina	Pohledy: travnatá louka, u lesa, cca 300 m V od obce	526	49,69113	16,5649	24.7.2013	Otisková V.	13
15	PROC	Prochody	Centaurea oxylepis	CZ	Orlická tabule	Prochody: okraj cesty k rybníku Svatba		50,03553	16,14319	4.9.2013	Koutecký P., Otisková V.	12
16	RIM*	Rimavská Sobota	Centaurea oxylepis	SK	Cerová vrchovina	Rimavská Sobota: okraj lesa asi 2,4 km JJZ od středu města	220	48,36353	20,00425	1.8.2003	Koutecký P.	35
17	SKLE	Sklenné	Centaurea oxylepis	CZ	Svitavská pahorkatina	Sklenné: travnatá louka, u lesa		49,71477	16,5259	24.7.2013	Otisková V.	13

18	SVIT	Svitavy	Centaurea oxylepis	CZ	Svitavská pahorkatina	Svitavy: travnatý okraj u silnice v obci		49,75581	16,45081	24.7.2013	Otisková V.	8
19	VOJE	Vojenice	Centaurea oxylepis	CZ	Orlická tabule	Vojenice: travnatá louka u řeky		50,21922	16,12714	4.9.2013	Koutecký P., Otisková V.	27
20	VOZ*	Voznica	Centaurea oxylepis	SK	Žiarska kotlina	Voznica: louky ve Voznické dolině, asi 2 km VJV od kostelav obci	250	48,45292	18,72189	1.8.2003	Koutecký P.	30
21	HART	Hartberg	Centaurea macroptilon	AT	Štýrsko	Hartberg: okraje silnice, cca 2,5 km SZ od obce		47,29483	15,94803	27.7.2014	Koutecký P., Otisková V.	19
22	HADM*	Hall bei Admont	Centaurea macroptilon	AT	Štýrsko	Hall: cca 3 km S od obce.		47,61206	14,45172	23.7.2014	Koutecký P.	10
23	SAJO	Sájopüspöki	Centaurea oxylepis	HU	Putnok	Sájopüspöki: travnatá stráň u silnice		48,2735	20,35239	28.7.2014	Koutecký P., Otisková V.	25
24	DRAZ	Dražice	Centaurea oxylepis	SK	Revúcká vrchovina	Dražice: travnaté meze, cca 1 km SZ od středu obce		48,4395	20,05528	28.7.2014	Koutecký P., Otisková V.	17
25	MSTR	Malé Straciny	Centaurea oxylepis	SK	Juhoslovenská kotlina	Malé Straciny: travnatý pruh u silnice na okraji obce		48,20644	19,41489	28.7.2014	Koutecký P., Otisková V.	20
26	PLAS	Plášťovce	Centaurea oxylepis	SK	Juhoslovenská kotlina	Plášťovce: travnatá louka za obcí.		48,17075	18,98175	28.7.2014	Koutecký P., Otisková V.	21
27	STIT	Štíty	Centaurea oxylepis	CZ	Hanušovičská vrchovina	Štíty: travnaté louky nad silnicí směrem na Šumperk		49,98528	16,81605	6.8.2014	Otisková V.	20
28	RAPO	Rapotín	Centaurea oxylepis	CZ	Hanušovičská vrchovina	Rapotín: travnatá louka uprostřed obce (stavební parcely?)		50,00507	17,0253	6.8.2014	Otisková V.	23
29	KALK	Kalkow	Centaurea oxylepis	PL	Vidnavská nížina	Kalkow: travnatý lem u silnice Vidnava-Kalkow		50,39292	17,18382	6.8.2014	Otisková V.	20
30	NYSA	Nysa	Centaurea oxylepis	PL	okres Nysa	Nysa: travnatý lem u silnice, travnatá louka mezi silnicí a rybníkem		50,50272	17,39405	6.8.2014	Otisková V.	34
31	LIBI	Libina	Centaurea oxylepis	CZ	Hornomoravský úval	Libina: louky u silnice (pastviny)		49,90463	17,04317	6.8.2014	Otisková V.	21
32	NLHO	Nedašova Lhota	Centaurea oxylepis	CZ	Bílé Karpaty	Nedašova Lhota: travnatá louka uprostřed obce		49,11964	18,07744	9.8.2014	Otisková V.	21
33	BILA	Bílavsko	Centaurea oxylepis	CZ	Podbeskydská pahorkatina	Bílavsko: okraj cesty, okraj lesa		49,38991	17,6355	9.8.2014	Otisková V.	23
34	SLOV3	3	Centaurea macroptilon	SL	Osilnica	Bezgovica: cca 1,3 km VSV od obce		45,5533	14,7249	23.7.2014	Štech M.	13
35	SLOV8	8	Centaurea macroptilon	SL	Krško	Bučerca: cca 580 m SV od obce		45,97861	15,51574	23.7.2014	Štech M.	15
36	SLOV9	9	Centaurea macroptilon	SL	Šentjur	Žegar: cca 280 m J od středu obce		46,13074	15,45661	23.7.2014	Štech M.	17
37	RUM1	1	Centaurea indurata	RO	Mureș	Feleag: louky asi 2,7 km V od obce, asi 5,5 km od města Cristuru Secuiesc	620	46,24133	25,05256	2012	Badarau A.	10
38	RUM2	2	Centaurea indurata	RO	Mureș	Criș: louky asi 3,4 km JJV od středu obce, asi 13 km JJZ od města Sighișoara	450	46,11704	24,71081	2012	Badarau A.	14
39	RUM4	4	Centaurea indurata	RO	Cluj	Cluj-Napoca: suchá louka v kopcích JZ od města, asi 4,3 km JZ od katedrály	520	46,73868	23,55614	2012	Badarau A.	11
40	RUM5	5	Centaurea indurata	RO	Cluj	Pietroasa: louky asi 2,6 km VJV od středu obce	600	46,45783	23,66740	2012	Badarau A.	15
41	HAJN	Hajnáčka	Centaurea oxylepis	SK	Cerová vrchovina	Hajnáčka: louka u lesní chaty v údolí Dechtárského potoka, asi 3,1 km od kostela	250	48,23030	19,98779	28.7.2014	Koutecký P., Otisková V.	23

42	SOTE	Sotěska	Centaurea macroptilon	SL	Kočevje	Kočevje: asi 10 km JZ od města, podél silnice asi 1 km J od obce Kočevska Reka	570	45,56576	14,80031	23.7.2014	Štech M.	23
43	OLLE	Ollersdorf (203)	Centaurea macroptilon	AT	Burgenland	Ollersdorf im Burgenland: louka na J okraji obce	260	47,18327	16,16116	27.7.2014	Koutecký P., Otisková V.	10
44	PADM	Padurea Dumbrava Mica	Centaurea indurata	RO	Sibiu	Cisnădie: louka u SV okraje lesa Dumbrava Mică, asi 3,4 km ZSZ od středu obce	560	45,72476	24,12000	2012	Vonica G.	13
45	BKO	Banja Koviljača	Centaurea macroptilon	Srb sko	Mačva	region (v angličtině district) Mačva, Banja Koviljača: okraj cesty v nivě řeky Drina, asi 3,8 km JJZ od obce	130	44,48094	19,13717	26.7.2007	Koutecký P.	30

Příloha 2: Dodatečný seznam lokalit vzorků použitých pro AFLP (* - označeno datum sběru na lokalitě, jedinci vypěstováni ze semínek).

ID	Populace	Jméno	Taxon	Země	Oblast	Popis lokality	Alt.	N	E	Datum sběru	Legit
46		Toparcea	Centaurea indurata	RO	Sibiu	Topârcea: louky asi 3,5 km V od středu obce, u silnice do města Ocna Sibiului	480	45,88515	23,99916	2012	Vonica G.
47		Gießhübl	Centaurea nigrescens	AT	Niederösterreich, Wienerwald	Gießhübl: osada Tirolershofsiedlung, S okraj, travnatá opuštěná plocha a okraj silnice	315	48,10787	16,24743	19.9.2010	Koutecký P.
48	DUB	Důbrava	Centraurea stenolepis	CZ	Dolnomoravský úval	Ratíškovice: okraj zarůstající paseky v lese Důbrava, u žlutě značené turistické cesty, asi 2,2 km JJV od kostela v obci	200	48,90389	17,17056	19.8.2002*	Koutecký P.
49	TAR	Tara	Centraurea stenolepis	ME	Mojkovac	asi 16 km SZ od města, les v údolí řeky Tara u osady Dobrilovina	740	43,02800	19,40456	29.7.2007	Koutecký P.
50		Lesná-Bílé Karpaty	Centraurea stenolepis	CZ	Horní Němčí	louky na S svahu vrchu Lesná (696 m), asi 3,9 km JZ od kostela v obci	630	48,90278	17,65306	20.8.2002*	Koutecký P.
51		Libice-Polabí	Centaurea jacea subsp. angustifolia	CZ	Polabí	Libice nad Cidlinou: podél cesty s červenou turistickou značkou na V okraji NPR Libický luh, asi 1 km JJZ od nádraží v obci	190	50,11923	15,17841	19.7.2003*	Koutecký P.
52		Burda-jihní Slovensko	Centaurea jacea subsp. jacea	SK	Kováčovské kopce	Kamenica nad Hronom: suché louky a okraje křovin u červené turistické značky asi 1 km V od kostela v obci	250	47,83287	18,73983	17.8.2005*	Koutecký P.
53	LAR	(phrygia)	Centaurea phrygia s.str.	UA	Čornohora	Lazeščyna: údolí potoka Lazeščanka, asi 9 km JJV od středu obce	940	48,1997	24,4608	11.7.2003	Koutecký P.
54	VELF	Velká Fatra	Centaurea erdneri	SK	Velká Fatra	Liptovské Revúce, Vyšná Revúca: Zelená dolina, asi 3,7 km Z od středu obce, louka	860	48,9111	19,1111	21.9.2001*	Koutecký P.
55	VER 1B	Vernár-stř. Slovensko	Centaurea erdneri	SK	Nízké Tatry	Vernár: louky asi 0,7 km ZSZ od kostela v obci	800	48,9208	20,2611	27.8.2009	Koutecký P.
56	VIS	Visalaje	Centaurea erdneri	CZ	Moravskoslezské Beskydy	Krásná, Visalaje: v horní části sjezdovky asi 200 m J od autobusové zastávky	770	49,5172	18,5286	10.9.2009	Koutecký P.
57		Radava-jihní Slovensko	Centaurea jacea subsp. angustifolia	SK	Podunajská nížina	Radava: nekosený pruh na okraji vinic, asi 1 km V od kostela v obci	140	48,09389	18,31528	28.8.2009	Koutecký P.
58		Korytná	Centaurea jacea subsp. jacea	CZ	Bílé Karpaty	Korytná: asi 3,3 km JJV od obce, nekosená suchá stráň nad silnicí do obce, nad odbočkou od hlavní silnice Strání – Veselí nad Moravou	540	48,91278	17,67667	24.8.2009	Koutecký P.
59	POH	Pohansko-jihní Morava	Centaurea jacea subsp. angustifolia	CZ	Dolnomoravský úval	Břeclav, Pohansko: hrúd za plotem obory mezi Lánskými loukami a Pohanskem, asi 4,9 km JJV od nádraží	155	48,7134	16,9075	23.7.2005*	Koutecký P.
60	14- 186	Anglie	Centaurea nigra	UK	severní Skotsko	Durness: u vchodu do vápencové jeskyně Smoo Cave, asi 1,6 km VJV od obce	10	58,56397	-4,7199	2014	L. Ekrt

61	OLE2	Olešnice	Centaurea pseudophrygia	CZ	Orlické hory	Olešnice v Orlických horách: louky v okolí chaty Čihalka, asi 2,9 km V od kostela v obci	730	50,3744	16,3500	19.8.2008	Koutecký P.
62		Mlýn u Dubu	Centaurea pseudophrygia	CZ	Soběnovská vrchovina	Soběnov: okolí samoty Mlýn u Dubu na levém břehu Černé, J od obce	570	48,74888	14,55323	28.9.2014	Koutecký P.
63	KOB	(phrygia)	Centaurea phrygia s.str.	CZ	Žulovská pahorkatina	Kobylá nad Vidnavkou: nekosená louka asi 100 m S od železniční zastávky, V od obce	290	50,33917	17,12556	13.8.2009	Koutecký P.
64		Bohinsko jez	Centaurea jacea subsp. jacea	SI	Julské Alpy	Stara Fužina: louky a okrajce cesty Z od Bohinského (Bohinsko jezero), asi 5,4 km Z od středu obce	570	46,28498	13,8244	22.7.2014	Štech M.
65		Radna	Centaurea rodnensis	RO	Rodna	Valea Vinului: 3,7 km SZ od obce, vysokobylinné porosty na V svahu J vrcholu 1854, asi 1,5 km JJV od vrcholu Corongis (1987)	168 0	47,51077	24,80058	17.8.2008	Koutecký P.
66		Horní Údolí-Jeseníky	Centaurea erdneri	CZ	Hrubý Jeseník	Horní Údolí: louky na JV okraji obce	640	50,21556	17,35417	12.8.2009	Koutecký P.
67	195	Bohinsko jez	Centaurea julica	SI	Julské Alpy	Stara Fužina: vápencové skály v okolí turistické cesty Bohinsko jezero - Črno jezero, asi 7,2 km Z od obce	960	46,29461	13,80063	22.7.2014	Koutecký P.
68	188	Klagenfurt	Centaurea jacea subsp. jacea	AT	Kärnten	Völkermarkt: asi 6 km ZJZ od středu města, okraj silnice B70 a přilehlá louka S od osady Höhenbergen	450	46,65352	14,55571	17.7.2014	Koutecký P.
69	189	(carniolica)	Centaurea carniolica	AT	Kärnten	Klopain: okraj silnice asi 1 km ZJZ od středu obce, JZ od jezera Kleinsee	460	46,60448	14,56247	17.7.2014	Koutecký P.
70	217	(weldeniana)	Centaurea weldeniana	HR	Ličko polje	Gospić: SZ úpatí hory Zir, asi 22 km VJV od města, suchá louka	60	44,4352	15,6052	7.8.2007	Koutecký P.
71	KOM	Kopýtkův mlýn-Vysočina	Centaurea jacea subsp. jacea	CZ	Českomoravská vrchovina	Horní Myslová: louka u potoka Z od osady Kopejtkův Mlýn, asi 0,7 km SZ od obce	500	49,1700	15,4153	31.7.2005*	Koutecký P.
72	DOM	(stenolepis)	Centaurea stenolepis	CZ	Polabí	Dománovice: Z okraj lesa 1,2 km SSV od obce	225	50,1217	15,3286	6.8.2002*	Koutecký P.
73	HUS	Husinec-j jižní Čechy	Centaurea jacea subsp. jacea	CZ	Prachatické Předšumaví	Husinec: louka na pravém břehu řeky Blanice, asi 0,8 km J od kostela v obci	510	49,0472	13,9847	17.8.2004*	Koutecký P.
74	O31	Radna	Centaurea erdneri	RO	Rodna	Rodna: údolí k obci Valea Vinului, louka na Z svahu těsně nade dnem údolí, asi 3,6 km S od středu města	620	47,45189	24,80941	16.8.2008	Koutecký P.
75	SA	Solníčka	Centaurea jacea subsp. angustifolia	SK	Východoslovenská nížina	Solníčka: zbytky luk na okraji polí u vyústění cesty z obce na protipovodňovou hráz Latorice, asi 2,6 km S-SSV od kostela v obci	100	48,50080	21,96610	25.8.2004*	Koutecký P.

Priloha 3: Spearmanova korelační matice znaků, červeně zvýrazněny $r \geq [0,9]$, zeleně hodnoty $r \geq [0,5]$.

	VN	VV	VC	VVC	LB	LD	LS	LDS	LAP	UV	US	UVS	VVP	VZL	ZD	ZS	ZDS	ZP	ZPD	ZVD	ZVS	ZVDS	ZBD	ZBH
VN	*	-0,11	0,78	-0,64	-0,03	0,14	-0,02	0,15	0,06	0,12	0,06	0,04	0,04	0,08	0,19	-0,10	0,17	0,10	0,13	0,03	0,03	-0,02	0,07	-0,03
VV	-0,11	*	0,47	0,79	0,07	0,50	0,46	-0,11	0,10	0,09	0,15	-0,11	-0,05	-0,07	0,22	-0,01	0,15	0,05	0,14	0,04	0,04	0,00	0,05	-0,06
VC	0,78	0,47	*	-0,10	0,01	0,41	0,25	0,06	0,11	0,15	0,12	-0,01	-0,01	0,06	0,29	-0,12	0,24	0,10	0,18	0,04	0,03	-0,01	0,10	-0,05
VVC	-0,64	0,79	-0,10	*	0,07	0,30	0,35	-0,17	0,04	0,01	0,09	-0,11	-0,06	-0,10	0,05	0,04	0,02	-0,02	0,03	0,00	0,01	0,00	0,01	-0,02
LB	-0,03	0,07	0,01	0,07	*	-0,09	0,16	-0,28	-0,01	0,08	0,19	-0,13	0,01	-0,03	0,14	0,02	0,07	0,08	0,15	0,12	0,00	0,06	-0,02	-0,06
LD	0,14	0,50	0,41	0,30	-0,09	*	0,62	0,08	0,20	0,09	0,15	-0,09	-0,18	-0,06	0,30	0,02	0,17	0,18	0,21	0,09	0,02	0,04	0,04	-0,05
LS	-0,02	0,46	0,25	0,35	0,16	0,62	*	-0,70	0,19	0,13	0,20	-0,12	0,02	-0,06	0,32	-0,01	0,22	0,09	0,26	0,02	-0,02	0,03	0,06	-0,08
LDS	0,15	-0,11	0,06	-0,17	-0,28	0,08	-0,70	*	-0,08	-0,10	-0,13	0,06	-0,17	0,03	-0,13	0,01	-0,10	0,03	-0,14	0,04	0,06	-0,02	-0,05	0,04
LAP	0,06	0,10	0,11	0,04	-0,01	0,20	0,19	-0,08	*	0,08	0,11	-0,06	-0,01	-0,06	0,00	0,02	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00	0,04	-0,01	0,01
UV	0,12	0,09	0,15	0,01	0,08	0,09	0,13	-0,10	0,08	*	0,52	0,22	0,10	0,04	0,33	0,03	0,17	0,22	0,33	0,13	0,01	0,07	0,05	-0,10
US	0,06	0,15	0,12	0,09	0,19	0,15	0,20	-0,13	0,11	0,52	*	-0,67	0,20	0,00	0,28	0,12	0,08	0,21	0,30	0,20	0,03	0,10	0,12	-0,09
UVS	0,04	-0,11	-0,01	-0,11	-0,13	-0,09	-0,12	0,06	-0,06	0,22	-0,67	*	-0,15	0,07	-0,02	-0,15	0,09	-0,08	-0,04	-0,15	-0,03	-0,06	-0,07	0,01
VVP	0,04	-0,05	-0,01	-0,06	0,01	-0,18	0,02	-0,17	-0,01	0,10	0,20	-0,15	*	0,00	-0,10	-0,08	-0,01	-0,10	-0,06	0,02	-0,06	0,07	0,06	0,04
VZL	0,08	-0,07	0,06	-0,10	-0,03	-0,06	-0,06	0,03	-0,06	0,04	0,00	0,07	0,00	*	0,08	-0,24	0,21	-0,15	0,02	-0,05	-0,06	0,03	-0,03	0,04
ZD	0,19	0,22	0,29	0,05	0,14	0,30	0,32	-0,13	0,00	0,33	0,28	-0,02	-0,10	0,08	*	-0,16	0,72	0,20	0,78	0,31	0,04	0,17	0,00	-0,15
ZS	-0,10	-0,01	-0,12	0,04	0,02	0,02	-0,01	0,01	0,02	0,03	0,12	-0,15	-0,08	-0,24	-0,16	*	-0,77	0,55	-0,06	0,11	-0,01	0,07	-0,13	-0,10
ZDS	0,17	0,15	0,24	0,02	0,07	0,17	0,22	-0,10	0,00	0,17	0,08	0,09	-0,01	0,21	0,72	-0,77	*	-0,24	0,52	0,13	0,03	0,06	0,07	-0,06
ZP	0,10	0,05	0,10	-0,02	0,08	0,18	0,09	0,03	0,06	0,22	0,21	-0,08	-0,10	-0,15	0,20	0,55	-0,24	*	0,16	0,11	-0,01	0,07	-0,09	-0,16
ZPD	0,13	0,14	0,18	0,03	0,15	0,21	0,26	-0,14	0,00	0,33	0,30	-0,04	-0,06	0,02	0,78	-0,06	0,52	0,16	*	0,26	0,06	0,12	0,06	-0,16
ZVD	0,03	0,04	0,04	0,00	0,12	0,09	0,02	0,04	0,06	0,13	0,20	-0,15	0,02	-0,05	0,31	0,11	0,13	0,11	0,26	*	0,31	0,36	-0,04	-0,11
ZVS	0,03	0,04	0,03	0,01	0,00	0,02	-0,02	0,06	0,00	0,01	0,03	-0,03	-0,06	-0,06	0,04	-0,01	0,03	-0,01	0,06	0,31	*	-0,74	0,07	0,00
ZVDS	-0,02	0,00	-0,01	0,00	0,06	0,04	0,03	-0,02	0,04	0,07	0,10	-0,06	0,07	0,03	0,17	0,07	0,06	0,07	0,12	0,36	-0,74	*	-0,09	-0,04
ZBD	0,07	0,05	0,10	0,01	-0,02	0,04	0,06	-0,05	-0,01	0,05	0,12	-0,07	0,06	-0,03	0,00	-0,13	0,07	-0,09	0,06	-0,04	0,07	-0,09	*	0,20
ZBH	-0,03	-0,06	-0,05	-0,02	-0,06	-0,05	-0,08	0,04	0,01	-0,10	-0,09	0,01	0,04	0,04	-0,15	-0,10	-0,06	-0,16	-0,16	-0,11	0,00	-0,04	0,20	*

Příloha 4: Hodnoty znaků pro jednotlivé skupiny (V – východní skupina, J – jižní skupina, CZ – česká podskupina, JSK – jihoslovenská podskupina).

Znak	Taxon	N	Mean	SD	Min	5%	25%	Median	75%	95%	Max
VN	V	63	23,85	15,75	2,50	4,62	10,55	20,70	34,70	54,98	60,70
VN	J	229	33,04	14,14	2,30	12,04	23,30	31,60	42,20	59,40	70,40
VN	CZ	375	35,22	17,59	3,20	13,03	23,30	31,40	43,85	70,21	98,00
VN	JSK	186	44,81	19,96	1,10	11,50	28,85	46,35	59,68	75,25	88,70
VV	V	63	16,53	11,28	1,10	3,21	8,65	13,80	23,75	37,54	48,40
VV	J	229	19,34	13,32	0,00	3,02	9,70	17,30	24,70	46,98	88,90
VV	CZ	375	18,12	11,13	0,00	5,47	11,20	15,80	22,95	37,10	88,60
VV	JSK	186	24,53	16,71	0,00	5,23	12,75	20,45	32,40	59,70	87,20
VC	V	63	40,38	15,14	5,40	20,72	30,25	39,10	48,55	68,84	83,00
VC	J	229	52,37	16,26	21,40	30,70	39,60	51,20	61,50	79,64	135,70
VC	CZ	375	53,34	20,85	8,80	26,77	39,20	48,40	62,85	95,56	144,70
VC	JSK	186	69,34	24,22	13,80	33,25	52,00	67,65	86,20	111,25	139,30
VVC	V	63	0,42	0,26	0,03	0,09	0,22	0,35	0,62	0,86	0,93
VVC	J	229	0,37	0,21	0,00	0,06	0,22	0,33	0,48	0,75	1,00
VVC	CZ	375	0,35	0,17	0,00	0,11	0,23	0,32	0,45	0,68	0,90
VVC	JSK	186	0,36	0,20	0,00	0,08	0,20	0,33	0,46	0,76	0,94
LB	V	63	0,37	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00
LB	J	229	0,42	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00
LB	CZ	375	0,37	0,48	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00
LB	JSK	186	0,38	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00
LD	V	63	6,05	2,21	2,00	3,01	4,35	6,10	7,10	10,53	11,80
LD	J	229	7,24	2,01	2,90	4,54	5,80	6,90	8,40	11,10	14,20
LD	CZ	375	6,99	2,10	2,30	4,20	5,70	6,50	8,20	11,10	16,40
LD	JSK	186	8,63	2,65	3,60	4,90	6,70	8,10	10,50	13,60	16,30
LS	V	63	1,50	0,75	0,50	0,60	0,90	1,20	2,05	2,80	3,20
LS	J	229	1,58	0,69	0,40	0,70	1,10	1,50	2,00	2,96	5,10
LS	CZ	375	1,40	0,60	0,40	0,67	1,00	1,30	1,80	2,40	4,40
LS	JSK	186	1,98	0,71	0,60	0,93	1,50	1,90	2,40	3,20	4,00
LDS	V	63	4,54	1,73	1,65	2,58	3,35	4,17	5,38	6,68	12,20
LDS	J	229	5,24	2,22	2,14	2,72	3,53	4,64	6,46	8,88	16,00
LDS	CZ	375	5,47	1,86	2,58	3,14	4,12	5,17	6,50	8,86	15,67
LDS	JSK	186	4,61	1,39	2,60	3,07	3,64	4,41	5,28	6,85	11,17
LAP	V	63	0,41	0,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	3,00
LAP	J	229	0,11	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	3,00
LAP	CZ	375	0,22	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	4,00
LAP	JSK	186	0,12	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	2,00
UV	V	63	1,29	0,14	0,90	1,10	1,20	1,30	1,40	1,50	1,60
UV	J	229	1,16	0,14	0,70	1,00	1,10	1,20	1,20	1,40	1,60
UV	CZ	375	1,18	0,13	0,70	1,00	1,10	1,20	1,20	1,40	1,60
UV	JSK	186	1,32	0,19	1,00	1,10	1,20	1,30	1,50	1,70	1,80
US	V	63	0,91	0,14	0,60	0,70	0,80	0,90	1,00	1,10	1,30

Znak	Taxon	N	Mean	SD	Min	5%	25%	Median	75%	95%	Max
US	J	229	0,86	0,13	0,40	0,70	0,80	0,80	0,90	1,10	1,30
US	CZ	375	0,90	0,15	0,40	0,70	0,80	0,90	1,00	1,20	1,50
US	JSK	186	0,98	0,19	0,70	0,70	0,80	0,90	1,10	1,30	1,50
UVS	V	63	1,43	0,20	1,00	1,18	1,30	1,40	1,53	1,75	2,00
UVS	J	229	1,36	0,16	0,92	1,11	1,25	1,33	1,50	1,63	1,83
UVS	CZ	375	1,34	0,22	0,91	1,00	1,20	1,33	1,50	1,67	3,00
UVS	JSK	186	1,37	0,16	0,93	1,10	1,25	1,36	1,50	1,63	1,86
VVP	V	63	0,98	0,13	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
VVP	J	229	0,69	0,46	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00
VVP	CZ	375	0,95	0,21	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
VVP	JSK	186	0,89	0,31	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
VZL	V	63	0,95	0,21	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
VZL	J	229	0,92	0,28	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
VZL	CZ	375	0,94	0,24	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
VZL	JSK	186	0,98	0,15	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ZD	V	63	5,12	1,74	1,70	2,91	3,95	4,90	6,15	8,30	9,30
ZD	J	229	5,25	1,22	2,60	3,34	4,40	5,20	6,00	7,20	9,90
ZD	CZ	375	5,50	1,51	1,70	3,20	4,40	5,50	6,50	8,10	10,20
ZD	JSK	186	7,03	1,41	3,00	4,80	6,13	7,00	7,90	9,35	10,90
ZS	V	63	1,43	0,63	0,65	0,75	0,95	1,30	1,80	2,39	3,85
ZS	J	229	1,50	0,50	0,50	0,80	1,15	1,50	1,75	2,33	3,25
ZS	CZ	375	1,29	0,46	0,60	0,75	1,00	1,20	1,45	2,20	4,55
ZS	JSK	186	1,14	0,35	0,50	0,68	0,90	1,10	1,30	1,78	2,80
ZDS	V	63	4,35	2,59	0,88	1,37	2,18	3,78	5,89	8,78	13,29
ZDS	J	229	3,90	1,53	1,12	1,77	2,83	3,76	4,76	6,80	7,87
ZDS	CZ	375	4,68	1,90	1,08	2,15	3,30	4,33	5,79	8,42	11,86
ZDS	JSK	186	6,81	2,71	1,68	3,08	4,69	6,40	8,53	11,86	16,15
ZP	V	63	14,81	2,82	7,00	11,00	13,00	15,00	16,00	19,00	22,00
ZP	J	229	15,08	2,56	9,00	11,00	13,00	15,00	17,00	19,00	23,00
ZP	CZ	375	14,01	2,84	8,00	10,00	12,00	13,00	15,00	19,00	25,00
ZP	JSK	186	14,84	2,32	9,00	11,25	13,00	15,00	16,00	19,00	23,00
ZPD	V	63	2,15	0,63	0,90	1,30	1,75	2,10	2,50	3,29	4,00
ZPD	J	229	1,90	0,39	0,50	1,30	1,60	1,90	2,10	2,60	3,10
ZPD	CZ	375	2,01	0,50	0,70	1,20	1,70	2,00	2,30	2,80	3,60
ZPD	JSK	186	2,48	0,51	1,20	1,70	2,20	2,50	2,80	3,38	4,20
ZVD	V	63	2,36	0,35	1,35	1,82	2,15	2,35	2,60	2,85	3,70
ZVD	J	229	2,63	0,35	1,50	2,07	2,40	2,60	2,80	3,18	3,85
ZVD	CZ	375	2,69	0,37	1,85	2,10	2,40	2,70	2,95	3,30	3,70
ZVD	JSK	186	2,58	0,31	1,60	2,06	2,36	2,60	2,79	3,05	3,35
ZVS	V	63	1,18	0,29	0,68	0,83	0,96	1,13	1,38	1,74	2,15
ZVS	J	229	1,23	0,24	0,68	0,88	1,08	1,20	1,35	1,67	2,50
ZVS	CZ	375	1,26	0,24	0,63	0,90	1,08	1,23	1,41	1,70	2,13
ZVS	JSK	186	1,24	0,25	0,73	0,88	1,08	1,20	1,38	1,63	2,13
ZVDS	V	63	2,08	0,45	1,31	1,48	1,75	2,07	2,39	2,79	3,40
ZVDS	J	229	2,21	0,46	1,22	1,58	1,92	2,19	2,44	3,01	4,39

Znak	Taxon	N	Mean	SD	Min	5%	25%	Median	75%	95%	Max
ZVDS	CZ	375	2,19	0,45	1,05	1,57	1,86	2,16	2,44	3,00	3,75
ZVDS	JSK	186	2,15	0,41	1,32	1,57	1,88	2,09	2,41	2,94	3,56
ZBD	V	63	0,32	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00
ZBD	J	229	0,34	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00
ZBD	CZ	375	0,30	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00
ZBD	JSK	186	0,38	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00
ZBH	V	63	0,08	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00
ZBH	J	229	0,02	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
ZBH	CZ	375	0,03	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
ZBH	JSK	186	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Příloha 5: Hodnoty znaků pro dvě skupiny (Cindu – *Centaurea indurata* subsp. *indurata*, Coxyl – *Centaurea indurata* subsp. *oxylepis*, *označeny průkazné znaky, které odlišují poddruhy).

Character	Taxon	N	Mean	SD	Min	5%	25%	Median	75%	95%	Max
VN*	Cindu	292	31,06	14,96	2,30	8,08	20,43	29,25	41,43	58,63	70,40
VN*	Coxyl	561	38,40	18,94	1,10	12,40	24,30	34,60	51,60	72,40	98,00
VV	Cindu	292	18,73	12,94	0,00	2,98	9,10	17,05	24,55	46,04	88,90
VV	Coxyl	561	20,25	13,57	0,00	5,30	11,60	17,00	25,00	47,40	88,60
VC*	Cindu	292	49,79	16,74	5,40	26,76	37,68	48,55	58,58	78,83	135,70
VC*	Coxyl	561	58,64	23,26	8,80	29,10	41,00	53,70	74,60	100,80	144,70
VVC	Cindu	292	0,38	0,22	0,00	0,06	0,22	0,34	0,50	0,82	1,00
VVC	Coxyl	561	0,35	0,18	0,00	0,10	0,22	0,33	0,45	0,69	0,94
LB	Cindu	292	0,41	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00
LB	Coxyl	561	0,37	0,48	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00
LD	Cindu	292	6,99	2,11	2,00	4,06	5,60	6,70	8,20	11,10	14,20
LD	Coxyl	561	7,54	2,42	2,30	4,30	5,90	7,10	8,90	12,30	16,40
LS	Cindu	292	1,56	0,70	0,40	0,70	1,00	1,40	2,00	2,95	5,10
LS	Coxyl	561	1,60	0,69	0,40	0,70	1,10	1,50	2,00	2,90	4,40
LDS	Cindu	292	5,09	2,14	1,65	2,67	3,50	4,50	6,22	8,83	16,00
LDS	Coxyl	561	5,19	1,76	2,58	3,11	3,91	4,77	6,00	8,67	15,67
LAP	Cindu	292	0,18	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,45	3,00
LAP	Coxyl	561	0,19	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	4,00
UV	Cindu	292	1,19	0,14	0,70	1,00	1,10	1,20	1,30	1,40	1,60
UV	Coxyl	561	1,22	0,17	0,70	1,00	1,10	1,20	1,30	1,60	1,80
US	Cindu	292	0,88	0,13	0,40	0,70	0,80	0,90	1,00	1,10	1,30
US	Coxyl	561	0,92	0,17	0,40	0,70	0,80	0,90	1,00	1,20	1,50
UVS	Cindu	292	1,37	0,17	0,92	1,11	1,25	1,33	1,50	1,71	2,00
UVS	Coxyl	561	1,35	0,20	0,91	1,00	1,22	1,33	1,50	1,63	3,00
VVP*	Cindu	292	0,75	0,43	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
VVP*	Coxyl	561	0,93	0,25	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
VZL	Cindu	292	0,92	0,26	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Character	Taxon	N	Mean	SD	Min	5%	25%	Median	75%	95%	Max
VZL	Coxyl	561	0,95	0,21	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ZD*	Cindu	292	5,22	1,35	1,70	3,16	4,28	5,20	6,03	7,45	9,90
ZD*	Coxyl	561	6,00	1,65	1,70	3,40	4,80	6,00	7,10	8,60	10,90
ZS*	Cindu	292	1,48	0,53	0,50	0,75	1,10	1,45	1,75	2,37	3,85
ZS*	Coxyl	561	1,24	0,43	0,50	0,75	0,95	1,15	1,40	2,05	4,55
ZDS*	Cindu	292	3,99	1,81	0,88	1,62	2,66	3,76	4,92	7,48	13,29
ZDS*	Coxyl	561	5,38	2,42	1,08	2,38	3,62	4,93	6,53	10,24	16,15
ZP*	Cindu	292	15,02	2,62	7,00	11,00	13,00	15,00	17,00	19,00	23,00
ZP*	Coxyl	561	14,29	2,70	8,00	10,00	13,00	14,00	16,00	19,00	25,00
ZPD	Cindu	292	1,96	0,46	0,50	1,30	1,68	1,90	2,20	2,70	4,00
ZPD	Coxyl	561	2,16	0,55	0,70	1,30	1,80	2,20	2,50	3,10	4,20
ZVD	Cindu	292	2,57	0,37	1,35	2,00	2,35	2,60	2,80	3,15	3,85
ZVD	Coxyl	561	2,65	0,36	1,60	2,10	2,40	2,65	2,90	3,25	3,70
ZVS	Cindu	292	1,22	0,25	0,68	0,85	1,05	1,20	1,35	1,68	2,50
ZVS	Coxyl	561	1,25	0,24	0,63	0,90	1,08	1,23	1,40	1,68	2,13
ZVDS	Cindu	292	2,18	0,46	1,22	1,52	1,85	2,16	2,43	3,00	4,39
ZVDS	Coxyl	561	2,18	0,44	1,05	1,57	1,87	2,14	2,43	3,00	3,75
ZBD	Cindu	292	0,33	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00
ZBD	Coxyl	561	0,33	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00
ZBH	Cindu	292	0,03	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
ZBH	Coxyl	561	0,02	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00

Příloha 6: Herbářové položky BP 181346 (vlevo) a BP 181349 (vpravo).

