

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta, katedra botaniky

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



**Genetická variabilita a evoluční vztahy
českých endemických zástupců rodu *Dianthus***

Genetic diversity and evolutionary history of Czech endemic taxa
from the genus *Dianthus*

Diplomová práce

Jana Kalůsková

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jan Suda, Ph.D.

Praha 2012



Hvozdík písečný český (nahore), hvozdík kartouzek (vpravo) a jejich hybrid (vlevo dole)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 27. srpna 2012

Jana Kalůsková

Poděkování

Je mou milou povinností poděkovat všem, kteří mi k vytvoření této práce pomohli radou, sběrem materiálu nebo mi poskytli vhodné a příjemné zázemí pro její zdárné vypracování.

Na prvním místě proto děkuji Honzíkovi za skvělé vedení práce a zejména za jeho přátelství, což rozhodně není vždy standardem.

Za pomoc při molekulárních analýzách děkuji Lence (experimentální část) a Bohoušovi (vyhodnocování).

Za rady nebo jen milou společnost během studia děkuji kamarádům a kolegům, kromě jiných zejména Tomíkovi a Filipovi.

Největší dík patří Petrovi. Jednak za jeho nesmírnou pomoc v terénu a v laborce, za rady a připomínky, kdykoli jsem si jen vzpomněla, ale zejména a nejvíce za to, že stojí po mém boku.

Za skvělé zázemí děkuji svým rodičům.

Za finanční podporu pro vypracování této práce, ale zejména pro práci budoucí, děkuji Grantové agentuře UK (grant 6012/2012).

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá karyologickou, genetickou a fenotypovou variabilitou vybraných taxonů rodu *Dianthus* L. v České republice a sousedních zemích. Důležitou roli v evoluční historii rodu hrálo několik mikroevolučních procesů, jako jsou hybridizace, genomová duplikace či edafická speciace. Tyto procesy vedly ke vzniku velkého množství fenotypově podobných taxonů, které jsou často omezeny na malý areál. V České republice rostou 3 endemické hvozdíky a jeden subendemický. Tyto (pod)druhy posloužily jako modelová skupina pro studium mikroevolučních procesů v malých populacích. Práce se skládá ze tří částí, zabývající se každá jiným evolučním procesem:

- *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus* je kriticky ohroženou endemickou psamofytní rostlinou rostoucí na jediné původní lokalitě v Polábí sympatricky se široce rozšířeným *D. carthusianorum*. Hybridizace byla předpokládána na základě morfologických znaků, ale nebyla nikdy potvrzena jinou metodou. Vzhledem k odlišnému počtu chromozomů obou druhů byla hybridizace detekována pomocí průtokové cytometrie s barvivem DAPI (stanovení relativního obsahu DNA většiny rostliny z lokality). Na karyologicky potvrzených hybridech byly provedeny morfometrické analýzy a, s použitím sekvenace cpDNA, určen směr hybridizace. Výsledky ukázaly, že k hybridizaci dochází, ale kříženci jsou relativně vzácní a jsou z větší části sterilní (absence semen, nízká viabilita pylu) a pravděpodobně se dále nekříží. Srovnání chloroplastových haplotypů ukázalo, že oba směry křížení jsou možné. Jako nejdůležitější diskriminační znak hybridů se ukázal tvar a barva korunních lístků.
- *Dianthus carthusianorum* je pravděpodobně nejvariabilnějším druhem hvozdíku, s několika udávanými infraspecifickými taxony. Tato práce se zabývá čtyřmi poddruhy rostoucími na území střední Evropy, včetně subsp. *sudeticus* (endemit Velké Kotliny) a subsp. *capillifrons* (vázaná na hadcové skalky České republiky a Rakouska). Srovnání velikosti genomu, morfologie a genetické variability (s použitím mikrosatelitů) ukázalo na relativně nízkou diferenciaci studovaných taxonů a do určité míry kontinuální variabilitu, která odpovídá poddruhové úrovni. Další data budou do budoucna potřebná k bližšímu zhodnocení poddruhů.
- Pro druh *Dianthus moravicus* byly udávány dva cytotypy (4x a 6x) včetně smíšených cytotypových populací. Revize této karyologické variability s použitím průtokové cytometrie (barvivo DAPI) však potvrdila pouze výskyt hexaploidního cytotypu ve všech populacích. Předchozí údaje o výskytu tetraploidů byly pravděpodobně chybné.

Klíčová slova: *Dianthus*, endemit, hybridizace, edafická speciace, průtoková cytometrie, morfometrika, mikrosatelity.

Abstract

This MSc. thesis deals with karyological, genetic and phenotypic variation of selected taxa from the genus *Dianthus* L. in the Czech Republic and adjacent countries. The evolutionary history of the genus has been shaped by several microevolutionary processes, including interspecific hybridization, genome duplication, and edaphic speciation. These processes led to the origin of a number of phenotypically similar taxa, which are often restricted to a narrow geographic area. One subendemic and three endemic taxa occur in the Czech Republic. These (sub)species were used as model groups to gain insight into microevolutionary processes in small populations and the postglacial development of the genus in Central Europe. The thesis consists of three parts, each addressing different evolutionary phenomenon:

- *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus* is a critically endangered endemic psammophyte currently known from a single population in Central Bohemia. The site is also inhabited by widespread *D. carthusianorum*. Interspecific hybridization has been suspected on the basis of morphological characters, but this has never been confirmed by any other technique. I exploited differences in the number of chromosomes between both species and, with the aid of DAPI flow cytometry, estimated relative DNA contents of most plants present at the locality. The karyologically-confirmed individuals were subjected to conventional and geometric morphometrics, and the direction of hybridization was assessed using cpDNA sequencing. The results show that although interspecific hybridization does occur, crosses are rare, hybrids have limited reproductive potential (mostly aborted pollen grains, non-viable seeds), and most likely do not backcross to parental species. The comparison of chloroplast haplotypes provided evidence for reciprocal hybridization. Species- and hybrid-specific morphological characters were revealed, the most important of which is corolla shape and colour.
- *Dianthus carthusianorum* L. is perhaps the most variable carnation species, with a number of recognized intraspecific taxa. Four subspecies native to Central Europe were investigated, including subsp. *sudeticus* (endemic to the Jeseníky Mts.) and subsp. *capillifrons* (restricted to serpentine rocks of the Czech Republic and Austria). Similarities in genome size, morphology as well as genetic variation (assessed using microsatellite) indicate low inter-subspecies differentiation and mostly continuous variation. Until more comprehensive investigation is performed, the level of subspecies seems to be justifiable.
- Two cytotypes (4x and 6x) in both ploidy-uniform and mixed populations have been reported in *Dianthus moravicus*. A revision of the karyological variation using DAPI flow cytometry, however, confirmed only the incidence of hexaploid populations, challenging the previous records of ploidy heterogeneity.

Keywords: *Dianthus*, endemic, hybridization, risk assessment, edaphic speciation, flow cytometry, morphometrics, microsatellites

Obsah

Úvod	3
Rod <i>Dianthus</i>	6
Část první: Frekvence a důsledky mezidruhové hybridizace <i>D. arenarius</i>	
subsp. <i>bohemicus</i>	9
<i>Dianthus arenarius</i> L.	10
<i>Dianthus arenarius</i> L. subsp. <i>bohemicus</i> (NOVÁK) O. SCHWARZ.....	12
Rizika hybridizace	14
Terénní práce a odběr vzorků	16
Průtoková cytometrie	17
Metodika	17
Výsledky	18
Analýza haplotypů	21
Metodika	21
Výsledky	23
Zhodnocení fertility hybridů	24
Barvení pylu	24
Metodika	24
Výsledky	25
Počítání semen	26
Výsledky	26
Morfometrika	27
Materiál	27
Klasická morfometrika	28
Metodika	28
Statistické zpracování dat	28
Výsledky	29
Geometrická morfometrika	33
Metodika	34
Výsledky	34
Diskuze	37
Část druhá: Evoluční historie <i>Dianthus carthusianorum</i> ve střední Evropě	45
<i>Dianthus carthusianorum</i> L.	46
Terénní práce a odběr vzorků	50
Průtoková cytometrie	52
Metodika	52
Statistické zpracování dat	52
Výsledky	52
Morfometrika	55
Metodika	55
Statistické zpracování dat	55
Výsledky	56
Analýza mikrosatelitů	64
Metodika	64
Analýza dat	67
Výsledky	68
Diskuze	73
Část třetí: Revize ploidní variability <i>Dianthus moravicus</i>	78
<i>Dianthus moravicus</i> KOVANDA	79

Metodika	81
Výsledky.....	81
Diskuze	83
Závěr	84
Seznam literatury	85
Seznam obrázků.....	97
Seznam tabulek.....	100
Přílohy	102

Úvod

Rod *Dianthus* L. – hvozdík – je taxonomicky velice komplikovanou skupinou, u níž nejruznější speciální procesy (polyploidizace, geografická vikariance, edafická speciace, hybridizace) daly vznik velkému množství blízce příbuzných, fenotypově podobných a často úzce rozšířených taxonů (Meusel et Mühlberg 1978, Tutin et Walters 1993). Nízká morfologická vyhraněnost mnoha druhů naznačuje, že se jedná o skupinu mladou, u níž se speciální události odehrály teprve recentně a pravděpodobně velmi rychle (Valente et al. 2010). Ačkoli například ve šlechtitelství se jedná o velice populární rostliny (celosvětově 2. nejdůležitější rod v květinovém průmyslu, 27 000 registrovaných kultivarů; AIPH/Union Fleurs 1997, Leslie 1983), z biosystematického a taxonomického hlediska jsou hvozdíky velice málo probádané.

Vzhledem k jejich variabilitě a k nedávné rychlé speciaci jsou hvozdíky vhodnou modelovou skupinou pro studium speciálních a mikroevolučních procesů, a to hned na několika úrovních: můžeme jednak studovat sílu reprodukčních bariér u již dobře diferencovaných druhů (studium hybridizace) nebo se naopak zaměřit na druhy s velkou vnitrodruhovou či vnitropopulační variabilitou, které jsou v počátečním stádiu speciace. Konečně, můžeme studovat skokovou speciaci, ke které dochází procesem polyploidizace (v rodu *Dianthus* časté).

Potřebu cíleného studia tohoto rodu v české květeně podtrhuje také fakt, že několik zástupců je endemických. Nepočítáme-li apomiktické taxony, pak mezi cca třiceti českými endemity (v závislosti na taxonomickém pojetí; Gerža 2009, Kaplan 2012) jsou 3 zástupci hvozdíků a další je subendemický. Všechny jsou řazeny do kategorie kriticky ohrožené (C1; Procházka 2001), dva z nich (hvozdík moravský a hvozdík písečný český) jsou navíc součástí celoevropské soustavy NATURA 2000 (Rybka et al. 2004) a pro hvozdík písečný český probíhá záchranný program (Bělohoubek 2008). V minulosti se střeoevropskými hvozdíky podrobněji zabývali F. A. Novák (Novák 1915, 1926, 1927a, 1927b) a M. Kovanda (Kovanda 1980, 1982). Navzdory jejich evoluční zajímavosti i praktickým ochrannářským aspektům, však chybí recentní studie, které by využívaly moderní postupy současné biosystematiky.

V rodu *Dianthus* se většina druhů může vzájemně křížit (Tutin & Walters 1993). K hybridizaci velice pravděpodobně dochází i v naší květeně, např. na NPP Kleneč u Roudnice n. Labem, kde byly pozorovány přechodné morfotypy mezi hvozdíkem písečným českým (*D. arenarius* L. subsp. *bohemicus* (NOVÁK) O. SCHWARZ¹) a hvozdíkem kartouzkem.

Geografická izolace, jež je základním předpokladem pro postupnou (alopatrickou) speciaci, je jedním z hlavních mechanismů vzniku blízce příbuzných taxonů (Coyne & Orr 2004). Tento typ speciace je poměrně málo studován (vzhledem k časovému měřítku stovek až tisíců generací), avšak

¹ Nomenklatura taxonů v celé práci byla sjednocena dle Kubát et al. (2002). V případě taxonů vyskytujících se pouze mimo území ČR pak dle Meusel & Mühlberg (1978).

jednotlivé izolované populace lze zastihnout v různých stádiích vývoje, od populací přizpůsobených místním ekologickým podmínkám (ekotypům) až po jasně vymezené poddruhy či druhy (Briggs & Walters 2001, Coyne & Orr 2004). *Dianthus carthusianorum* L., jehož čtyři české poddruhy se vyskytují kromě nížin a podhůří (subsp. *carthusianorum* a subsp. *latifolius* (GRISEB. et SCHENK) HEGI), kde mají široký kontinuální areál, také izolovaně v horách (subsp. *sudeticus* KOVANDA) či na hadcích (subsp. *capillifrons* (BORBÁS) NEUMAYER), se zdá být vhodnou modelovou skupinou pro studium postupné speciace.

Fenomén polyploidie je u hvozdíků velice rozšířen (Carolin 1957; Kovanda, 1984), zejména pak v sekci *Plumaria* (OPIZ) ASCHERS. et GRAEBN., ke které přísluší také *Dianthus moravicus* KOVANDA, kde jsou jako nejběžnější udávány tetraploidi ($2n = 60$) a hexaploidi ($2n = 90$; Weiss et al. 2002) a najdeme zde i cytotypově smíšené populace (Kovanda 1982, Kmeťová 1985, Weiss et al. 2002). Vzhledem k existenci vnitrodruhové a nezřídka i vnitropopulační variability v ploidním stupni, představují zástupci této sekce vhodnou modelovou skupinu pro řešení otázek týkajících se generování, udržení a evolučních důsledků genomové duplikace v přírodních podmínkách (Balao 2010).

V první části diplomové práce bude podrobně rozebrána problematika hybridizace *D. arenarius* subsp. *bohemicus* s *D. carthusianorum* na jediné původní lokalitě v ČR. Druhá část se bude zabývat variabilitou *D. carthusianorum* ve střední Evropě s důrazem na dva jeho (sub)endemické poddruhy: horský *D. carthusianorum* subsp. *sudeticus* a *D. carthusianorum* subsp. *capillifrons*, který je vázaný na hadcové podloží. Poslední okruh otázek se týká revize cytotypové variability v populacích *Dianthus moravicus*.

K řešení výše nastíněné problematiky byla využita široká škála moderních biosystematických metod – molekulární přístupy (mikrosatelity, sekvenování cpDNA), klasická i geometrická morfometrika (s využitím mnohorozměrných statistických postupů) a průtoková cytometrie (stanovení absolutní velikosti genomu a ploidní úrovně).

Cíle diplomové práce

I. Zhodnocení rizika hybridizace *D. arenarius* subsp. *bohemicus* s *D. carthusianorum*

1. Jak často dochází v přirozených podmínkách k mezidruhové hybridizaci? Existují pouze primární kříženci nebo dochází i ke zpětně hybridizaci?
2. Jaké morfologické vlastnosti vykazují hybridní jedinci? Jaké znaky lze využít pro jejich spolehlivé určení?
3. Jaký je směr křížení (mateřský / otcovský druh)?
4. Jaká je fertilita hybridů a jak vysoké je tedy riziko eroze genofondu?

I. Evoluční historie střeoevropských zástupců druhu *D. carthusianorum*

1. Jsou české (sub)endemické poddruhy *D. carthusianorum* morfologicky diferencované oproti široce rozšířeným poddruhům?
2. Tvoří jednotlivé poddruhy samostatné evoluční linie nebo mezi nimi probíhá genový tok?

II. Revize ploidní variability *D. moravicus*

1. Jaká je cytotypová variabilita v populacích *D. moravicus*? Jak časté jsou v literatuře udávané ploidně-smíšené populace a jaké je v nich zastoupení jednotlivých cytotypů?

Rod *Dianthus*

Rod *Dianthus* L. (hvozdík, Caryophyllaceae) je rozšířen téměř výhradně v temperátních oblastech Eurasie a Afriky, výjimku tvoří šest tropických afrických zástupců a jeden severoamerický druh. Početně se jedná o velice bohatou skupinu čítající, v závislosti na taxonomickém pojetí, cca 300 (mnohdy značně variabilních) druhů (Tutin & Walters 1993). Vysoký a neustálený počet taxonů (zejména pak na vnitrodruhové úrovni) pravděpodobně odráží jak "skutečnou" morfologickou variabilitu této skupiny, tak také zvýšený zájem botaniků o tyto atraktivní rostliny. Hvozdíky jsou nápadné a oblíbené rostliny, u nichž dochází k formálnímu popisování morfologických odchylek (na různých taxonomických úrovních) častěji, než u jiných, méně nápadných, rostlin. Přestože je *Dianthus* druhým největším rodem čeledi Caryophyllaceae (po *Silene* L.), neexistuje recentní monografie nebo uspokojivá vnitrorodová klasifikace. Jediná souhrnná monografie (Williams 1893) obsahuje systém podrodů a sekcí, který však není považován za přirozený (Novák 1927a). Později se pozornost botaniků zaměřila pouze na jednotlivé sekce a skupiny (Novák 1926, 1927a, 1927b a mnoho dalších).

Za vývojové centrum rodu považuje Novák (1927a) severní Írán (pohoří kolem jižního břehu Kaspického moře) a Kovanda (1990) Středozeří na východ po Kavkaz. Centrem diverzity rodu je Mediterán, Kavkaz a Íránská oblast (Tutin & Walters 1993, Meusel & Mühlberg 1978).

Jako většina zástupců čeledi Caryophyllaceae jsou hvozdíky světlomilné (heliofilní) rostliny. Najdeme zde proto zejména skalní, stepní nebo luční druhy, méně často pak lesní či lesostepní (Meusel & Mühlberg 1978). Rostou nejčastěji na minerálně bohatých půdách a vyhýbají se naopak půdám písčitém (h. písčiny tvoří výjimku) a rašelinným. Rohweder (1934) poukazuje na to, že řada diploidních taxonů (*D. seguieri* VILL., *D. superbus* L., *D. deltoides* L.) je citlivých na vápenec, oproti tomu odvození polyploidů mají méně vyhraněné nároky na půdní reakci a rostou na méně úživných půdách. Vápnomilné zástupce hvozdíků najdeme u skalních a suťových druhů jako jsou *D. alpinus* L., *D. sternbergii* SIEBER ex CAPELLI, *D. plumarius* L. a *D. liburnicus* BARTL. & H.L.WENDL.).

Druhy rodu *Dianthus* jsou nejčastěji vytrvalé byliny, vzácněji jednoletky nebo dvouletky. Listy jsou přisedlé nebo krátce řapíkaté, čárkovité až vejčité kopinaté, na okraji většinou drsné, na bázi pochvaté. Květy jsou v květenstvích různého typu (vidlany, hrozny, laty, strboulovité svazečky), nebo jednotlivé. Kalich je trubkovitý, řidčeji úzce lahvicovitý nebo nálevkovitý, pětizubý, hustě žilnatý, na bázi s 1-3 páry podkališních listěnců; čepel korunních lístků zubatá, vroubkovaná, vyhlodaná nebo dřípená, vzácně celokrajná, lysá nebo na líci chlupatá a vousatá, červená, růžová nebo bílá, vzácně (u kulturních odrůd) žlutá; nehet zděli nebo delší než kalich, bělavý nebo zelenavý; tyčinek 10; semeník jednopouzdrý, se dvěma čnělkami. Tobolka vejčité válcovitá, vzácně vejcovitá, jednopouzdrá, zděli nebo delší než kalich, otevírající se čtyřmi zuby. Semena štítkovitá, v obrysu

nepravidelně obvejčitá nebo vejčitá, s oboustranně vyniklým středním žebrem, tmavohnědá. Embryo přímé. Rostliny jsou entomogamní (Kovanda 1990).

U druhů rodu *Dianthus* (podobně pak třeba i u *Silene*) často najdeme jedince se zakrnělými tyčinkami. Prašníky jsou v takovém případě maximálně 1 mm velké a obsahují velmi málo nebo žádný vyvinutý pyl (Meusel & Mühlberg 1978). Pokud se toto týká všech květů na jednom jedinci, mluvíme o gynodioecii, pokud jen části z nich, pak se jedná o gynomonoeicii. V praxi se tak v populaci setkáváme se třemi typy květů: (i) hermafroditní květy, (ii) květy se zakrnělými prašníky a (iii) květy pouze samičí, s nápadně dlouhými bliznami (Kovanda 1990; vlastní pozorování; viz také obr. 10). Rostliny se zakrnělými prašníky nebo bez nich mívají v průměru menší květy (Rohweder 1934). U gynodioeckých druhů bývá v průměru $\frac{1}{4}$ rostlin samičích (Rohweder 1934).

Jak napovídá morfologie jejich květů (kalich srostlý v dlouhou trubku), jsou hvozdíky úzce specializovaní na opylovače s dlouhým sosákem – na motýli (Lepidoptera; Bloch et al. 2006). Samosprašení je obvykle zabráněno díky proterandrii², nicméně může k němu dojít tak, že se blizny stočí zpět na konci doby kvetení (Bloch et al. 2006).

Základní chromozomové číslo rodu je $x=15$ (Carolin 1957). Chromozomy jsou malé, což značně ztěžuje jejich počítání (Carolin 1957; Meusel & Mühlberg 1978). V rodu *Dianthus* je polyploidie častá, ale vyskytuje se nepravidelně napříč sekcemi. Zatímco v sekcích *Armerium* WILLIAMS³, *Carthusianorum* BOISS., *Suffruticosae* WILLIAMS a v subsekcí *Alpini* VIERHAPPER ze sekce *Barbulatum* WILLIAMS se vyskytují jen diploidní druhy ($2n = 30$), sekce *Plumaria* je na polyploidy bohatá (Meusel & Mühlberg 1978). Nejčastější jsou zde tetraploidi ($2n = 60$) a hexaploidi ($2n = 90$; Weiss et al. 2002) a najdeme tu i nejdelší dosud udávanou polyploidní řadu v rodu *Dianthus*, a to u druhu *D. broteri* BOISS. & REUTER, který má 5 stupňů ploidie včetně dodekaploidů (Balao 2009). Carolin (1957) celkem udává pro rod *Dianthus* 67% diploidních, 18,7% tetraploidních a 6,6% hexaploidních druhů, zbylých 7,7% představuje vyšší ploidie. Výjimkou v této sekci není ani vnitrodruhová ploidní variabilita, ze 17 druhů má 13 více stupňů ploidie, z toho u pěti druhů najdeme smíšené cytotypové populace (Weiss et al. 2002). Pravděpodobným mechanismem vzniku těchto polyploidů je autopolyploidizace (Weiss et al. 2002).

Systematiku celého rodu komplikuje také častý výskyt mezidruhových hybridů (Carolin 1957). Přesto, že k hybridizaci může docházet mezi většinou druhů, vzniklí kříženci se liší ve fertilitě. Carolin (1957) přehodnotil systém sekcí tak, aby druhy, jejichž hybrid je fertilní, byly v jedné sekci a naopak druhy, jejichž hybrid je sterilní, byly v odlišných sekcích. K hybridizaci dochází i mezi druhy odlišné ploidie, ale fertilita vzniklých hybridů je omezená (Carolin 1957).

² Proterandrie (prvoprašnost) – dozrávání tyčinek v květu dříve, než dozrávají pestíky s bliznami, tj. až po vyprášení pylu.

³ Sekce dle Meusel & Mühlberg (1978)

V české květeně najdeme (vedle řady pěstovaných)10 přirozeně rostoucích zástupců tohoto rodu: *Dianthus deltoides* (hvozdík kropenatý), *D. superbus* (h. pyšný), *D. lumnizeri* WIESB. (h. Lumnitzerův), *D. gratianopolitanus* VILL. (h. sivý), *D. arenarius* (h. písčiny), *D. armeria* L. (h. svazčítý), *D. carthusianorum* (h. kartouzek), *D. pontederiae* KERNER, *D. sylvaticus* HOPPE a *D. moravicus* (h. moravský). Nejběžnější jsou druhy *D. deltoides* a *D. carthusianorum*.

Část první:

**Frekvence a důsledky mezidruhové *hybridizace*
D. arenarius subsp. *bohemicus***

Dianthus arenarius L.

Dianthus arenarius – hvozdík písečný – patří do sekce *Plumaria*, která je charakterizována trsnatým růstem s četnými sterilními listovými růžicemi a vonnými květy s více či méně hlubokými dřípenými úkrojky korunních lístků. Detailněji se sekci věnoval v několika pracích F. A. Novák (Novák 1915, 1926, 1927a, 1927b), jenž také popsal některé dnešní poddruhy hvozdíku písečného.

Hvozdík písečný je vytrvalá trsnatá bylina se štíhlou lodyhou a čárkovitými listy. Květy jsou bílé a vonné, do poloviny dřípené a nejčastěji po jednom. Podkališní listence jsou široce vejčité až obvejčité, do ¼ délky kalicha, často s krátkou osinkou (přehled znaků poddruhů viz tab. 1).

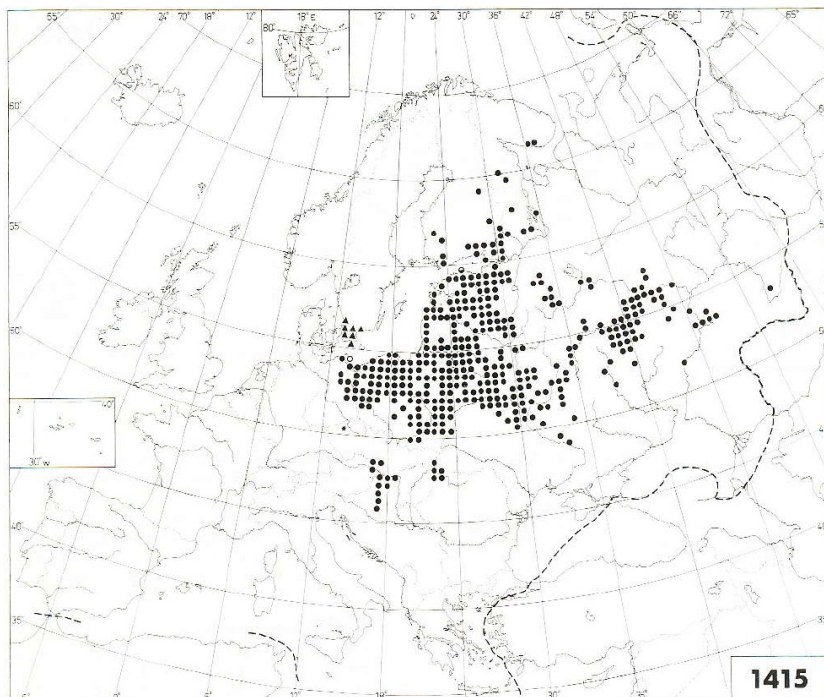
Tab. 1: Přehled znaků pro jednotlivé poddruhy *Dianthus arenarius* (podle Tutin & Walters 1993 a Kovanda 1990)

poddruh	lodyha	výška lodyhy (cm)	spodní listy	šířka list (mm)	kalich (mm)	délka čepele korunních lístků (mm)	počet květů
<i>arenarius</i> L.	trávově zelená, nevětvená	10-20	tupě zakončené		20 mm dlouhý		±1
<i>borussicus</i> (VIERH.) KLEOPOW	trávově zelená, větvená	>20	krátké, zašpičatělé až dlouze špičaté	0.5	20-25 × 3 mm	< 10	≥1
<i>pseudoserotinus</i> (BLOCKI) TUTIN	sivá, větvená	>20	dlouhé, zašpičatělé až dlouze špičaté	1	20 × 4-4.5 mm	15	1-3
<i>pseudosquarrosus</i> (NOVÁK) KLEOPOW	sivá, větvená	>20	dlouhé, dlouze zašpičatělé a zahnuté	1	22-30 × 3 mm	15	(1-)3-24
<i>bohemicus</i> (NOVÁK) O. SCHWARZ	sivá	8-12	krátké, špičaté	1-2	25-28 mm	13-15	±1

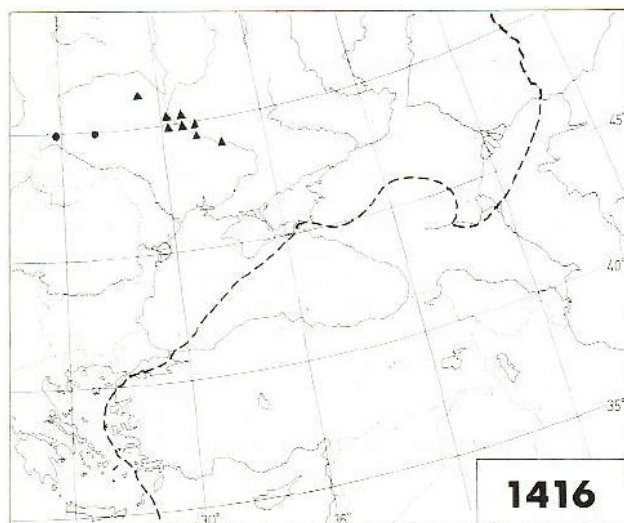
Jedná se o taxonomicky složitý komplex, který se ve svém areálu rozpadá na pět poddruhů rozšířených od střední Evropy přes jižní Švédsko, Finsko a pobaltské republiky až do Běloruska, na Ukrajinu a do západního Ruska (obr. 1 a 2; Jalas & Suominen 1986, Meusel et al. 1965, Tutin & Walters 1993). Nejvíce rozšířena je subsp. *borussicus* (VIERH.) KLEOPOW, jejíž areál se téměř shoduje s areálem celého druhu. Naproti tomu nominátní subsp. *arenarius* je omezena na jižní Švédsko, subsp. *pseudoserotinus* (BLOCKI) TUTIN roste na západní Ukrajině a subsp. *pseudosquarrosus* (NOVÁK) KLEOPOW na západě Ruska a na střední Ukrajině. Poslední poddruh - subsp. *bohemicus* - roste izolovaně od ostatních na jediné lokalitě v českém termofytiku.

Jako vývojové centrum druhu *D. arenarius* uvádí F. A. Novák západní Ukrajinu a severní Rumunsko, kde vznikl pravděpodobně v postglaciálu, a odkud se šířil na sever za ustupujícími ledovci (Novák 1927a, 1927b). Do Čech pravděpodobně pronikl Lužickou nebo Broumovskou kotlinou.

Později, vlivem méně příznivých podmínek, na mnoha místech vyhynul a v České republice se tak dnes vyskytuje pouze u Roudnice n. Labem. Jedná se o postglaciální relikv sarmatské květeny (Novák 1927b). Migrační cesta hvozdíku písečného a jeho šíření do Čech je však prozatím spekulací, která nebyla potvrzena, ovšem ani vyvrácena (Kovanda 1986, Čeřovský 1992).



Obr. 1: Rozšíření *D. arenarius* subsp. *borussicus* (kolečko), subsp. *arenarius* (trojúhelník) a subsp. *bohemicus* (hvězdička; převzato z Jalas & Suominen 1986).



Obr. 2: Rozšíření *D. arenarius* subsp. *pseudoserotinus* (kolečko) a subsp. *pseudosquarrosus* (trojúhelník) na Ukrajině (převzato z Jalas & Suominen 1986).

***Dianthus arenarius* L. subsp. *bohemicus* (NOVÁK) O. SCHWARZ**

Dianthus arenarius subsp. *bohemicus* – hvozdík písečný český – je vytrvalou bylinou vytvářející husté trsy sivozelených čárkovitých listů. Zřetelně stopkaté vonné květy vyrůstají zpravidla jednotlivě a mívají hluboce dřípené, nejčastěji čistě bílé čepele korunních lístků (obr. 3; Kovanda 1990). Jedná se o výrazně světlo milný druh rostoucí v nezapojených travinných společenstvech v rámci kostřavových trávníků písčin (diagnostický druh svazu *Koelerion glaucae*; Kovanda 1990, Chytrý 2007), v doprovodu dalších psamofytických druhů.

Z poddruhů hvozdíku písečného je rostlinám z roudnických písčin geograficky nejpodobnější subsp. *borussicus*, která roste nejbliže v Německu a Polsku. Od ní se subsp. *bohemicus* liší jen sivozeleným zbarvením lodyh a listů, nižšími, většinou jednokvětými lodyhami a podkališními listenci většinou s nasazenou špičkou. Ostrá hranice však mezi oběma taxony není: sivost je značně nestálým znakem a dá se snadno ovlivnit prostředím (v zástinu slábne nebo úplně mizí), nízké jednokvěté rostliny se vyskytují i v populacích subsp. *borussicus* (např. v okolí Toruně) a ani tvar listenců není vždy spolehlivým vodítkem (Kovanda 1986). Jednokvětost je kromě toho charakteristickým znakem rostlin ze Švédska a Finska (subsp. *arenarius*, Tutin & Walters 1993), sivozelené zbarvení je typické i pro rostliny z Ukrajiny (subsp. *pseudoserotinus* a subsp. *pseudosquarrosus*, Tutin & Walters 1993), u nichž se také občas vyskytnou podkališní listence stejného tvaru jako u subsp. *bohemicus* (Kovanda 1986). Ačkoliv je subsp. *bohemicus* stenoendemitem izolovaným od ostatních poddruhů, jeho původ a vztah k ostatním poddruhům nebyly nikdy zhodnoceny s využitím moderních biosystematických metod.



Obr. 3: *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus*.

Dianthus arenarius subsp. *bohemicus* patří k nemnoha endemickým taxonům naší flóry. Je zákonem chráněn v kategorii kriticky ohrožených druhů (C1) a pod stejným stupněm ohrožení je uveden i v červeném seznamu cévnatých rostlin (Čeřovský et Abtová 1999, Procházka 2001). Mimo to se jedná o prioritní druh soustavy NATURA 2000 (Rybka et al. 2004) a je jedním z pěti rostlinných druhů, pro které byl schválen záchranný program (Bělohoubek 2008).

Vyskytuje se pouze v Polabí u Roudnice nad Labem na písčítých stráních na jedné původní lokalitě u obce Kleneč (chráněna jako Národní přírodní památka Kleneč) a na jedné uměle založené u Kyškovic (VKP Stráž Na Kamenici; Čeřovský et Abtová 1999, Bělohoubek 2008). V minulosti byl *D. arenarius* subsp. *bohemicus* více rozšířen; kromě jediné dnešní původní lokality u Kleneče se vyskytoval minimálně ještě u obce Vražkov. Po upuštění od tradičního extenzivního hospodaření

(pastvy) však byly zdejší plochy ve 40. letech 20. století osázeny akátem a borovicí. Tyto stanovištní změny a těžba šterkopísku měly za následek prudký úbytek jedinců a zánik lokality u Vražkova, kde byl hvozdík naposledy zaznamenán v roce 1955 (Kovanda 1986). Absencí managementu, zejména pastvy, docházelo k zapojení porostu, ve kterém semena hvozdíku špatně klíčí a populace postupně stárnula (Bělohoubek 2008). Od 70. let minulého století se proto na klenečské lokalitě vystřídala celá řada ochranných opatření ve snaze populaci hvozdíku udržet a dále posílit: odstraňování náletových dřevin, chemické ošetřování proti jejich zmlazování, kosení, odplevelování i cílený výsev semen. I přes tyto zásahy přežívala počátkem 90. let na Klenči jen stárnoucí populace asi dvou set trsů bez semenáčků. Nejefektivnějším zásahem byla až jednorázová velkoplošná stržení drnu v letech 1999, 2009 a 2010. Po tomto zásahu se populace rozrůstala a zmlazovala, díky uchycení semenáčků v disturbovaném porostu. Vedle toho zde probíhají i další managementová opatření s cílem posílit druh (seč, vyhrabávání mechu, okopávání trsů, apod). Každoročně prováděná sčítání ukazují, že počet jedinců h. písečného českého na NPP Kleneč v současné době již překročil 2 tisíce (záchranné programy [online]).

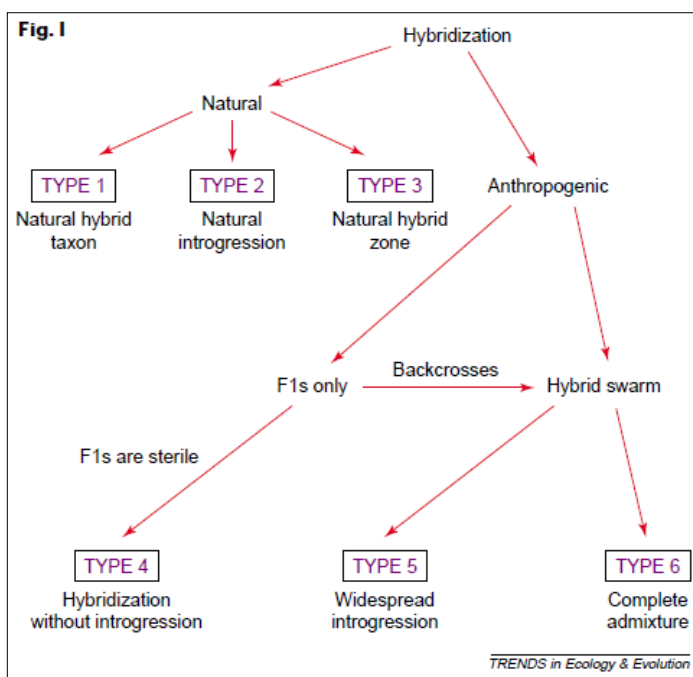
Populaci se tak sice daří různými zásahy posilovat, nicméně je zde další nedostatečně prozkoumané a podceňované potenciální nebezpečí, a tím je hybridizace. *D. arenarius* subsp. *bohemicus* se na NPP Kleneč vyskytuje společně s hvozdíkem kartouzkem (*Dianthus carthusianorum*). Hvozdíky mají obecně relativně slabé reprodukčně-izolační bariéry a v místech, kde roste sympatricky více druhů, se velmi často kříží (Carolin 1956, Tutin et Walters 1993). Poprvé na rostliny s růžovou korunou jako na mezidruhové hybridy poukazuje F. A. Novák (Novák 1915, 1927b), ale neudává jejich četnost. Podobně si růžových jedinců všiml i Kováč (1996), který se zabýval explantátovými kulturami ohrožených druhů rostlin. Toman (1986, 2000) uvádí i odhady četnosti: v roce 1972 napočítal růžových jedinců na lokalitě 13%; 25% jedinců mělo na bázi čepele korunního lístku červenou skvrnu, které u poloviny jedinců bylo doplněno růžovým středem a 32% jedinců mělo na bázi čepele růžové brvy. Vzhledem ke kombinaci těchto znaků u některých jedinců dospěl k počtu 38% jedinců s čistě bílými květy, na základě čehož usuzuje, že hybridizace je v populaci rozsáhlá (a nevylučuje ji dokonce ani u čistě bílých jedinců; Toman 1986, 2000). Hybrid hvozdíku kartouzku a hvozdíku písečného je nazýván *Dianthus × lucae* ASCHERS. (Kovanda 1990) a byl popsán z Německa (Meusel & Mühlberg 1978). Křížence z Klenče Novák označil jako *Dianthus carthusianorum × arenarius* var. *bohemicus* (Novák 1915, 1927b), uvádí se i jméno *Dianthus × novakii* (GRAEBN.) NOVÁK (Novák 1927b). Přestože však jsou kříženci mezi hvozdíkem písečným českým a hvozdíkem kartouzkem v literatuře zmiňováni již téměř sto let, doposud nebyla jejich přítomnost (ani četnost) ověřena moderními biosystematickými metodami. Hybridizace tak může představovat závažné riziko oslabení a genetické eroze už tak kriticky ohroženého klenečského hvozdíku (Čeřovský 1992).

Rizika hybridizace

Hybridizace je uznávána jako jeden z důležitých mechanismů generujících variabilitu a majících tedy významnou roli ve speciaci (Hegarty & Hiscock 2005, Wissemann 2006). Hybridizace však nemusí mít pouze speciální efekt, ale (pravděpodobně častěji) může též znamenat riziko pro integritu blízkce příbuzných druhů (Rhymer & Simberloff 1996, Wolf 2001, Levin et al. 1996, Prentis et al. 2007). Nejčastěji dnes o problémech spojených s hybridizací slyšíme v kontextu nepůvodních či invazních druhů (Abbott 1992, Levin et al. 1996, Rhymer & Simberloff 1996, Krahulcová et al. 1996, Prentis et al. 2007), k potížím však může docházet i při hybridizaci mezi původními druhy, které rostly do té doby allopatricky či parapaticky. Hlavní nebezpečí hybridizace a s ní spojené eroze genofondu tkví ve skutečnosti, že se často jen obtížně zjišťuje a může tak být dlouhou dobu neodhalena. Provádění ochranných opatření v takových případech bývá komplikované (z naší květeny jmenujme např. případ *Cerastium alsinifolium* TAUSCH; Seifertová 2009, Vít et al. in prep.).

Zda hybridizace povede k vymření rodičovského druhu nebo zůstane omezena na úzkou oblast, závisí na síle a typu reprodukčních bariér (citace) mezi danými druhy. Existuje tak několik situací, kterými může hybridizace ohrozit existenci vzácnějšího rodiče (obr. 4). Buď jsou hybridy fertily a jejich prostřednictvím tak může docházet zpětným křížením k přenosu genů mezi druhy (introgresivní hybridizace), což negativně ovlivňuje druhovou integritu rodičů (např. Krahulcová et al. 1996,

Rhymer & Simberloff 1996). Jsou-li vzniklí hybridy navíc vitálnější nežli rodičovské druhy (nebo alespoň jeden z nich), postupně mohou na stanovištích převládnout (Bleeker 2007, Seifertová 2009). Avšak ani v případě, že kříženci jsou sterily a vitalitou nepřevyšují rodičovské druhy, nelze jejich přítomnost podceňovat. Problematický totiž může být i stav, kdy kříženci opakovaně vznikají s vyšší četností, a svojí přítomností následně snižují počet možných reprodukčních partnerů rodičovských druhů a tím negativně ovlivňují populační dynamiku (*demographic swamping*; Wolf et al. 2001). Počítačové simulace ukazují, že hybridizace je možná nejrychleji působící genetická hrozba pro



Obr. 4: Základní typy hybridizace (převzato z Allendorf et al. 2001). Kategorie 1-3 představují přirozenou hybridizaci, kategorie 4-6 antropogenní. Jednotlivé kategorie se liší ve svých důsledcích a také v ochrannářském pojetí.

ohrožené druhy; k extinkci může dojít již za méně než 5 generací, na rozdíl od více než 100 generací v případě extinkce v důsledku naakumulovaných mutací (Wolf et al. 2001).

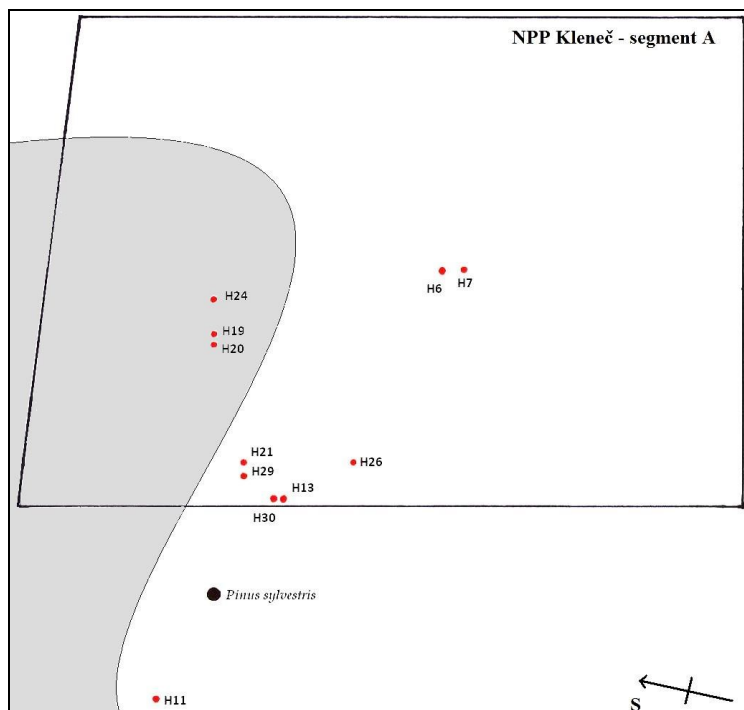
V rodu *Dianthus* se většina druhů může vzájemně křížit, v přírodě je tomu zabráněno zejména geografickou a ekologickou izolací jednotlivých taxonů. Tam, kde však roste více druhů pohromadě, je hybridizace poměrně častá (např. v Pyrenejích; Tutin & Walters 1993). V Květeně ČR najdeme celkem 4 hybridy, přičemž nejčastějším je kříženec *D. armeria* L. x *deltoides* L. (Kovanda, 1990).

Terénní práce a odběr vzorků

Dianthus arenarius subsp. *bohemicus* má v současnosti 2 lokality: NPP Kleneč a VKP Stráň Na Kamenici v Kyškovicích (uměle založená). Na lokalitě v Kyškovicích se *D. carthusianorum* nevyskytuje, navíc tato populace vznikla výsadbou pěti jedinců z klenečské lokality, proto probíhal výzkum hybridizace jen na lokalitě NPP Kleneč. Pro sběr *D. arenarius* subsp. *bohemicus* byla získána výjimka (viz příloha).

Vzorky byly na lokalitě NPP Kleneč odebrány v průběhu května až srpna v letech 2009-2011. Odebraným vzorkem byla kvetoucí lodyha, případně několik listů navíc z téhož trsu. Materiál byl použit na cytometrické, molekulární a morfometrické analýzy a odhady životaschopnosti pylu. Vzhledem k postupnému nakvétání byla lokalita navštívena v průběhu sezóny opakovaně. V srpnu pak byly odebrány tobolky ke zjištění počtu vyvinutých semen.

Při sběrech byl kladen důraz na detekci hybridů. V první fázi tak byl proveden rozsáhlý populační screening (přes 900 jedinců). Později byly vybírány cíleně jen rostliny, u nichž bylo podezření, že se může jednat o hybridy. Dále byli sbíráni morfologicky jednoznačně determinovatelní jedinci od obou rodičovských druhů. Každý zjištěný hybridní trs byl označen barevným hřebíkem s nesmyvatelným číslem pro jeho snadnou detekci v budoucnu. Pozice hybridů na lokalitě byla zaznamenána do mapky (obr. 5 a 6). Herbářové položky hybridních jedinců a několika jedinců rodičovských taxonů budou uloženy do herbářových sbírek Univerzity Karlovy (PRC).



Obr. 5: Schéma části lokality NPP Kleneč s vyznačenými hybridy. Oblast, kde se nejvíce vyskytuje *D. carthusianorum* je vyznačena šedě; *D. arenarius* subsp. *bohemicus* je po celé ploše segmentu A, nejvíce ale v jeho střední části (na okrajích chybí). Velikost segmentu A je 30x40m.



Obr. 6: Upravený letecký snímek NPP Kleneč (www.mapy.cz). Segment A je vyznačen červeně.

Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metodou s množstvím aplikací široce používanou v medicíně i přírodních vědách. V posledním desetiletí se čím dál častěji uplatňuje i při studiu rostlin, kde se využívá ke stanovení DNA ploidního stupně (Suda et al. 2006), absolutní velikosti genomu a k určení reprodukčních způsobů (zejména u agamických komplexů; Krahulcová & Rotreklová 2010). Principem průtokové cytometrie je měření optických vlastností (fluorescence) jader izolovaných z buněk a obarvených fluorescenční barvou. Výběr fluorescenční barvy (a jemu odpovídajícího excitačního zdroje přístroje) se odvíjí od typu požadované informace: zatímco barvivo propidium jodid se vmezuje do dvoušroubovice DNA a je tedy vhodné pro měření absolutní velikosti genomu, barvivo DAPI se váže preferenčně na A a T báze, výsledkem je tedy údaj o relativní velikosti genomu a hodí se pro určení stupně ploidie. Průtoková cytometrie si získala svou oblibu díky rychlé přípravě vzorků (oproti počítání chromozomů), nízké ceně a malému množství potřebného pletiva (hodí se proto pro vzácné druhy), které zároveň nemusí být mitoticky aktivní. Zároveň však karyologické studie zcela nenahrazuje, neboť jejím předpokladem je známý počet chromozomů, který lze získat právě jen jejich spočtením. Také potřeba čerstvého materiálu není vždy nutná, pro měření ploidního stupně někdy stačí i mladší herbářové položky (Suda & Trávníček 2006) nebo materiál konzervovaný v glycerolu (Kolář et al. 2012).

Výstupem cytometrických analýz jsou histogramy, kde na ose x je relativní fluorescence částic (v tomto případě jader) a na ose y počet těchto částic. Pro určení velikosti genomu jsou vzorky měřeny společně s interním standardem o známé velikosti genomu. Kvalitu analýz indikuje variační koeficient (CV), který by měl být nižší než 3% (Doležel et al. 2007).

Vzhledem k odlišné ploidii studovaných rodičovských druhů lze mezidruhového hybrida snadno a spolehlivě detekovat právě díky průtokové cytometrii: *D. arenarius* je tetraploidní ($2n=4x=60$; Kovanda 1984), *D. carthusianorum* diploidní ($2n=2x=30$; Löve 1982), předpokládá se tedy, že výsledný hybrid bude triploidní ($2n=3x=45$).

Metodika

Jako interní standard byla použita sedmikráska chudobka (*Bellis perennis* L.), jejíž velikost genomu je blízká studovaným taxonům ($2C=3,38$ pg; Schönswetter et al. 2007).

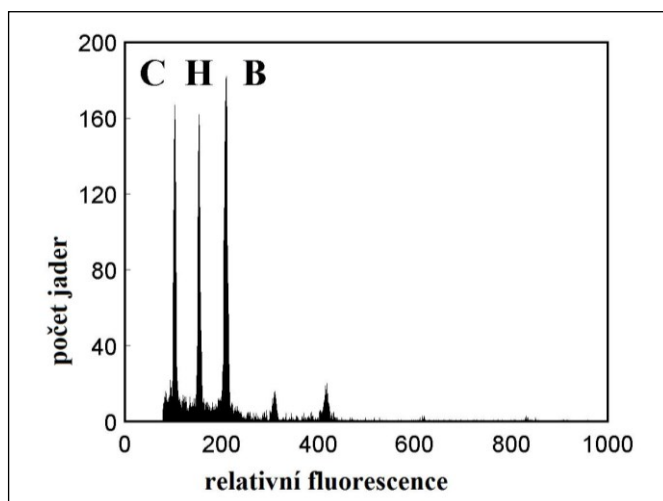
Příprava vzorků a jejich následná analýza probíhala podle zavedeného protokolu používaného v cytometrické laboratoři Botanického ústavu AV ČR v Průhoncích i na katedře botaniky PřF UK v Praze (Doležel et al. 2007): cca 1 cm listu hvozdíku (v případě směsných analýz poměrově méně) spolu se stejným objemem listu standardu byl rozsekán žiletkou v Petriho misce v 0,5 ml vychlazeného pufru Otto I (0,1 M monohydrát kyseliny citrónové, 0,5% Tween 20; Otto 1990). Poté

byl vzorek přefiltrován do zkumavky přes 42 μ m nylonový filtr. Po krátkém čase inkubace (několik minut) byl přidán 1 ml barvicího roztoku, který se skládá z pufru Otto II (0,4M Na₂HPO₄ · 12 H₂O; Otto 1990) fluorescenčního barviva DAPI (4 μ g/ml; Sigma) a antioxidantu β -mercaptoethanolu (2 μ l/ml; Sigma). Analýzy probíhaly na přístroji Partec PA II s rtuťovou UV výbojkou v Laboratoři průtokové cytometrie v BÚ AV ČR Průhonice (v letech 2008-2009) a na přístroji Partec ML vybaveném UV diodovým chipem na katedře botaniky v Cytometrické laboratoři PřF UK (v letech 2010-2011). Analýza histogramů byla provedena v programu Partec FloMax 2.4b.

Hvozdíky nepředstavují z cytometrického hlediska problematický materiál, tj. neobsahují významné množství sekundárních metabolitů a slizových látek, které by komplikovaly přípravu vzorku a vytvářely pak „pozadí“ ve výsledných analýzách, a zároveň zde není běžná aneuploidie (Carolin 1957, Weiss et al. 2002, Löve 1982).

Výsledky

V první fázi byl proveden podrobný screening téměř celé populace. Celkově tak bylo změřeno 944 rostlin. Tento screening neodhalil žádné hybridy, což mohlo být způsobeno tím, že byl prováděn ve sterilním stavu (nebyli vybíráni fenotypově přechodní jedinci) a nebylo také vždy možné dostatečně dobře odlišit jednotlivé trsy prorůstající do sebe. Dále byly cíleně vybírány rostliny, u nichž se na základě fenotypu mohlo jednat o hybridy (různá míra růžového zbarvení koruny, červené skvrny či chlupy na bázi korunních lístků). Tímto způsobem bylo při



opakovaných návštěvách v průběhu tří let nasbíráno 39 morfologicky nejednoznačných rostlin, z nichž 11 bylo potvrzeno jako hybridy (obr. 7 a 8). Jejich pracovní označení v terénu a v následujícím textu je: H6, H7, H11, H13, H19, H20, H21, H24, H26, H29 a H30.

Kontrolní měření rodičovských druhů potvrdilo, že *D. arenarius* subsp. *bohemicus* je tetraploidní (téměř 1000 analyzovaných rostlin) a *D. carthusianorum* je diploidní (20 analyzovaných rostlin na lokalitě NPP Kleneč a 733 jedinců ze 69 lokalit z České republiky, Slovenska a Rakouska; viz část o *D. carthusianorum*).

Dále byly analyzovány všechny semenáčky v okolí hybridních mateřských rostlin (do cca 40 cm), s cílem zjistit, zda se v jejich blízkosti nevyskytuje větší koncentrace kříženců (v časných ontogenetických stádiích). Celkově se jednalo o 11 semenáčků v okolí 5 mateřských hybridních rostlin. Hybridní původ však nebyl prokázán u žádného z nich.



Obr. 8: Variabilita *D. arenarius* subsp. *bohemicus* (vlevo rostlina s červenými skvrnami a brvami na bázi čepele korunního lístku; vpravo jedinec s růžovými korunními lístky). Oba jedinci vykazují obsah jaderné DNA typický pro *D. arenarius*.

Absolutní velikost genomu byla změřena u 3 náhodně vybraných jedinců *D. carthusianorum*, 4 jedinců *D. arenarius* subsp. *bohemicus* a 9 hybridů. Naměřené velikosti genomu shrnuje tabulka 2.

Tab. 2: Absolutní velikosti genomu (v pikogramech DNA) studovaných taxonů. N = počet analyzovaných jedinců, 2C = obsah DNA nereplikovaných somatických buněk, Cx = obsah DNA monoploidní sádky, S. D. = směrodatná odchylka jednotlivých měření, CV = variační koeficient píků vzorku.

	N	průměrná 2C hodnota (pg DNA)	SD	průměrné CV	Cx
<i>D. carthusianorum</i>	3	1.01	0.01	2.91	0.51
<i>D. arenarius</i> subsp. <i>bohemicus</i>	4	2.17	0.02	2.70	0.54
hybrid	9	1.58	0.02	2.82	0.53

Na základě změřených velikostí genomu rodičovských druhů (tab. 2) byly vypočteny C-hodnoty pro další teoreticky možné hybridní kombinace (tab. 3). Velikost genomu potenciální hybridní kombinace 2B + 2C (účast neredukované gamety *D. carthusianorum* a redukované gamety *D. arenarius* subsp. *bohemicus*) se od genomu *D. arenarius* subsp. *bohemicus* liší o 3,2%, což je na hranici rozlišení průtokového cytometru. Ostatní kombinace jsou naproti tomu bez problému odlišitelné, ale žádná z nich nebyla v průběhu měření zaznamenána.

Tab. 3: Velikost genomu skutečné a teoretických hybridních kombinací. B = gameta *D. arenarius* subsp. *bohemicus*; C = gameta *D. carthusianorum*.

	kombinace gamet	2C
hybrid z terénu	2B+1C	1,58
teoretičtí hybridy	2B+2C	2,10
	4B+1C	2,68
	4B+2C	3,19

Analýza haplotypů

Chloroplastová DNA (cpDNA) je kruhovou molekulou, složenou z kódujících i nekódujících úseků DNA. Díky své značné konzervovanosti je cpDNA univerzálně použitelná pro studium všech cévnatých rostlin s použitím univerzálních primerů. Chloroplastová DNA má proto široké využití při studiu fylogeneze rostlin: méně variabilní kódující úseky se uplatňují pro fylogenezi vyšších taxonomických skupin (např. Palmer et al. 1988, Olmstead & Palmer 1994), variabilnější nekódující úseky se využívají naopak na nižší taxonomické jednotky (Taberlet et al. 1991, Shaw et al. 2005, 2007).

Výhoda použití cpDNA pramení kromě možnosti použití univerzálních primerů také z toho, že jde o haploidní molekulu, která se ve většině případů dědí uniparentálně (u krytosemenných rostlin je to pak nejčastěji po mateřské linii; Harris & Ingram 1991). Díky tomu je možné úseky cpDNA namnožené pomocí PCR sekvenovat přímo bez potřeby jejího klonování (Kraak 2011).

Díky typu dědičnosti (po mateřské linii) se sekvenování cpDNA hodí také např. ke studiu směru mezidruhovému hybridizace (např. Randell et al. 2004). Jinak řečeno, srovnání haplotypů⁴ nám poskytuje informaci o tom, který z rodičovských druhů hraje roli mateřské rostliny. K zodpovězení této otázky je třeba najít variabilitu u rodičovských taxonů v sekvencích některého úseku nekódující cpDNA.

Metodika

Analýza haplotypů byla provedena u 12 jedinců *D. arenarius*, 11 *D. carthusianorum* a všech 11 hybridů. DNA byla izolována z listů vysušených v silikagelu s použitím Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek). Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru Nanodrop ND1000 a následně naředěna na koncentraci 5ng/μl pro další použití.

Vyzkoušeno bylo postupně celkem 10 chloroplastových úseků (viz tab. 4). PCR reakce probíhala v mikrokumavkách v objemu 20 μl (použitý PCR mix viz tab. 5) v gradientovém termocykleru Eppendorf Mastercycler ep S (cyklus viz tab. 6). U většiny primerů byl vyzkoušen teplotní gradient s použitím tří teplot po 2-4 °C. Po PCR amplifikaci byly produkty nanесeny na 1% agarózový gel (agaróza, Amresco; 1x TAE pufr) obsahující ethidium-bromid a provedena elektroforéza v 1x TAE pufru při 100V. Výsledný gel byl vyfotografován pod UV světlem (Kodak Gel Logic 100).

⁴ Haplotyp je zkratka pro haploidní genotyp. Je to skupina alel na jednom chromozomu, které jsou na potomky přenášeny pohromadě (nedochází mezi nimi k rekombinaci).

Chloroplastové úseky, které úspěšně amplifikovaly (tvořily na gelu jeden zřetelný proužek), byly přečištěny pomocí GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma). Takto přečištěné PCR produkty byly zaslány na sekvenaci do společnosti Macrogen (Soul, Jižní Korea). Úseky byly sekvenovány s použitím obou PCR primerů (Forward a Reverse).

Získané sekvence byly editovány v programu Chromas Lite (Technelysium, Ltd., Australia). Zeditované sekvence byly následně zkopírovány ve FASTA formátu do programu BioEdit (Hall 1991), kde byly ručně spojeny a vytvořen alignment.

Tab. 4: Přehled použitých chloroplastových úseků. ± nespecifická amplifikace. Úspěšně amplifikované úseky byly sekvenovány (+).

chloroplastový úsek	T annealingu (°C)	amplifikace	sekvenace	variabilita	zdroj
<i>3'trnV-ndhC</i>		-	-		Shaw et al. 2007
<i>ndhF-rpl32</i>		-	-		Shaw et al. 2007
<i>trnQ-5'rps16</i>	(60)	±	-		Shaw et al. 2007
<i>atpl-atpH</i>	(48)	±	-		Shaw et al. 2007
<i>trnL-trnF</i>	57	+	+	-	Taberlet et al. 1991
<i>trnG-trnG</i>	54	+	+	-	Shaw et al. 2005
<i>trnH-psbA</i>	53	+	+	-	Shaw et al. 2005
<i>rpl32-trnL</i>	57	+	+	-	Shaw et al. 2007
<i>ycf6-psbM</i>	53	+	+	-	Shaw et al. 2005
<i>psbJ-petA</i>	54	+	+	+	Shaw et al. 2007

Tab. 5: PCR mix pro jeden vzorek.

dd H ₂ O	11.9 µl
AmpliTaQ Gold PCR Buffer (Applied Biosystems)	2 µl
MgCl ₂ (1,5mM)	4 µl
dNTP (po 0,1 µl dATP, dTTP, d GTP, dCTP; 10 mM/µl)	0.4 µl
primer FORWARD (25 pmol/µl)	0.25 µl
primer REVERSE (25 pmol/µl)	0.25 µl
AmpliTaQ Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems; 1U/µl)	0.2 µl
DNA (5 ng/µl)	1 µl
reakční objem	20 µl

Tab. 6: PCR cyklus.

Krok	Teplota (°C)	čas	počet cyklů
Iniciální denaturace	94	10 min	
Denaturace	94	30 s	35x
Annealing	viz tab. 4	30 s	
Elongace	72	2 min	
Závěrečná elongace	72	10 min	
Hold	10	-	

Výsledky

Z 10 vyzkoušených kombinací primerů amplifikovalo úspěšně 6 z nich (1 zřetelný proužek na gelu), 2 amplifikovaly nespecificky (více proužků na gelu) a zbylé 2 se nepodařilo naamplifikovat ani při různých teplotách annealingu a změně reakčních podmínek (tab. 4). Pouze jeden úsek (*psbJ-petA*) ze 6 sekvenovaných vykazoval variabilitu mezi *D. arenarius* a *D. carthusianorum*. Haplotypy těchto druhů se ve studovaném úseku lišily na dvou pozicích: první má charakter dvoubázové inserce/delece, druhá pozice je jednobázovou substitucí. Osm hybridů mělo shodný haplotyp s *D. arenarius* a tři s *D. carthusianorum*. Tito 3 hybridy se navíc liší od zbylých sekvencí jedinečnou jednobázovou mutací (tab. 7).

Tab. 7: cpDNA haplotypy (úsek *psbJ-petA*) *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, *D. carthusianorum* a jejich hybrida. Osm hybridů sdílí stejný haplotyp s *D. arenarius* a zbylé tři s *D. carthusianorum*.

Taxon/hybridní jedinec	pozice v <i>psbJ-petA</i> alignmentu		
	126-127	422	853
<i>D. arenarius</i> subsp. <i>bohemicus</i> (12 jedinců)	-	A	G
H6	-	A	G
H7	-	A	G
H11	-	A	G
H13	-	A	G
H21	-	A	G
H26	-	A	G
H29	-	A	G
H30	-	A	G
H19	GG	C	C
H20	GG	C	C
H24	GG	C	C
<i>D. carthusianorum</i> (11 jedinců)	GG	A	C

Zhodnocení fertility hybridů

Fertilita F1 hybridů odráží sílu postzygotických reprodukčních bariér mezi rodičovskými druhy (Briggs & Walters 2001). Důležitou postzygotickou bariérou je snížení nebo ztráta pylové viability (životaschopnosti), která snižuje fertilitu hybridů a zabraňuje tak zpětnému křížení a ztrátě integrity rodičovských druhů (Rieseberg et al. 1999). Fertilita hybridů byla studována jak barvením jejich pylu, tak pozorováním tvorby semen.

Barvení pylu

Existuje řada *in vitro* metod k odhadu životaschopnosti (viability) pylu (Dafni 1992), přičemž je třeba mít na paměti, že se jedná vždy jen o pravděpodobný odhad, nikoli důkaz, že pyl není schopen oplodnit vaječnou buňku. Nejpřesnější je postup zjišťující přímo klíčivost pylových zrn, zároveň se ale jedná také o postup nejnáročnější: pylová zrna je třeba nechat klíčit na vhodném médiu a při optimálních podmínkách pro daný druh, které by se měly co nejvíce blížit těm skutečným (Beck-Pay 2012, Randell et al. 2004, Dafni 1992). Proto nejčastěji používaným postupem jsou různá barvení. Při špatné optimalizaci klíčení pylu navíc poskytují i lepší výsledky (např. Beck-Pay 2012). Jednou z jednodušších (bez použití fluorescečních barviv) a nejčastěji používaných metod je vitální barvení pro důkaz přítomnosti cytoplasmy (např. Alexandrovo barvení; Alexander 1969; Bureš et al. 2010). Výhodou této metody je snadná příprava bez zvláštního technického vybavení a dobrý odhad životaschopnosti pylu. Zároveň je možné použití i pylu z herbářových položek (např. Randell et al. 2004), na rozdíl od barvicích metod, kdy je barevná reakce vyvolána procesy probíhajícími v živých buňkách nebo přítomností enzymů (Dafni 1992).

Metodika

Byly vyzkoušeny dva typy barvení: Alexandrovo (Alexander 1969) a barvení podle Peterson et al. (2010). Postup obou barvení je totožný, liší se částečně složením barvicích roztoků. Barva připravená podle Peterson et al. (2010) je výrazně méně toxická (neobsahuje fenol a chloralhydrát, viz tab. 8) a podle srovnávacích vzorků poskytuje stejné výsledky, proto byla nakonec upřednostněna.

Pyl byl použit z neotevřených usušených prašníků uchovávaných v papírových sáčcích. Při barvení dle Petersona byl pyl před barvením nejdříve fixován v Carnoyově fixativu (6 96% etanol : 3 chloroform : 1 kyselina octová). Samotné barvení probíhalo pak následovně (pro oba postupy stejně): cca 2-4 prašníky byly preparační jehlou přeneseny na podložní skličko, zakápnuty dvěma kapkami barvy a jehlou rozrušeny (pro lepší probarvení). Preparáty byly posléze krátce zahřívány nad plynovým kahanem a poté přikryty krycím skličkem (u Alexandrova barvení postačilo místo zahřívání nechat pár hodin preparát probarvovat při pokojové teplotě). Výsledné preparáty byly pozorovány pod mikroskopem (Olympus BX41, zvětšení 100x). Z každého preparátu bylo fotoaparátem (Olympus C-

7070) pořízeno 2-5 snímků. Celkový počet analyzovaných pylových zrn se pohyboval v rozmezí 400-1000 / preparát.

V barvivo obsažený fuchsin barví protoplasmu obsaženou v živých pylových zrnech, fialově a malachitová zeleň barví celulóзовou buněčnou stěnu zeleně.

K barvení byl použit pyl (resp. prašníky) ze všech hybridů,

pokud ho tito tvořili. Pro kontrolu byl také barven pyl několika jedinců rodičovských druhů. Vzhledem k tomu, že hvozdíky jsou gynodioeické, pak u některých jedinců nenajdeme pyl, respektive tvoří pouze abortované prašníky. Pro kontrolní barvení rodičovských druhů byly vybrány jen oboupohlavné květy. Celkem byl barven pyl z 18 jedinců *D. arenarius* a 9 *D. carthusianorum*.

Tab. 8: Složení barvicích směsí podle Alexandra (Alexander 1969) a Peterson et al. (2010). Použité chemikálie i jejich množství je stejné, kromě fenolu a chloralhydrátu u Alexandrova barvení.

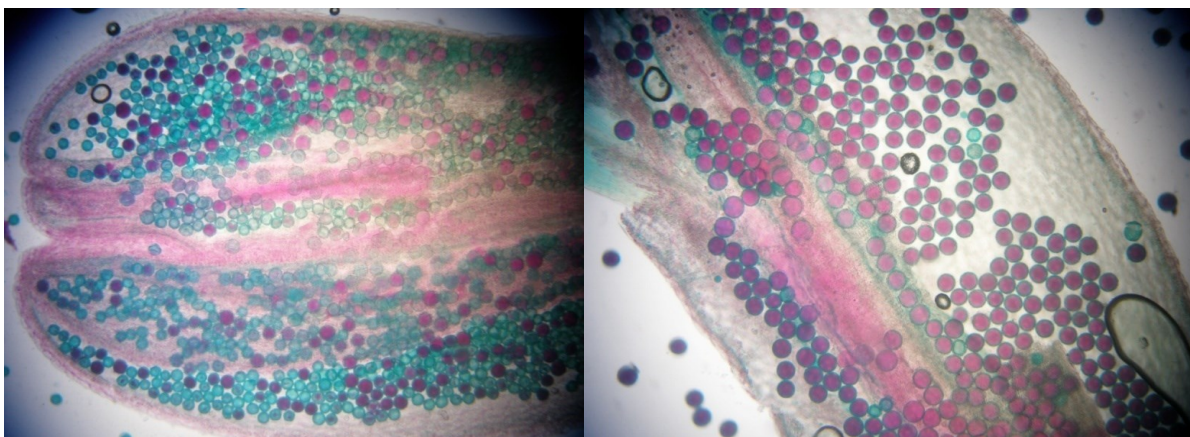
Alexandrovo barvení (Alexander 1969)	Barvení podle Peterson et al. (2010)
10 ml 95% etanolu	
1 ml malachitové zeleně (1% roztok v 95% etanolu)	
50 ml destilované vody	
25 ml glycerolu	
5 g fenolu	-
5 g chloralhydrátu	-
5 ml fuchsinu (1% roztok ve vodě)	
0,5 ml oranž G (1% roztok ve vodě)	
4 ml ledové kyseliny octové	
doplnit destilovanou vodou (4,5 ml) do celkového objemu 100 ml	

Výsledky

Obě použitá barviva úspěšně barvila studovaný pyl. Kontrolní pyl obou rodičovských druhů byl z více než 90% životaschopný (pouze u jednoho vzorku *D. carthusianorum* to bylo cca 65%). Životaschopnost pylu hybridů je shrnuta v tabulce 9. Ukázky snímků z obarvených preparátů jsou na obr. 9. Bohužel v případě hybridů, které mají zcela neživotaschopný pyl, není vždy možné spolehlivě odlišit, zda se jedná skutečně o sterilního jedince v důsledku postzygotických bariér nebo zda se jedná ve skutečnosti o samičí rostlinu, která tvoří zakrnělé tyčinky a prašníky s nevyvinutým pylem (viz pojednání o gynodioecii na str. 7).

Tab. 9: Viabilita pylu hybridů na základě barvení podle Alexandra (Alexander 1969) a podle Peterson et al. (2010). Jedinci, kteří tvořili zakrnělé tyčinky, jsou považováni za samičí (♀?), ale není vyloučeno, že se jedná právě o projev sterility.

Kód hybrida	Viabilita pylu
H6	<1%
H7	♀?
H11	♀?
H13	± 15%
H19	♀?
H20	♀?
H21	♀?
H24	♀?
H26	♀?
H29	♀?
H30	± 25%



Obr. 9: Ukázka preparátů prašníků s pylovými zrny obarvenými Alexandrovým barvivem (fialově - životaschopný pyl, zeleně - abortovaný pyl). Na snímku vlevo je hybrid H30, který má cca 25% životaschopného pylu, na snímku vpravo je *D. arenarius* subsp. *bohemicus*.

Počítání semen

V letech 2009-2011 byla, v době kdy dozrávají tobolky, pozorována tvorba semen u hybridů. Počet sebraných tobolek shrnuje tabulka 10.

Tab. 10: Počet analyzovaných tobolek u jednotlivých hybridů.

Číslo hybridu	H6	H7	H13	H19	H20	H21	H24	H26	H29	H30
Počet tobolek	53	8	3	2	2	15	25	16	3	17

Výsledky

Žádná z tobolek hybridů neobsahovala vyvinutá semena. Tobolky byly ale také často, stejně jako u rodičovských druhů, poškozeny larvami obaleče *Cnephasia longana*. Tobolky rodičovských druhů, pokud nebyly napadeny škůdcem, obsahovaly vyvinutá semena (vlastní pozorování, nebylo počítáno).

Morfometrika

Morfometrické analýzy a jejich následné mnohorozměrné statistické zpracování jsou běžně používaným nástrojem pro kritické zhodnocení morfologické variability, eliminují totiž subjektivní pohled taxonoma a poskytují robustní informace o variabilitě jedinců, populací či taxonů (Marhold & Suda 2002).

Materiál

Pro morfometrické analýzy byla vzhledem k ohroženosti *D. arenarius* sbírána jedna kvetoucí lodyha z daného trsu. Celkově bylo analyzováno 57 jedinců *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, 40 jedinců *D. carthusianorum* a všech 11 známých hybridů. Pro snadné pozdější měření znaků na květu a pro geometrickou morfometriku se ukázal jako vhodný postup, kdy jednotlivé květní části (vnější a vnitřní pár podkališních listenců, napříč rozříznutý kalich a korunní lístky) byly nalepeny lepicí páskou na bílou a černou (v případě bílých korunních lístků) čtvrtku papíru. Dále byl nalepen spodní pár listů a zbytek lodyhy byl použit pro cytometrické a molekulární analýzy. Tyčinky byly uchovávány zvlášť v papírových sáčcích pro barvení pylu.

Samičí rostliny nebo rostliny se zakrnělými prašníky u gynodioecních rostlin (obr. 10) mívají obecně v průměru o něco menší květy a mohly by proto zkreslovat morfometrické analýzy. Kdyby však byly samičí rostliny z analýzy vypuštěny, museli bychom vyřadit i většinu hybridů. Protože nám ale jde o jejich odlišení od rodičovských druhů (ať jsou samičí, se zakrnělými prašníky či hermafroditi), rozhodla jsem se zahrnout i tyto jedince. Celkově byly do analýz zahrnuty 3 samičí rostliny *D. carthusianorum*, 7 *D. arenarius* subsp. *bohemicus* a 8 hybridů (jejich přehled viz tab. 9).



Obr. 10: Gynodioecie u *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus*. Zleva: hermafroditní rostlina, rostlina se zakrnělými prašníky, samičí rostlina.

Klasická morfometrika

Metodika

Délka listu byla měřena plastovým pravítkem (přesnost 1 mm), znaky na květu byly měřeny digitálním posuvným měřítkem (šuplerou; přesnost 0,1 mm). Přehled měřených znaků je v tabulce 11.

Tab. 11: Přehled měřených morfologických znaků.

číslo znaku	kód v SAS	znak
1	v3	délka dolního listu (mm)
2	v4	délka vnitřního podkališního listence (mm)
3	v5	šířka vnitřního podkališního listence (mm)
4	v6	poměr šířka/délka vnitřního podkališního listence
5	v7	výška kalichu (mm)
6	v8	obvod kalichu (mm)
7	v9	poměr obvod/délka kalichu
8	v10	výška kališních zubů (mm)
9	v11	délka korunního lístku (mm)
10	v12	délka nehtu korunního lístku (mm)
11	v13	délka čepele korunního lístku (mm)
12	v14	šířka čepele korunního lístku (mm)
13	v15	hloubka prostředního úkrojku korunního lístku (mm)
14	v16	poměr šířka/délka korunního lístku

Některé znaky (byť velice užitečné pro detekci hybridů) jako je např. barva korunních lístků, barva listů a lodyhy a trsnatost, nebyly do morfometrické analýzy zahrnuty kvůli subjektivnímu hodnocení zejména odstínů barev a nestálosti barvy květy během doby kvetení. Tyto znaky jsou diskutovány samostatně v diskuzi. Jako znak nebyla také zahrnuta životaschopnost pylu kvůli již zmiňované přítomnosti samičích rostlin v datasetu, které by výsledky zkreslovaly.

Statistické zpracování dat

K vyhodnocení datových souborů naměřených znaků byl použit program SAS (verze 9.1; SAS Institute 2003).

Procedurou UNIVARIATE v programu SAS byly vypočteny základní popisné statistiky pro všechny znaky a pro jednotlivé taxony (průměr, směrodatná odchylka, minimum, maximum, medián, kvantily). Tato procedura testuje také normální rozdělení jednotlivých znaků různými testy; pro náš soubor byl použit Shapiro-Wilk test. Znaky, které nemají normální rozdělení, dosahují hodnot $<0,95$ na hladině významnosti $\alpha=0,05$ (Marhold & Suda 2002).

Pro vizualizaci základní struktury v datech byla provedena dvourozměrná standardizovaná (vycházející z korelační matice dat) analýza hlavních komponent (PCA).

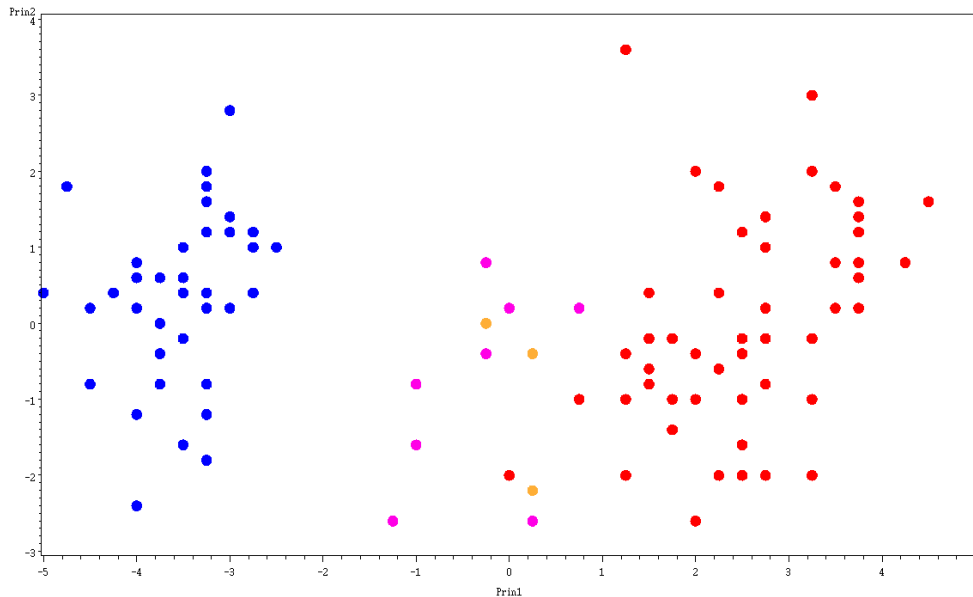
K určení nejdůležitějších znaků, kterými se taxony odlišují (zejména hybrid od svých rodičů), byla použita kanonická diskriminační analýza (CDA) provedená v programu SAS procedurou CANDISC. Před provedením diskriminačních analýz byla testována korelace znaků procedurou CORR s použitím Spearmanova neparametrického korelačního koeficientu. Jako hranice těsné korelace byla použita hodnota 0,95, která se při zpracování botanických dat používá nejčastěji (Marhold & Suda 2002). Pro zjištění účinnosti znaků pro determinaci hybridů byla provedena klasifikační diskriminační analýza (procedura DISCRIM) s využitím neparametrické metody *k*-nejbližších sousedů (*k*-nearest neighbours) a tzv. křížového ověření (*cross-validation*). Hodnota *k* byla stanovena experimentálně tak, aby počet správně zařazených jedinců byl nejvyšší.

Výsledky

Základní popisné statistiky pro všechny znaky a pro jednotlivé taxony jsou shrnuty v tabulce 14. Normální rozdělení podle Shapiro-Wilk testu mají 3 ze 14 znaků, proto byly v dalších analýzách použity neparametrické metody. Znaky *délka korunního lístku* (v11) a *délka nehtu korunního lístku* (v12) jsou těsně korelované (hodnota Spearmanova korelačního koeficientu >0,95). Znak v12 byl proto z diskriminační analýzy, která je na těsně korelované znaky citlivá, vypuštěn; pro analýzu PCA byl ponechán.

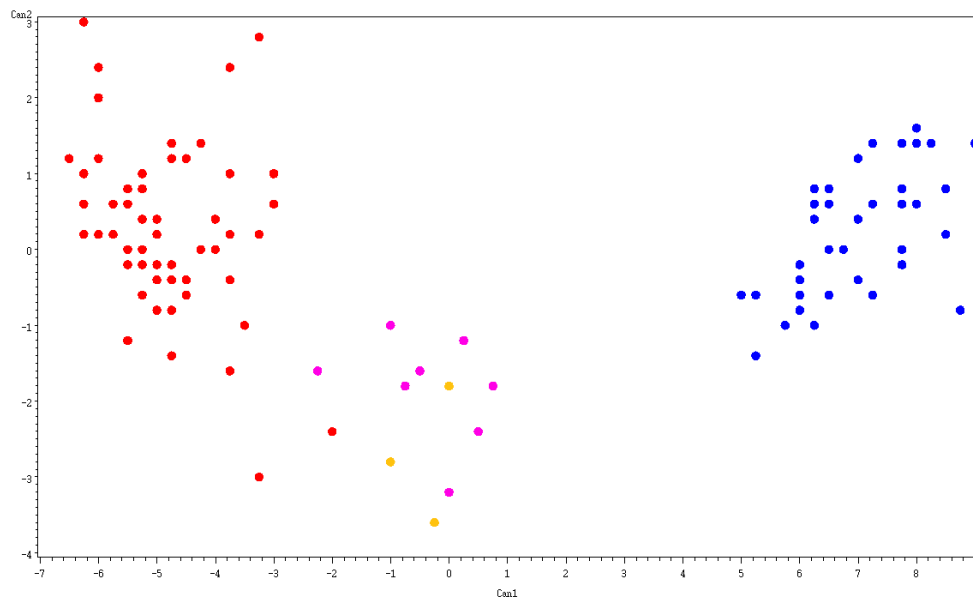
Skupiny jsou stanoveny na základě změřeného stupně ploidie pomocí průtokové cytometrie (odpovídá třem studovaným taxonům); navíc byly ještě rozlišeny 2 kategorie hybridů podle mateřského taxonu zjištěného na základě cpDNA.

Z výstupu PCA je jasně patrné oddělení hybridů od rodičovských taxonů podél první osy (obr. 11). Hybridi celkově jeví větší podobnost s *D. arenarius*. Hybridi, jejichž mateřskou rostlinou je *D. arenarius* a ti, jejichž mateřskou rostlinou je *D. carthusianorum*, se v této analýze neodlišili.



Obr. 11: Grafický výstup PCA pro *D. arenarius* subsp. *bohemicus* (červeně), *D. carthusianorum* (modře), hybrida, jehož mateřskou rostlinou je *D. arenarius* (růžově) a hybrida, jehož mateřskou rostlinou je *D. carthusianorum* (žlutě), s použitím všech 13 znaků. První dvě osy vysvětlují 62,09% a 11,67% variability.

V kanonické diskriminační analýze se jednotlivé taxony oddělují podél první osy ještě zřetelněji (obr. 12). Znaky, které jsou s touto osou nejtěsněji korelované, a přispívají tedy nejvíce k oddělení skupin, jsou: poměr obvod/délka kalicha (v9), délka spodního listu (v3), výška kalicha (v7) a poměr šířka/délka korunního lístku (v16; tab. 12).



Obr. 12: Kanonická diskriminační analýza (CDA) pro *D. arenarius* subsp. *bohemicus* (červeně), *D. carthusianorum* (modře), hybrida, jehož mateřskou rostlinou je *D. arenarius* (růžově) a hybrida, jehož mateřskou rostlinou je *D. carthusianorum* (žlutě), s použitím 12 znaků. První a druhá kanonická osa vysvětlují 98,04 % a 1,59 % variability. Dva jedinci *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, kteří jsou v blízkosti hybridů, představují samičí jedince.

Tab. 12: Kanonické korelační koeficienty pro všechny znaky kromě v12 (těsně korelován s v11). Tučně jsou označeny kódy znaků (a odpovídající hodnoty koeficientů), které nejvíce přispívají k oddělení skupin (taxonů).

Kód znaku	Can1	Can2	Kód znaku	Can1	Can2
v3	0.901847	0.253405	v10	-0.517018	-0.031784
v4	0.837987	0.202416	v11	-0.887679	0.266120
v5	-0.257451	0.187850	v13	-0.855893	0.300348
v6	-0.819138	-0.077907	v14	-0.826619	0.218946
v7	-0.933639	0.238269	v15	-0.729685	0.119382
v8	0.556054	0.436148	v16	-0.923241	0.201879
v9	0.938814	0.057982			

Oddělení jednotlivých taxonů bylo testováno také klasifikační diskriminační analýzou všech jedinců. Provedeny byly 3 různé analýzy: 1 - s použitím všech znaků, 2 - s použitím čtyř znaků, na základě kterých se taxony nejlépe oddělují v CDA (nejtěsněji korelovaných s první kanonickou osou; viz tab. 12), 3 - s použitím pouze nepoměrových znaků (kvůli jejich potenciálnímu využití v určovacím klíči). Při všech analýzách se pro výpočet ukázal jako nejlepší parametr $k=7$ nejbližších sousedů. Všechny analýzy vedly k 100% úspěšnosti v zařazení *D. carthusianorum* a hybridů. V případě použití všech znaků nebo jen nepoměrových znaků byli tři jedinci *D. arenarius* subsp. *bohemicus* chybně přiřazeni k hybridům; při použití 4 nejdůležitějších znaků klesl počet špatně zařazených jedinců na dva (tab. 13). Tento výsledek pravděpodobně souvisí s tím, že *D. arenarius* a hybrid jsou si morfologicky bližší (jak ukazuje PCA a CDA), proto je zde vyšší riziko nesprávného určení. Při zpětné kontrole těchto dvou nesprávně zařazených jedinců *D. arenarius* subsp. *bohemicus* (v grafickém výstupu CDA jsou tyto body blíž hybridům, obr. 12) bylo zjištěno, že se jedná o samičí jedince, kteří mají menší květy s mělčím dřipením, a jsou proto podobnější hybridům. Připomeňme zde však, že do morfometrických analýz nebyl zahrnut důležitý znak barvy květů, který by jinak počet chybně určených jedinců s největší pravděpodobností ještě snížil (ne-li zcela eliminoval).

Tab. 13: Klasifikační diskriminační analýza *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, *D. carthusianorum* a hybrida s použitím všech znaků. Řádky označují skutečnou příslušnost objektu ke skupině, sloupce klasifikaci na základě diskriminační funkce. Uveden je vždy absolutní počet jedinců a jejich procentuální vyjádření.

Z taxonu	Přiřazeno k taxonu			
	<i>D. arenarius</i>	hybrid	<i>D. carthusianorum</i>	celkem
<i>D. arenarius</i>	54	3	0	57
	94.74%	5.26%	0	100
hybrid	0	11	0	11
	0	100%	0	100
<i>D. carthusianorum</i>	0	0	40	40
	0	0	100%	100
chybně zařazených	0	3	0	3

Tab. 14: Přehled základních statistik pro jednotlivé znaky (minimum, maximum, průměr, 5% a 95% kvantil) a jednotlivé taxony.

taxon/znaky	délka dolního listu (mm)	d. vnitřního podkalisního listence (mm)	š. vnitřního podkalisního listence (mm)	š. vnitřního podkalisního listence (mm)	poměr š./d. vnitřního podkalisního listence	výška kalichu (mm)	obvod/d. kalichu (mm)	poměr obvod/d. kalichu	výška kalíšních zubů (mm)	d. korunního listku (mm)	d. nehtu korunního listku (mm)	d. čepele korunního listku (mm)	š. čepele korunního listku (mm)	hloubka vrcholového úkroju korunního listku (mm)	poměr š./d. korunního listku
<i>Dianthus arenarius</i> subsp. <i>bohemicus</i>	min	8.20	4.70	2.70	0.50	18.00	6.40	0.25	3.50	21.50	7.70	8.40	7.00	1.60	0.20
	5% kvantil	9.00	5.40	3.20	0.50	20.30	6.50	0.26	4.10	27.00	17.50	10.80	7.60	2.50	0.20
	průměr	18.40	6.75	4.00	0.60	23.40	7.30	0.30	5.10	36.10	23.10	13.00	10.10	3.80	0.30
	95% kvantil	30.30	8.00	5.00	0.70	26.10	8.50	0.36	6.40	43.20	28.20	15.70	12.20	5.30	0.30
	max	33.00	9.60	5.00	0.90	27.40	9.20	0.37	6.60	45.20	29.50	17.50	13.70	6.00	0.50
hybrid	min	13.80	6.30	3.00	0.50	14.60	5.80	0.34	3.60	22.20	13.40	8.30	6.80	1.50	0.30
	5% kvantil	13.80	6.30	3.00	0.50	14.60	5.80	0.34	3.60	22.20	13.40	8.30	6.80	1.50	0.30
	průměr	26.20	7.20	3.70	0.50	18.00	7.00	0.40	4.80	26.40	16.10	10.30	8.50	2.00	0.30
	95% kvantil	33.00	8.60	4.30	0.70	19.80	8.10	0.44	5.40	31.40	20.10	11.50	10.50	2.40	0.40
	max	33.00	8.60	4.30	0.70	19.80	8.10	0.44	5.40	31.40	20.10	11.50	10.50	2.40	0.40
<i>Dianthus carthusianorum</i>	min	37.00	7.20	2.60	0.30	12.00	6.90	0.40	2.80	8.40	8.80	6.70	5.40	0.30	0.30
	5% kvantil	43.30	8.00	2.90	0.30	12.60	7.20	0.50	3.55	16.90	10.50	7.20	5.65	0.40	0.30
	průměr	78.20	9.70	3.70	0.40	14.60	8.20	0.60	4.30	21.20	13.10	8.70	7.10	0.70	0.30
	95% kvantil	115.00	12.00	4.60	0.50	16.10	9.15	0.65	5.25	24.40	15.30	10.30	8.90	1.05	0.40
	max	121.80	12.30	4.90	0.50	16.80	9.20	0.70	5.30	25.20	20.50	11.20	9.60	1.60	0.80

Geometrická morfometrika

Lineární znaky (délka, šířka, apod.), které analyzuje klasická morfometrika jsou zatíženy informací o velikosti, která však často nemá pouze genetický základ, ale souvisí více či méně i s prostředím a ontogenetickou fází vývoje měřeného orgánu. K popisu celkového tvaru využívá proto klasická morfometrika poměr lineárních kvantitativních znaků. Tento popis tvaru však není příliš přesný, neboť nepostihuje jemnější rozdíly ve tvaru. Řešením je právě geometrická morfometrika, která nejen že odfiltruje vliv velikosti a hodnotí pouze tvarové změny, ale dokáže postihnout i poměrně jemné tvarové rozdíly (Neustupa 2006).

Nejpoužívanější přístup v geometrické morfometrice je analýza tzv. význačných bodů (landmarků), kterou zavedl Fred Bookstein (Bookstein 1991). Procesem tzv. Prokrustovské superimpozice se tvary definované landmarky přes sebe přeloží tak, aby vzdálenosti mezi těmito landmarky byly co nejmenší. Přitom je možné tvary pouze posunovat, rotovat a zvětšovat či zmenšovat, vzájemná poloha landmarků zůstává stejná. Zbytkové vzdálenosti mezi jednotlivými landmarky po této úpravě obsahují informaci o tvaru každého objektu. Alternativní metodou pro modelování a znázornění zbytkových vzdáleností je metoda ohebných plátů (*thin plate spline*). K definici a analýze prostoru, ve kterém se odehrávají veškeré tvarové změny studovaných objektů, tvaroprostoru, se využívá tzv. analýza relativních *warpů* (deformací), která nám zároveň umožňuje sledovat morfologické trendy (Neustupa 2006).

Nevýhodou geometrické morfometrie založené na landmarcích je právě potřeba definovat tyto význačné body na námi studovaném objektu. U rostlin (na rozdíl od živočichů) najdeme obvykle podstatně méně homologických bodů, které můžeme „landmarkovat“ (jednoznačně definovat). Jejich nedostatek lze do určité míry nahradit tzv. semilandmarky – klouzavými body, např. u listu definujeme špičku a bázi listu jako landmarky a na okraji čepele listu umístíme několik semilandmarků. Avšak ve chvíli, kdy nemáme dostatek jasně definovaných landmarků, odpadá možnost (a výhody), kterou poskytují výše popsané analýzy. Jiným přístupem pro analýzu jednoduchých tvarů jako např. právě list, korunní lístek apod. je analýza tvaru jako celku.

Pro studium obrysů bez použití landmarků se nejčastěji používá analýza eliptických Fourierových deskriptorů (*elliptical Fourier descriptors*; Kuhl & Giardina 1982), která slouží při studiu obrysu rostlinných orgánů, jako jsou list (Viscosi & Fortini 2011, Lepší et al. 2009), korunní lístky (Yoshioka et al. 2004), kořen (Iwata et al. 1998), apod. Principem této analýzy je vytváření fourierovských harmonických funkcí k analýze obrysu. Koeficienty těchto funkcí jsou následně využity pro analýzu hlavních komponent. Zároveň mohou být vizualizovány průměrné obrysy podél každé osy.

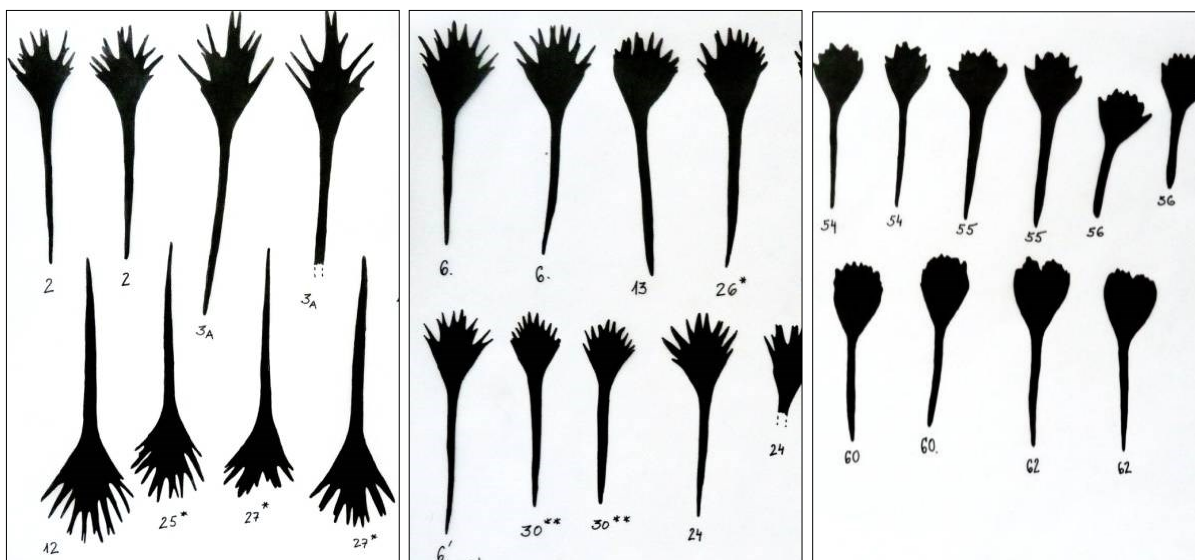
Metodika

Analýza eliptických Fourierových deskriptorů byla použita pro zhodnocení obrysu korunních lístků, podkališních listenců a kalichu. Květní části byly nejdříve nalepeny na čtvrtku papíru a po jednom vyfotografovány. Vzhledem k tomu, že obzvláště korunní lístky byly (kvůli jejich dřípenosti) často různě přehnuté nebo byly na fotografii odlesky způsobené lepicí páskou, nebylo možné analyzovat fotografie přímo. Proto byly nejdříve černobíle vytisknuty, tvar byl černým fixem obtáhnut (a případné ohyby tak opraveny) a obkreslem na průsvitný papír. Dolní zúžená část kalichu se při lepení obvykle natrhne, proto byla pro geometrickou morfometriku použita jen horní polovina (obr. 16). Ukázky obkreslených obrysů korunního lístku, podkališních listenců a kalicha jsou na obrázcích 13, 14 a 15. Papír s takto obkreslenými obrysy byl naskenován, jednotlivé obrázky vyříznuty a analyzovány v programu softwarového balíku SHAPE 1.2 (Uwata & Ukai 2002). V podprogramu ChainCoder byl obrys každého objektu nejdříve přepsán do řetězového kódu. Ten byl následně v podprogramu CHc2Nef redukován na koeficienty eliptických Fourierových deskriptorů, 20 harmonických v případě korunních lístků a podkališních listenců, a 30 harmonických pro kalich. Velikost a orientace každého obrysu byla standardizována metodou nejdelšího poloměru. Tyto koeficienty jsou matematickými deskriptory tvaru (tvarovými proměnnými), které mohou být analyzovány klasickou PCA v programu PAST nebo podprogramu PrinComp (Viscosi et Fortini 2011). Tentýž program také generuje průměrný tvar na pozici -2 SD a $+2$ SD pro každou osu.

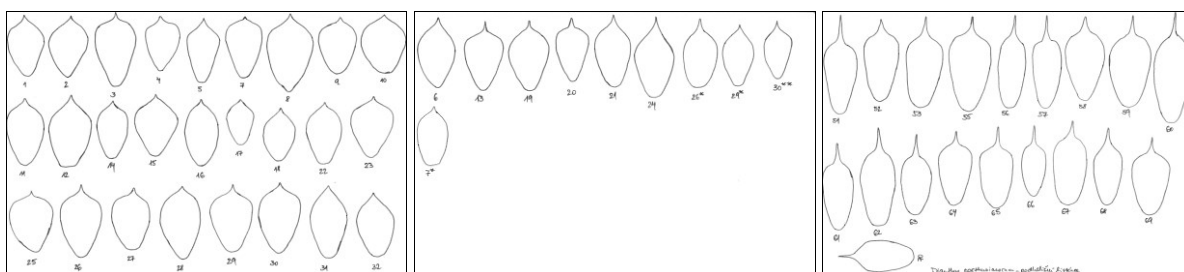
Výsledky

PCA vytvořené na základě obrysů všech studovaných květních částí oddělují jednotlivé skupiny (taxony) s větší či menší úspěšností. Zejména tvar korunního lístku a kalicha výrazně odděluje *D. carthusianorum* od zbytku, zatímco hybrid a *D. arenarius* subsp. *bohemicus* jsou si výrazně podobnější (příloha 2 a 3). Naproti tomu tvar podkališních listenců hybridů je téměř přesně intermediární (obr. 16). Stejně jako v případě klasické morfometrie se nijak neliší hybridy, jejichž mateřskou rostlinou je *h. písečný* a *h. kartouzek*.

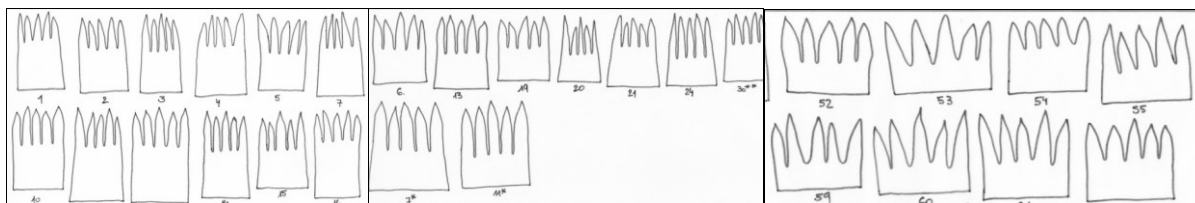
Jelikož se taxony oddělují převážně podél první osy, lze říci, že průměrné tvary podél této osy odpovídají fenotypu jednotlivých taxonů. Nicméně je třeba interpretovat tyto průměrné tvary s opatrností. V případě kalicha software pravděpodobně nedokázal přes sebe přeložit kališní zuby různě širokých kalichů (resp. neodhalil jejich homologii; viz příloha 2). U korunních lístků je situace ještě složitější, neboť počet úkrojků je variabilní a jednotlivé úkrojky nejsou homologní, takže není možné jednotlivé obrysy přeložit přes sebe. Program pak vyhodnocuje spíše tvar čepele bez těchto úkrojků (což je patrné z rekonstruovaných obrysů; viz příloha 3). Naproti tomu tvar podkališních listenců umožňuje přímou interpretaci: podkališní listence *D. carthusianorum* jsou zakončeny špičkou protaženou v osinku a celkově užším tvarem, *D. arenarius* má tupě zakončenou špičku a obvejčitý tvar, podkališní listence hybridů jsou intermediární (obr. 14 a 16).



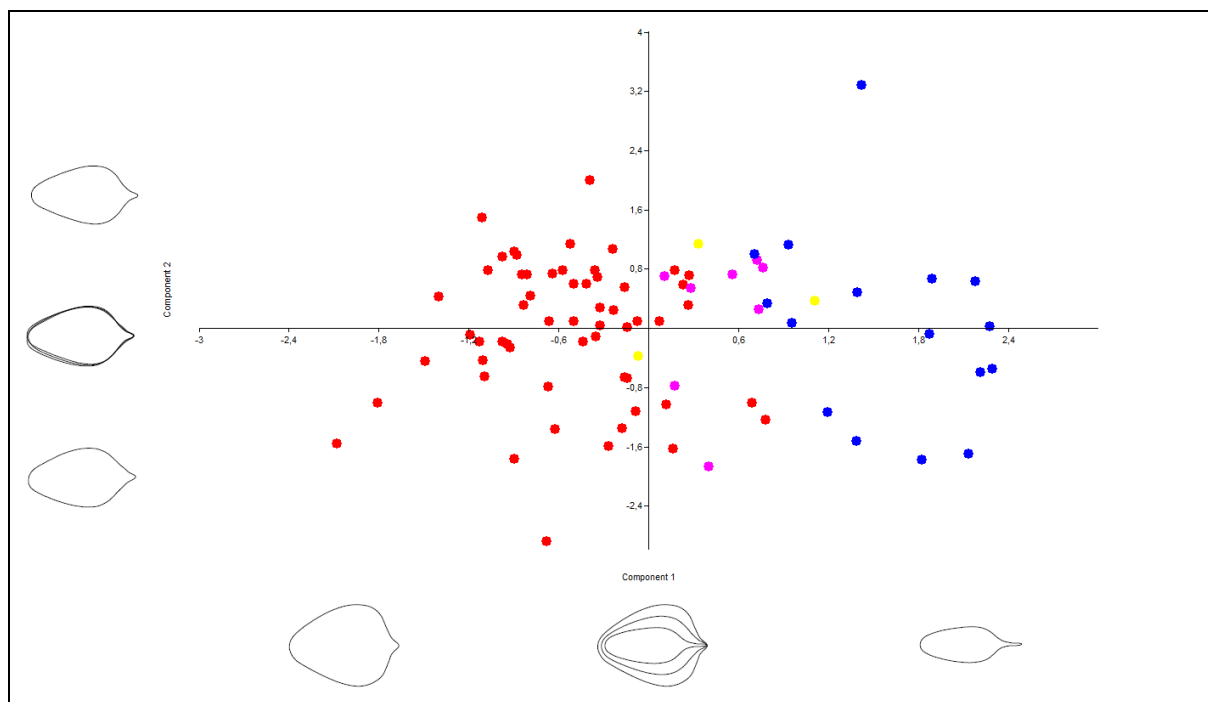
Obr. 13: Obkreslené obrysy korunních lístků. Zleva: *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, hybrid a *D. carthusianorum*. Z obrázků je patrný rozdíl v hloubce dřípení, které je u hybridu intermediární.



Obr. 14: Obkreslené obrysy podkališních listenců. Zleva: *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, hybrid a *D. carthusianorum*. *D. arenarius* má podkališní listence zakončené špičkou, *D. carthusianorum* má špičku protaženou ve zřetelnou osinku, náznak osinky je patrný i u většiny hybridů.



Obr. 15: Obkreslené poloviny obrysů kalichů. Zleva: *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, hybrid a *D. carthusianorum*.



Obr. 16: PCA Fourierových koeficientů popisující celkový tvar podkališních listenců *D. arenarius* subsp. *bohemicus* (červeně), *D. carthusianorum* (modře), hybrida, jehož mateřskou rostlinou je *D. arenarius* (růžově) a hybrida, jehož mateřskou rostlinou je *D. carthusianorum* (žlutě). Hodnoty PCA skóre jsou standardizovány směrodatnou odchylkou (měřítko diagramu je v jednotkách směrodatné odchylky). Podél 1. a 2. osy jsou zobrazeny rekonstruované obrisy korunních lístků odpovídající hodnotám -2 SD, 0 a +2 SD dané osy; prostřední obrázek představuje průměrný tvar. První dvě osy vysvětlují 74,2% a 13,3%.

Klíč k rozlišení *Dianthus carthusianorum*, *D. arenarius* subsp. *bohemicus* a jejich křížence.

Klíč je určen k rozlišení taxonů rodu *Dianthus* rostoucí na NPP Kleneč: *D. carthusianorum*, *D. arenarius* subsp. *bohemicus* a jejich křížence. Byl vytvořen na základě diskriminačních analýz a pozorovaných kvalitativních znaků. Kvantitativní údaje jsou uvedeny jako: (minimum-) dolní kvantil (5% jedinců) - horní kvantil (95% jedinců) (-maximum).

1a Květy ve strboulovitých svazečcích, C tmavě růžová, K (12-) 12,6-16,1 (-16,8) mm dlouhý, dolní lodyžní listy (37-) 43-115 (-122) mm dlouhé.....***D. carthusianorum* L.**

1b Květy nejčastěji jednotlivé nebo po 2-3, C bílá nebo světle růžová, K 14,6-26,1 (-27,4) mm dlouhý, dolní lodyžní listy (8-) 9-33 mm dlouhé.....**2.**

2a C bílá (vzácně světle růžová a/nebo s červenými skvrnami či brvami na bázi čepele korunních lístků), čepel C lístků dřipená do 1/3-1/2 v úzké, rovněž dřipené úkrojky, K (18-) 20,3-26,1 (-27,4) mm dlouhý.....***D. arenarius* L. subsp. *bohemicus* (NOVÁK)**

2b C světle růžová, čepel C lístků dřipená do 1/4-1/3, jednotlivé úkrojky obvykle dále nedělené, K 14,6-19,8 mm dlouhý.....***D. carthusianorum* x *arenarius* subsp. *bohemicus* [*D.* × *lucae* ASCHERS.]**

Diskuze

Cílem této části práce bylo (i) jednoznačně potvrdit (nebo vyvrátit) udávanou mezidruhovou hybridizaci mezi kriticky ohroženým endemitem *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus* a sympatrickým *D.carthusianorum* na jediné původní lokalitě NPP Kleneč, (ii) stanovit četnost hybridů, (iii) najít morfologické znaky pro jejich detekci, (iv) určit směr hybridizace a (v) zhodnotit riziko, které hybridizace může představovat pro ohrožený taxon.

Detekce a četnost hybridů

Nejčastěji používaným kritériem pro detekci mezidruhových hybridů byla, a stále často ještě je, jejich fenotypová intermediarita a snížená fertilita. Ačkoli jsou tyto znaky častou vlastností hybridů, zdaleka neplatí vždy (Rieseberg & Ellstrand 1993, Arnold & Hodges 1995, Rieseberg 1995), nehledě na to, že mohou být leckdy nespolehlivé. Častěji se proto dnes k detekci hybridů využívají cytologické či molekulární metody. Díky odlišnému stupni ploidie mezi *D. arenarius* a *D. carthusianorum* byla pro detekci jejich mezidruhových kříženců použita průtoková cytometrie. Rychlost analýz a snadná příprava vzorků umožnila zanalyzovat podstatnou část populace (přibližně polovinu). Kromě toho je tato metoda mimořádně vhodná zejména pro analýzu vzácných a chráněných rostlinných druhů, neboť stačí jen malá část pletiv z jakéhokoli ontogenetického stádia. Výskyt hybridů byl navíc sledován po dobu tří let, takže se jedná o poměrně přesný odhad jejich četnosti. Celkem bylo tedy zaznamenáno 11 hybridních trsů, což představuje cca 0,5% z 2143 rostlin *D. arenarius* subsp. *bohemicus* napočítaných na NPP Kleneč při posledním monitoringu v roce 2011.

Podobně se průtoková cytometrie uplatnila při detekci heteroploidních hybridů také v rodech *Centaurea* (Koutecký et al. 2011), *Galeobdolon* (Rosenbaumová et al. 2004), *Empetrum* (Suda et al. 2004), *Polypodium* (Bureš et al. 2003) či *Dryopteris* (Ekrt et al. 2010). V případě rozdílné velikosti genomu rodičovských druhů (min. 8-9 %; Suda 2011) umožňuje ale i detekci homoploidních kříženců, např. v rodech *Cerastium* (Seifertová 2009, Vít et al. in prep.) či *Elytrigia* (Mahelka et al. 2005). V posledním uvedeném případě průtoková cytometrie dokonce odhalila výrazně vyšší četnost hybridizace, než bylo očekáváno (Mahelka et al. 2005).

Celkový počet zaznamenaných rostlin se světle růžovými květy (znak dříve považovaný za typický pro hybridy) je však na lokalitě vyšší než počet potvrzených hybridů. Také u rostlin s červenými skvrnami či brvami na bázi čepele korunních lístků se nedal vyloučit hybridní původ. Odhady tak hovoří o 13% růžových rostlin v roce 1972 či dokonce o 62% rostlin, u nichž se objevoval alespoň jeden výše uvedený znak (Toman 1986). Na základě výsledků četnosti hybridů stanované pomocí FCM tedy vyplývá, že ne každý jedinec, který hybrida připomíná, jím skutečně je; odhady o počtu hybridů jsou tak ve skutečnosti mnohem střízlivější, než byla původní očekávání. Růžové

zbarvení koruny a červené skvrny či brvy tak nejspíše spadají do variability hvozdíku písečného. Můžeme však také spekulovat, zda tito jedinci nejsou ve skutečnosti tetraploidními hybridy, vzniklými splynutím neredukované gamety *D. arenarius* a redukované gamety *D. carthusianorum*, kteří nebyli průtokovým cytometrem rozpoznáni. Velikost genomu *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus* a této teoretické hybridní kombinace (vypočtené na základě naměřené velikosti genomu rodičovských druhů) se liší o 3,2%, což je skutečně na hranici rozlišení průtokového cytometru. Aby však tato hybridní kombinace vznikla, musel by *D. carthusianorum* vytvářet vysoký podíl životaschopných neredukovaných gamet. Nicméně ze 733 změřených rostlin tohoto druhu (viz kapitola o *D. carthusianorum*) byla nalezena jen jedna triploidní rostlina (a to v hadcové populaci), což nasvědčuje tomu, že hvozdík kartouzek s největší pravděpodobností netvoří neredukované gamety ve větší míře. Vznik tetraploidních kříženců (kteří by zůstali průtokovou cytometrií nerozpoznáni) tak není příliš pravděpodobný (byť ho nemůžeme zcela vyloučit). Ze stejného důvodu by také nebylo možné rozpoznat tetraploidní zpětné křížence vzniklé (i) splynutím neredukované (triploidní) gamety hybrida s redukovanou gametou *D. carthusianorum*, nebo (ii) kombinací diploidní gamety hybrida s redukovanou gametou *D. arenarius*. Jak bude ale diskutováno dále, zjištěná fertilita je natolik nízká, že ani tyto kombinace nejsou příliš pravděpodobné.

Rodičovství hybridů

Mezidruhoví hybridi jsou častější v populacích, kde je jeden z druhů v menšině, tento minoritní druh je pak podle Rieseberg (1995) častěji mateřským druhem (jelikož vnitrodruhovému opylení má větší šanci na úspěch než mezidruhovému, pak je minoritní druh častěji opylen cizím pylem). Na NPP Kleneč má populace *D. arenarius* subsp. *bohemicus* v současnosti přes 2000 jedinců a jednoznačně zde převažuje nad *D. carthusianorum*, proto bylo možné usuzovat, na základě výše zmíněné teorie, že *D. carthusianorum* je častěji mateřskou rostlinou (v minulosti však mohl převažovat, na konci 90. let měla populace *D. arenarius* subsp. *bohemicus* jen cca 200 jedinců). Naopak na základě fenologie (doba kvetení obou druhů se z velké části překrývá, ale *D. arenarius* nakvétá dříve, naopak *D. carthusianorum* kvete cca do října) bychom mohli usuzovat, že mateřskou rostlinou je častěji *D. arenarius* subsp. *bohemicus* (hvozdíky jsou proterandrické). Stejně tak Novák (1927b) soudí na základě výskytu hybridů uprostřed trsů *D. arenarius*, že mateřskou rostlinou je pouze hvozdík písečný a dárce pylu je hvozdík kartouzek.

Výsledky této práce ukázaly, že oba směry křížení jsou možné a na lokalitě reálně nalezitelné. Dokazují to shodně 2 znaky ve studované sekvenci cpDNA, z nichž jeden je svým charakterem dvoubázová inserce/delece nukleotidů a druhý jednobázová substituce. Při porovnání těchto výsledků s mapou hybridů (obr. 5) je patrné, že trojice hybridů, jejichž mateřská rostlina je hvozdík kartouzek (H19, H20, H24), roste blízko pospolu a to v severní části segmentu A na NPP Kleneč, kde je hvozdík kartouzek celkově častější (nejbližší trsy h. písečného byly od těchto hybridů zhruba 2 m daleko).

Obdobně tak i hybridí vzniklí ze semen hvozdíku písečného rostou v blízkosti trsů této mateřské rostliny. Oboustranně probíhající hybridizace nasvědčuje tomu, že nejsou dostatečně vytvořené reprodukční bariéry, které by zabránily vzniku hybridů.

Podobně byla oboustranná hybridizace pomocí chloroplastové DNA potvrzena v rodech *Phlox* (rodičovské druhy vystupují jako mateřská rostlina v poměru cca 2:1; Ferguson et al. 1999), *Cardamine* (v jednom směru je však častější; Lihová et al. 2007) či *Potamogeton* (Fant et al. 2003, Kaplan & Fehrer 2006). Naopak jednosměrná hybridizace se vyskytuje např. u Havajských druhů rodu *Rubus* (Randell et al. 2004).

Fertilita hybridů

Další logickou otázkou po potvrzení mezidruhově hybridizace je, do jaké míry přítomnost hybridů v populaci ohrožuje hvozdík písečný český prostřednictvím zpětných křížení a s ním spojené introgrese prostřednictvím genového toku. Odpověď na tuto otázku poskytuje studium postzygotických bariér u hybridů. Důležitou postzygotickou bariérou je snížení nebo ztráta životaschopnosti pylu, která snižuje fertilitu hybridů (Rieseberg et al. 1999). Vzhledem k tomu, že i jedinec se zcela sterilním pylem může teoreticky fungovat jako mateřská rostlina, byla studována u hybridů i tvorba semen.

Životaschopnost pylu byla testována jeho barvením. Jistou komplikací však přinesla gynodioecie, která se u hvozdíků vyskytuje. Setkat se tak můžeme se třemi typy květů: hermafroditní, samičí a se zakrnělými prašníky (funkčně též samičí). Při sběru prašníků na barvení bylo zjištěno, že 8 z 11 hybridů mělo zakrnělé prašníky s abortovaným pylem nebo bez pylu. Sterilita se však pravděpodobně projevuje stejně, tzn. v případě hybridů, kteří mají zcela neživotaschopný pyl, není vždy možné spolehlivě odlišit, zda se jedná skutečně o sterilního jedince v důsledku postzygotických bariér nebo zda se jedná ve skutečnosti o samičí rostlinu, která tvoří zakrnělé tyčinky a prašníky s nevyvinutým pylem. Životaschopnost pylu zbylých tří hybridů, kteří tvořili normálně vyvinuté prašníky, se pohybuje od méně než 1% po cca 25%. Ačkoli barvení pylu poskytuje velmi dobrý odhad o viabilitě pylu (Dafni 1992), není zárukou, že pozitivně obarvená pylová zrna jsou skutečně schopna vyklíčit v pylovou láčku a zejména pak oplodnit vaječnou buňku. Z odhadů nicméně vyplývá, že hermafroditní hybridí jsou do určité míry fertillní.

Rodičovským taxonem všech třech hermafroditních hybridů je *D. arenarius* subsp. *bohemicus*. Ačkoli v tomto případě jde pravděpodobně jen o náhodu (vzhledem k nepatrnému množství hermafroditních hybridů či hybridů celkově), není výjimkou, že hybridí vzniklí různými směry křížení (odlišný mateřský taxon) vykazují také odlišnou fitness. Výrazné fenotypové rozdíly podle toho, který druh hrál roli mateřské rostliny, najdeme např. u kříženců *Rosa dumalis* × *R. rubiginosa* (Werlemark et al. 1999). V rychlosti klíčení se liší např. hybridí dvou druhů rodu *Phlox* (Ferguson et al. 1999).

Semeník hybridů obvykle dozrával v tobolku, která nejevila známky narušeného vývoje. Přesto žádná ze 144 analyzovaných tobolek hybridů neobsahovala vyvinutá semena. Na druhou stranu byly tyto tobolky také často napadeny housenkami obaleče *Cnephasia longana*. Ten napadá tobolky všech druhů rodu *Dianthus*. Při posledním monitoringu v roce 2010 se ukázalo, že napadeno bylo 84% tobolek *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, napadení u *D. carthusianorum* bylo ještě vyšší (Špalová unpubl.). Je tedy jisté, že vyžírání semen fytofágem zkresluje výsledný počet tobolek s vyvinutými semeny. Přesto se dá říci, že se u hybrida s největší pravděpodobností projevuje samičí sterilita, vzhledem k nulovému počtu nalezených semen.

Ne vždy bývají ale mezidruhová kříženci sterilní (nebo neživotaschopní); v přírodě i v kultivaci najdeme spíše škálu přechodů od hybridů zcela neživotaschopných po ty, které svou fertilitou či konkurenceschopností převyšují jeden nebo oba rodičovské druhy (Rieseberg 1995, Arnold & Hodges 1995, Rieseberg & Carney 1998). Variabilita ve fitness může být i v rámci hybridů stejné rodičovské kombinace, kdy např. jen část hybridního potomstva převyšuje fitness rodičů (Bleeker & Hurka 2001).

Vysvětlení pro sterilitu hybridů v našem případě představuje bezpochyby fakt, že se jedná o heteroploidní křížence s lichým počtem chromozomů. Ty se obtížně párují a nejobvyklejší bezprostřední příčinou snížené fertility gamet tak bývá nepravidelný průběh meiózy při gametogenezi, produkující geneticky nevyvážené gamety (triploidní blok; Ramsey & Schemske 1998). Ke stejnému výsledku dospěli také Buell (1953) či Carolin (1957), který provedl celkem 113 různých mezidruhových křížení hvozdíků, z toho 28 bylo mezi druhy s různým stupněm ploidie ($2x \times 4x$, $2x \times 6x$ a $4x \times 6x$). Překonat problém párování chromozomů u triploidních kříženců by bylo teoreticky možné jejich zdvojením. V jiných případech je řešením produkce neredukovaných gamet, jako tomu je např. u triploidní *Dactylis glomerata*, u níž byla sice zjištěna rovněž vysoká samičí sterilita, ale semena tyto rostliny tvořily (byť 5-6x méně než diploidi a tetraploidi; Zohary & Nur 1959). Další alternativou pro produkci fertálních hybridů by byl jejich vznik splynutím neredukované gamety *D. carthusianorum* a redukované gamety *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, čímž by vznikl tetraploidní hybrid (Lowe & Abbott 2000). Ačkoli tento hybrid nebyl zaznamenán, představoval by právě on největší riziko pro *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, jelikož by se s ním mohl dál zpětně křížit a také by byl obtížně odhalitelný použitými technikami.

Na základě výsledků z průtokové cytometrie, studia fertility hybridů a terénních pozorování se můžeme pokusit shrnout pre- a postzygotické bariéry mezi *D. arenarius* subsp. *bohemicus* a *D. carthusianorum*. Oba taxony rostou sympatricky na NPP Kleneč, jejich doba kvetení se překrývá a opylovači hvozdíků bývají motýli (Bloch et al. 2006; zda se ale jedná o stejné druhy, není dosud známo). Vyloučeny jsou tak geografické, fenologické a pravděpodobně i etologické bariéry. Vzhledem však k malému počtu zaznamenaných hybridů nejspíš fungují prezygotické bariéry na úrovni gametické či gametofytické pylové inkompatibility, která může být (vzhledem k potvrzené

hybridizaci) příležitostně prolomena. Detekování hybridů jsou životaschopní (není ale vyloučeno, že jich nevzniká více a část z nich nehynie ve stádiu semenáčku) a kvetou zhruba stejně intenzivně jako rodičovské taxony. Hlavní postzygotickou bariérou se tak jeví vysoká míra sterility hybridů (fertilní je jen omezený podíl pylu u hermafroditních jedinců).

Morfologická charakteristika hybridů

Rozpoznání hybridů na základě morfologie není často triviální záležitost. Hybridů totiž obvykle nebývají zcela intermediární mezi oběma rodiči, ale jsou častěji podobnější jednomu z nich (Lihová et al. 2007, Rieseberg & Ellstrand 1993, Rieseberg 1995, Rieseberg & Carney 1998). Situace je o to složitější, čím jsou si rodičovské druhy podobnější, nehledě na to, že paleta různých pozorovaných fenotypů může být také výsledkem zpětných křížení či dalších hybridních generací (Rieseberg & Ellstrand 1993). V takovém případě je rozlišení hybridů a hybridních rojů pomocí morfologických znaků velice obtížné až nemožné (Bleeker & Hurka 2001, Bleeker 2007).

Nejednoznačnou dosavadní determinace hybridů z Klenče ukazují také výsledky z průtokové cytometrie, z nichž vyplývá, že počet hybridů na lokalitě je nižší než počet světle růžových rostlin. Samotná barva koruny tedy, byť je dobrým vodítkem, neumožňuje jednoznačné odlišení hybridů a snahou tak bylo najít znaky další, resp. jejich vhodnou kombinaci.

Výsledky PCA i diskriminační analýzy potvrzují terénní pozorování, že ačkoli hybrid jeví určité intermediární znaky mezi oběma rodiči, je celkově podobnější *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, se kterým se zaměňuje. Naproti tomu záměna s *D. carthusianorum* není díky výrazně odlišným fenotypům pravděpodobná. Hybridů, kteří mají odlišnou mateřskou rostlinu, se morfologicky neliší.

K oddělení skupin v kanonické diskriminační analýze (stanovených na základě stupně ploidie) nejvíce přispívají znaky *poměr obvod/délka kalicha*, *délka spodního listu*, *výška kalicha* a *poměr šířka/délka korunního lístku*. Při použití této čtveřice znaků se v klasifikační diskriminační analýze správně zařadilo do skupiny 100% hybridů a jedinců *D. carthusianorum*. Naproti tomu, 2 jedinci (3,51%) *D. arenarius* subsp. *bohemicus* byli chybně přiřazeni k hybridům. Jak již ale bylo řečeno, nebyla do morfometrických analýz zahrnuta barva květů a sivost, přičemž zejména barva květů by chybné zařazení bílých exemplářů *D. arenarius* subsp. *bohemicus* k hybridům vyloučila. Barva květů byla jako znak pro detekci hybridů použita např. u rodu *Cyclamen*, kde se kříží endemité *C. balearicum* s široce rozšířeným *C. repandum* (Thompson et al. 2010).

Dalším důležitým a zároveň obtížně statisticky hodnotitelným znakem pro určení hybridů je hloubka dřipení korunních lístků. Hybridů v tomto znaku jeví intermediární fenotyp mezi hluboce dřipeným *D. arenarius* a mělce dřipeným *D. carthusianorum*. Tvar korunních lístků se obtížně hodnotí klasickou morfometrikou, proto byla použita geometrická morfometrika. Ačkoli v PCA se taxony oddělili poměrně dobře, interpretace zrekonstruovaných průměrných tvarů podél jednotlivých os

vyžaduje kritický přístup. Software na analýzu tvaru si totiž „nedokáže poradit“ s nehomologií jednotlivých úkrojků korunních lístků a s jejich proměnlivým počtem. Podobně v případě kalicha pravděpodobně nedokázal přes sebe přeložit kališní zuby různě širokých kalichů, resp. neodhalil jejich homologii. Obrysová geometrická morfometrika se naproti tomu hodí na analýzu jednoduchých tvarů a osvědčila se tak pro podkališní listence.

Přestože je dřípenost korunních lístků obtížně kvalitativně a kvantitativně hodnotitelná jak klasickou, tak geometrickou morfometrikou, ve spojení s barvou koruny je podle terénních pozorování nejlepší kombinací znaků.

Znaky jako jsou barva korunních lístků, barva listů a lodyhy (sivost) a trsnatost, nebyly do morfometrické analýzy zahrnuty kvůli subjektivnímu hodnocení zejména odstínů barev a nestálosti barvy květu během doby kvetení (bílé květy hvozdíku písečného po opylení občas růžoví). Protože ale v těchto znacích se rodičovské taxony velice liší a jsou tedy potenciálním dobrým znakem pro určení hybridů, jsou zde diskutovány samostatně.

Hvozdík písečný je poměrně sivý a hustě trsnatý, naproti tomu hvozdík kartouzek je tmavě zelený (s nezřídka načervenalými uzlinami) ve volnějším trsech. Mezi kříženci se najdou jak husté sivé trsy (hybrid H29) či zelené volnější trsy (hybrid H26, H21), tak kombinace zelených, ale hustějších trsů (hybrid H19). Nepřítomnost sivosti a volnější trs jsou tak sice poměrně dobrým vodítkem, ale ne zcela spolehlivým znakem. Poslední jmenovaný hybrid má na rozdíl od předešlých *D. carthusianorum* jako mateřskou rostlinu, což může souviset se zelenou barvou jeho lodyhy a listů.

Korunní lístky u *D. arenarius* jsou bílé, dlouhé, s dlouhým nehem (odpovídá dlouhému kalichu) a s hlubokými úkrojky, čepel je v obrysu obvejčitá až okrouhlá s klínovitou bází. *Dianthus carthusianorum* má naproti tomu korunní lístky tmavě růžové, s klínovitou čepelí, která je velmi mělce dřípená či spíše zubatá. Vzhledem k tomu, že právě korunní lístky jsou mezi těmito dvěma druhy nejodlišnější a zároveň nejvýraznější květní části, není překvapivé, že nesou i nejlepší znaky pro odlišení jejich společného hybrida. Jak již bylo řečeno, nejdůležitější je kombinace znaků barvy koruny a dřípenosti (a ± velikost květu). Na lokalitě Kleneč najdeme totiž řadu více či méně růžových jedinců, kteří nejsou kříženci (prozradí je pak většinou hluboké dřípení, dlouhý kalich, atd.). Zároveň existují i hybridy (např. hybrid H11), kteří jsou téměř bílí, ale funguje u nich znak mělkého dřípení a menšího květu.

Dianthus arenarius subsp. *bohemicus* nevytváří květenství; lodyha má nejčastěji jeden květ, pokud jsou 2 či 3, pak nejsou těsně nahloučené. Naproti tomu *D. carthusianorum* vytváří strboulovité květenství 2-10(-15) těsně nahloučených květů. Mezi kříženci najdeme také jedince, kteří mají několik těsně nahloučených květů (např. hybridy H6, H13, H21), jiné mají květy na lodyze po jednom.

Dianthus arenarius subsp. *bohemicus* má dva páry obvejčitě kopinatých až vejčitých podkališních listenců, které jsou špičaté, ale většinou s chybějící nebo nepatrnou osinkou na konci. *D. carthusianorum* má nejčastěji 3 páry podkališních listenců, které jsou užší a delší než u předešlého

druhu, s dlouhou osinou. Co se týče počtu párů podkališních listenců u kříženců, najdeme jak jedince se třemi páry (hybridi H19, někdy H6 a H26; často také s osinkou), tak pouze se dvěma (H21, H 24). Vzhledem k odlišnému počtu páru byl v měření a analýze tvaru použit vnitřní podkališní listenec. Tvarem jsou podkališní listence hybridů poměrně intermediární mezi oběma rodiči, ale bližší jsou k *D. arenarius*.

Využití výsledků v ochranářské praxi

Zjištěný počet hybridů (11 trsů) na NPP Kleneč je vzhledem k velikosti populace *D. arenarius* subsp. *bohemicus* poměrně zanedbatelný. Všechny hybridní trsy jsou navíc primárními kříženci a jsou z velké části sterilní (100% samičí sterilita a vysoká samčí sterilita ve spojení s nízkým počtem hermafroditních rostlin). Vznik zpětných kříženců zapříčiňujících introgresi a erozi genofondu hvozdíku písečného českého je tak nepravděpodobný, v rámci analyzovaných jedinců nebyl zaznamenán. Díky předloženým diakritickým znakům jsou kříženci poměrně dobře rozpoznatelní a je tak možné snadné sledování jejich případného nárůstu v dalších letech (klíč pro determinaci hybridů je součástí kapitoly o morfometrice). V současné době není potřeba z hlediska rizik spojených s hybridizací zvláštního ochranného opatření zaměřeného proti hybridům či hvozdíku kartouzku. Je však dobré sledovat populaci z hlediska hybridizace i v budoucnu, neboť vzhledem ke zvětšující se populaci *D. arenarius* subsp. *bohemicus* v posledních letech je možné očekávat i nárůst hybridů. Hlavní součástí probíhajícího managementu je strhávání či narušování drnu, což usnadňuje uchycení pravděpodobně konkurenčně slabších hybridních semenáčků. Frekvence hybridů totiž často narůstá s mírou disturbance na stanovišti (Anderson 1948, Heiser 1979, Levin et al. 1996).

Zároveň není možné vyloučit vznik tetraploidních hybridů, kteří by pravděpodobně představovali větší riziko, neboť se u nich dá předpokládat, že by byli fertillní a mohlo by docházet k introgresi s *D. arenarius* subsp. *bohemicus*. Ani u stávajících triploidních hybridů nemůžeme vyloučit, že nemohou být příležitostně fertillní. Velkou roli ve zjištěné nízké fertilitě hybridů má také to, že většina stávajících hybridů (8 z 11) je pravděpodobně samičích a není tedy schopných produkovat pyl. Naproti tomu samčí (pylová) fertilita u tří hermafroditních hybridů je značně proměnlivá (<1% až 25%). Kdyby v budoucnu vznikl tedy větší počet hermafroditních hybridů, není možné vyloučit, že jejich pyl nebude ještě vitálnější a že nedojde ke zpětným křížením.

Z ochranářského hlediska bývá na hybridizaci obvykle nahlíženo jako na hrozbu pro zúčastněný ohrožený taxon (Rhymer & Simberloff 1996). Musíme však rozlišovat mezi antropogenní hybridizací a přirozenou (Allendorf et al. 2001). Hybridizace, tím že generuje novou variabilitu, je totiž také významným evolučním prvkem (Hegarty & Hiscock 2005, Wissemann 2006). V posledních letech se tak nesetkáváme jen s ochrannými opatřeními proti hybridům, ale i s jejich ochranou, respektive ochranou procesu hybridizace (Allendorf et al. 2001, Thompson et al. 2010). Situace na

NPP Kleneč je příkladem přirozené hybridizace: oba rodičovské druhy zde rostou pospolu pravděpodobně již dlouhou dobu (pozoroval je již F. A. Novák, který hvozdík písečný český popsal) a vyskytují se zde přirozeně. Ochrana přirozené hybridizace však probíhá spíše u taxonů, které mají více populací (z toho některé geneticky čisté, Allendorf et al., 2001), což není případ NPP Kleneč, jež je jedinou lokalitou hvozdíku písečného českého. Ochrana procesu hybridizace byla naopak navržena např. u Mediteránních orchidejí (Cozzolino et al. 2006) nebo u některých smíšených populací druhů rodu *Cyclamen* (Thompson et al. 2010).

Otázkou však také je, zda jsou vynaložené investice, čas a úsilí (viz např. opakované strhávání drnu těžkou technikou) ochranářů směřovány žádoucím směrem. Dalo by se uvažovat o rozporu, vznikajícím mezi druhovou ochranou a ochranou biotopů. Jinými slovy, zda není investováno příliš mnoho úsilí do záchrany jednoho druhu (resp. poddruhu) na úkor nezachraňování písčín jako takových (ač s mnohem větší diverzitou taxonů, Chytrý 2007).

Další směr výzkumu

Česká lokalita hvozdíku písečného leží na okraji areálu druhu (jako izolovaná arela). Dosud byl tento komplex poddruhů studován jen na morfologické úrovni, přičemž tradiční studie pocházejí z 20. let minulého století (Novák 1927a, b). V tomto kontextu je status českého poddruhu *bohemicus* a jeho vztah s ostatními poddruhy nejasný, a stejně tak nebyla dosud zhodnocena oprávněnost jeho rozlišování. Zajímavostí také jsou spekulace o tom, že klenečská populace nepřísluší k hvozdíku písečnému (Toman 2000). Vyloučeno není ani to, že se jedná o vysazenou populaci nejasného původu. Vzhledem k nemalému úsilí ochrany přírody o záchranu této populace (endemita) je tedy více než žádoucí bližší znalost vztahů českých rostlin s dalšími poddruhy a osvětlení evoluce a migrační historie celého komplexu. Studium genetické variability je mimo to také jedním z bodů záchranného programu pro *D. arenarius* subsp. *bohemicus* (Bělohoubek 2008).

Z vlastních pilotních výsledků vyplývá, že subsp. *bohemicus* se od subsp. *borussicus* liší ve velikosti genomu v průměru o 14,4% a od subsp. *arenarius* dokonce o 15,8%, což na poddruhové úrovni představuje významný rozdíl. Do budoucna se tedy jeví potřebné kritické biosystematické zhodnocení a odhalení evoluční historie celého komplexu.

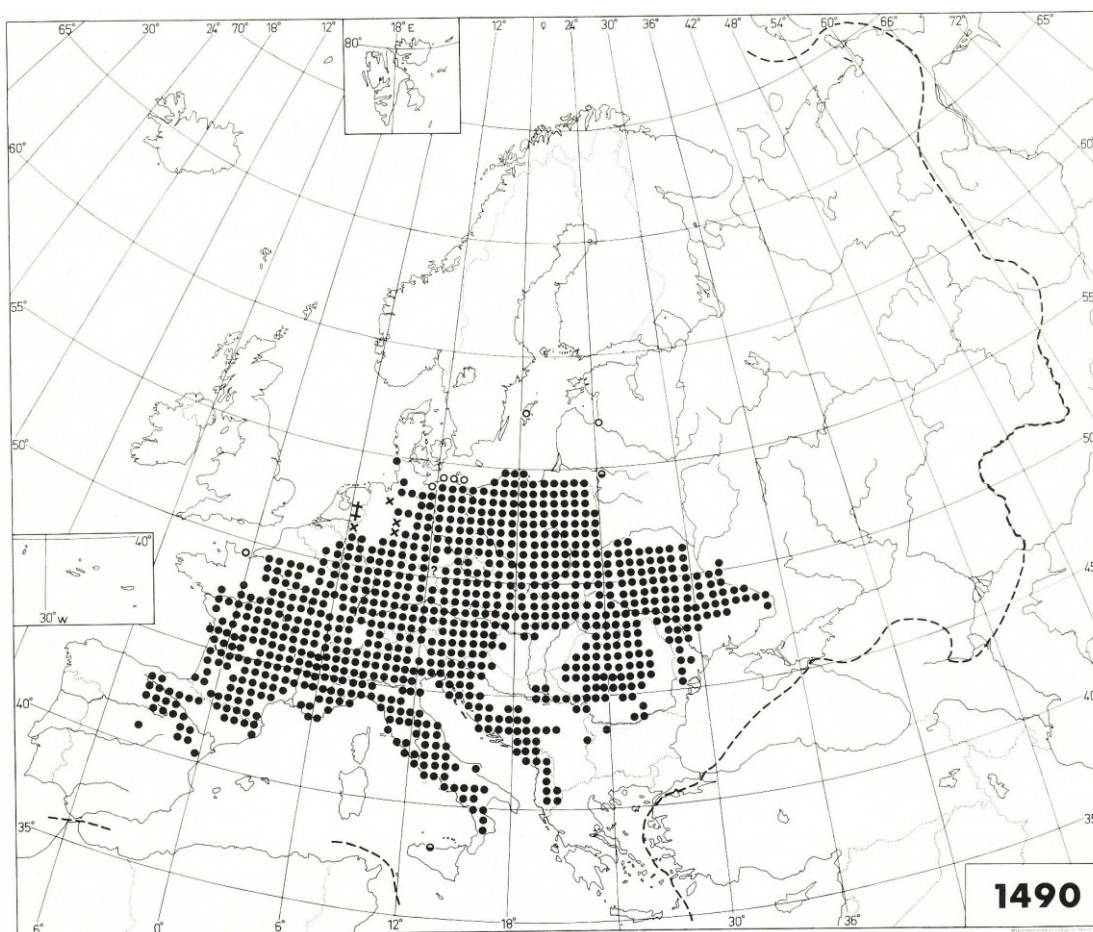
Část druhá:

Evoluční historie *Dianthus carthusianorum* ve střední Evropě

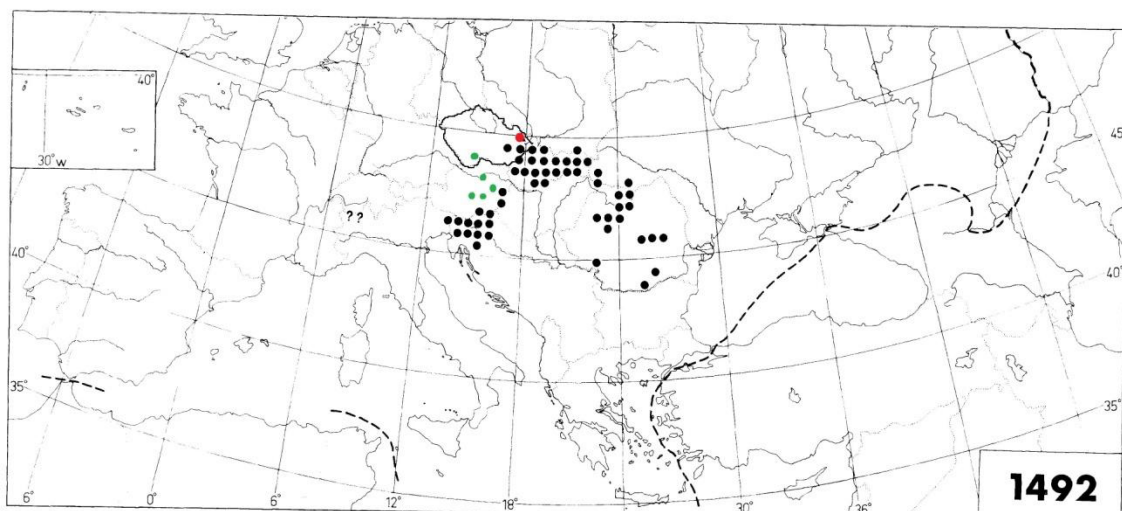
***Dianthus carthusianorum* L.**

Dianthus carthusianorum – hvozdík kartouzek – patří do sekce *Carthusianorum*, která je charakteristická strboulovitým květenstvím. Svou variabilitou, ekologickou plasticitou, širokým areálem rozšíření a s tím spojenou taxonomickou obtížností převyšuje všechny ostatní zástupce rodu *Dianthus* (Novák 1921, Tutin & Walters 1993). Důkazem je velké množství popsanych vnitrodruhových taxonů různých úrovní, které provází nejednotnost v nomenklatuře. U řady těchto taxonů chybí navíc podrobný morfologický popis, což celou situaci ještě ztěžuje a má za následek určování herbářových položek často jen do druhu (Králik 1970). Kromě toho, že valná část popsanych taxonů není v souborných flórách ani udávána (Tutin & Walters 1993), není na mapách rozšíření celého komplexu většina jednotlivých vnitrodruhových taxonů rozlišována (viz mapy na obr. 17 a 18).

Hvozdík kartouzek roste od Pyrenejí po Bělorusko a Rumunsko, na severu po jižní Belgii a polské Pobaltí a na jihu po Alpy (Kovanda 1990). Za vývojové centrum se považuje Balkán (Novák 1915). Dobře rozlišitelné taxony se vyskytují zejména v Alpách, balkánské kartouzky byly dokonce vyčleněny do samostatných druhů, avšak v nížinách je variabilita mnohem více kontinuální a rozdíly mezi populacemi jsou tak méně rozeznatelné (Kovanda 1980).



Obr. 17: Celkové rozšíření *Dianthus carthusianorum* (převzato z Jalas & Suominen 1986).



Obr. 18: Rožšíření *D. carthusianorum* subsp. *latifolius* (černé body), subsp. *sudeticus* (červený bod) a subsp. *capillifrons* (zelené body) (převzato z Jalas & Suominen 1986; upraveno).

Hvozdík kartouzek je vytrvalá, ± trsnatá bylina se ztlustlým, chudě větveným kořenem s vícehlavým oddenkem. Lodyha je přímá nebo krátce vystoupavá, (5-)15-60(-70) cm vysoká, nevětvená, alespoň v horní části hranatá, lysá nebo vzácně v dolní polovině krátce chlupatá, se 4-6 lodyžními články. Listy jsou čárkovité až čárkovitě kopinaté, lodyžní 2-8(-12) cm dlouhé, 0,5-5,0(6,0) mm široké, na okraji drsné, na ploše lysé nebo vzácně krátce chlupaté, špičaté; pochvy jsou 8-19 mm dlouhé. Květenství je strboulovité, 2-10(-15) květů; listeny jsou bylinné až blanité nebo kožovité, kopinaté, dlouze osinaté. Květy jsou přisedlé nebo kratičce stopkaté, nevonné. Podkališní listence jsou vejčité nebo obvejčité, dlouze osinaté, kožovité, hnědé, zděli $\frac{1}{2}$ - $\frac{2}{3}$ kališní trubky. Kalich je trubkovitý, 12-18 mm dlouhý, lysý, zelený, světle hnědý, červenohnědý nebo fialově hnědý, s trojúhelníkovitými, špičatými zuby; čepel korunních lístků klínovitá, nahoře nepravidelně hrubě zubatá nebo vyhlodávaná, (5-)7-12(-15) mm dlouhá, růžová až tmavočervená, na líci ± chlupatá. Tobolka je ± zděli kalicha nebo nepatrně delší. Semena jsou 1,9-2,2 mm dlouhá. (Kovanda 1990).

Dianthus carthusianorum je diploidní ($2n = 30$; Carolin 1957, Löve 1982).

Na území České republiky je *D. carthusianorum* nejběžnějším zástupcem svého rodu, vyskytuje se zde celkem ve čtyřech poddruzích: nominální subsp. *carthusianorum* L. (h. kartouzek pravý, obr. 19), subsp. *latifolius* (GRISEB. et SCHENK) HEGI (h. kartouzek široolistý, obr. 20), endemické subsp. *sudeticus* KOVANDA (h. kartouzek sudetský, obr. 21) a subendemické subsp. *capillifrons* (BORBÁS) NEUMAYER (h. kartouzek hadcový, obr. 22). Jednotlivé poddruhy nemají robustní diakritické znaky (uváděné rozlišovací znaky se týkají barvy a velikosti květu, trsnatosti, počtu květů v květenství a šířce listu; Kovanda 1990), ale liší se spíše geograficky a ekologicky.



Obr. 19: *Dianthus carthusianorum* subsp. *carthusianorum*

Nominátní poddruh se vyskytuje hojně v teplejších oblastech Čech, na jižní a východní Moravě je vzácnější, v Předšumaví a v jihočeských pánvích je velmi vzácný (Kovanda 1990). Roste na výslunných skalách a svazích, na suchých trávnících, skalních stepích a lesních okrajích, v pásmu od nížin do podhůří. Vyskytuje se na suchých, mělkých, skeletovitých, hlinitých, písčítých nebo sprašových půdách se zásaditou, řidčeji neutrální nebo slabě kyselou reakcí. Určovacím znakem pro tento poddruh je tmavěji růžová koruna a ve srovnání se subsp. *latifolius* nižší vzrůst a užší listy (Kovanda 1990).



Obr. 20: *Dianthus carthusianorum* subsp. *latifolius*

Poddruh *latifolius* (obr. 20) roste hojněji na východní Moravě, vzácněji na střední a severní Moravě od nížiny do podhorského stupně. Centrem rozšíření jsou Bílé Karpaty. Ačkoli se jedná o taxon typicky horský, v Hrubém Jeseníku (kde roste subsp. *sudeticus*) chybí a vyskytuje se nejbližší v nížinách Slezska (Kovanda 1980). Od nominátního poddruhu se liší stanovištěm a podložím, vyhledává mezofilní louky a pastviny, stepi a lesostepi, kde roste na hlubokých, bohatých, hlinitých nebo jílovitých půdách, často vápnatých se zásaditou nebo neutrální reakcí. Od předešlého poddruhu se liší statnějším vzrůstem a širšími listy (Kovanda 1990), ale jsou známy morfologické přechody (Kovanda 1980). Poddruh *latifolius*, rostoucí na území Karpat, jako vápnomilná rostlina vikarizuje s nominátním poddruhem; v Panonské oblasti jej zastupuje *Dianthus pontederæ* (Králik 1970).

Poddruh *capillifrons* má na rozdíl od předešlých dvou taxonů nesouvislý areál, který vyplývá z jeho vazby na hadcový substrát⁵. V ČR roste na lokalitě zvané Na hadcích 1 km od Raškova (severní Morava) na zalesněných stráních, ve výšce 550 m n. m., dále pak na hadcích mezi Křemží a Dívčím kamenem (jižní Čechy) a na Borovsku u Trhového Štěpánova a pravděpodobně také na hadcích u Mladé Vožice. Mimo náš stát roste také v Rakousku (ve Štýrsku a Burgenlandu), odkud byl popsán v roce 1889 Borbásem (Vinter et al. 2001). Tento hvozdík se vyskytuje jak na výslunných travnatých stráních a skalkách, tak i na stinnějších stanovištích v borových lesích (Kolář & Vít 2008). Od předešlých poddruhů se liší světlejší růžovou barvou koruny, menšími květy, užšími listy a celkově menším vzrůstem (obr. 21; Kovanda 1990).



Obr. 21: *Dianthus carthusianorum* subsp. *capillifrons*

⁵ Hadec (serpentinit) je hornina charakteristická nízkým obsahem základních prvků (dusík, fosfor, hořčík a vápník) a naopak vysokým obsahem hořčíku, železa, manganu a těžkých kovů. Hadcové podloží má obvykle specifické druhové zastoupení, odlišné od okolního a s vyšším počtem úzce rozšířených taxonů.

Poddruh *sudeticus* byl jako endemický taxon Velké Kotliny v Hrubém Jeseníku popsán až v roce 1980 M. Kovandou, který tuto populaci odlišil od subsp. *latifolius*. Hlavní znak pro jeho odlišení byla světlejší růžová barva koruny (horské taxony hvozdíku kartouzku, ke kterým patří i subsp. *latifolius*, mají bez výjimky tmavší korunu; obr. 22; Kovanda 1980). Kovanda jej dává do příbuzenstva var. *alpestris* (NEILR.) HEGI z východních Alp, s nímž je spojen přechodnými typy. Morfologické přechody mezi subsp. *sudeticus* a subsp. *latifolius* naopak dle Kovandy chybí (Kovanda 1980) a oba poddruhy se v Jeseníkách nestýkají. Jesenícký poddruh nejspíše vznikl diferenciací z některého alpského morfotypu kartouzku, jenž kolonizoval východní Sudety během některé z dob ledových, naopak vznik ze subsp. *latifolius* či subsp. *carthusianorum* se zdá méně pravděpodobný (Kovanda 1980). Ve Velké Kotlině roste tento hvozdík na slunných skalách, jižně a jiho-východně orientovaných a tvořených převážně grafitickými fylity, v nichž se občas vyskytují vložky karbonátových břidlic (Kovanda 1980; Procházka et al. 1999). Populace čítá jen několik desítek jedinců (asi 150), ale zdá se být stabilní, je však poškozována introdukovanými kamzíky (Procházka et al. 1999).



Obr. 22: *Dianthus carthusianorum* subsp. *sudeticus*

***Dianthus pontederæ* KERNER**

Do okruhu hvozdíku kartouzku patří také *Dianthus pontederæ* KERNER – hvozdík Pontederův – který se s hvozdíkem kartouzkiem často zaměňuje. Proto byl dříve považován jen za jeho další poddruh (*D. carthusianorum* subsp. *pontederæ* (KERNER) HEGI).

Roste v panonské oblasti střední a jihovýchodní Evropy. V ČR roste na jižní Moravě, ale taxonomická příslušnost zdejších rostlin k tomuto druhu není zcela jasná. Problematická je také např. populace z mohelenských hadců je někdy řazena do samostatného taxonu *Dianthus sabuletorum* subsp. *serpentini* (PODP.) HOLUB (Kovanda 1990). Vyskytuje se na skalních stepích, lesostepích a pastvinách, druhotně také podél železničních tratí od nížin po pahorkatiny, kde roste na hlinitých nebo písčítých, minerálně bohatých půdách (Kovanda 1990).

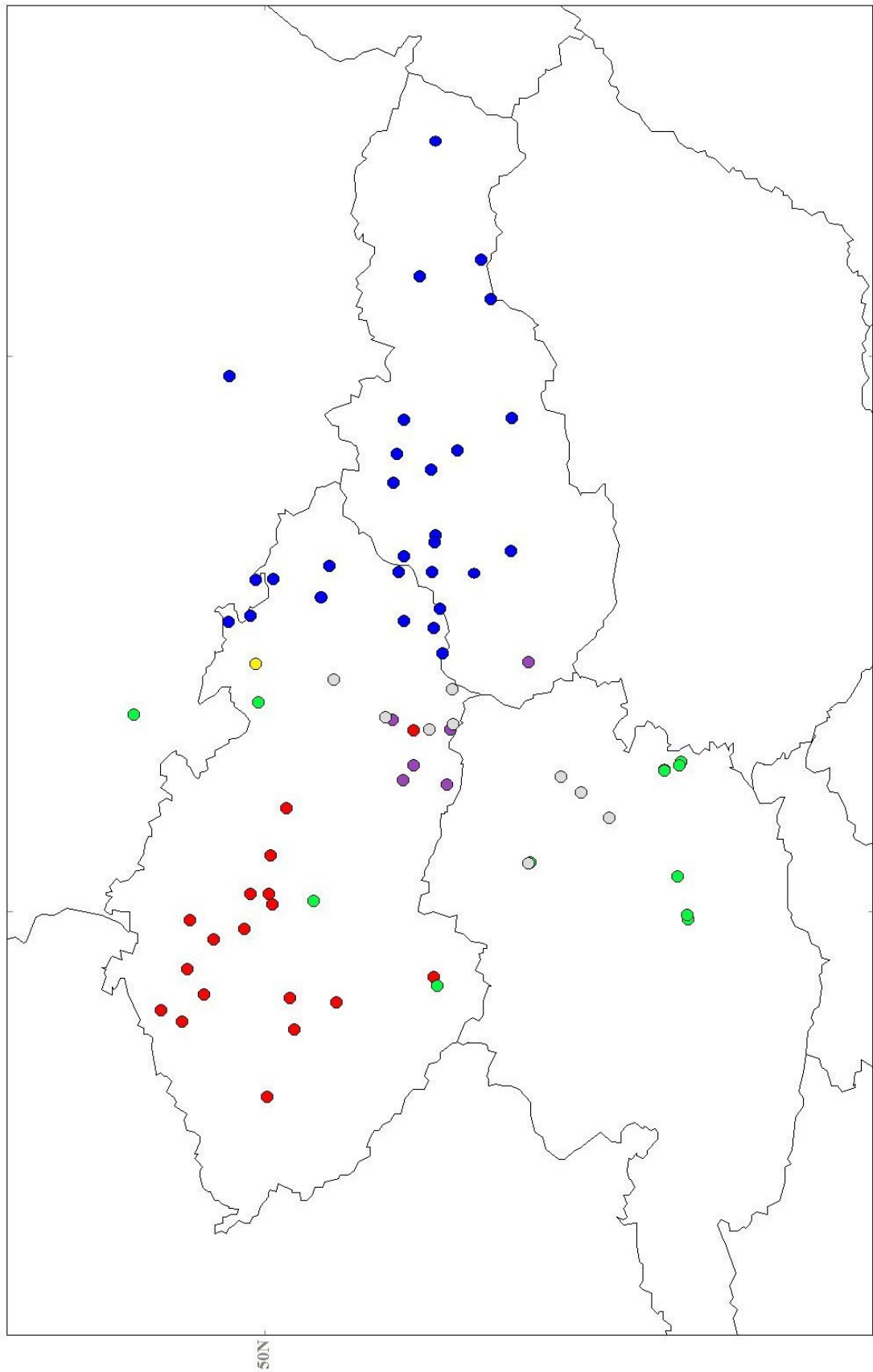
Hvozdík Pontederův je vytrvalá, trsnatá bylina, 15–40 cm vysoká, lodyha je přímá, nevětvená, lysá, listy jsou čárkovité. Květenství je strboulovitě stažené, 6–15(–20)květé, husté, listeny jsou vejčité, krátce osinaté, blanité, květy jsou přisedlé. Podkališní listence jsou vejčité, zašpičatělé až osinaté, kalich je trubkovitý, lysý, čepel korunních lístků je klínovitá, nahoře pravidelně zubatá, syté růžová. Od *D. carthusianorum* se liší kratší nebo chybějící osinou na konci podkališních listenců a menšími květy.

Terénní práce a odběr vzorků

Rostlinný materiál byl sbírán v letech 2010-2011. Historické i současné lokality z České republiky byly získány z databáze floristické dokumentace (FLDOK, Botanický ústav AVČR, v.v.i., Průhonice) a České národní fytoecnologické databáze (ČNFD, Masarykova univerzita, Brno). Lokality z Rakouska pro hadcový poddruh *capillifrons* byly vybrány zejména podle Neumayer (1930) a Egglar (1963). Lokality ze Slovenska byly získány z botanicky zaměřených webových stránek. Celkem bylo nasbíráno 779 rostlin ze 75 lokalit. Jejich přehled a geografická lokalizace jsou v tabulce v příloze a na obr. 23.

Ačkoli je hvozdík kartouzek trsnatá rostlina, sbírána byla vždy jen jedna kvetoucí lodyha těsně u země, nikoli celý trs. Vzhledem k ohroženosti některých taxonů tak nebyla zmenšena velikost populace ani výrazně snížena produkce semen. Ve většině případů bylo náhodně sbíráno 10 rostlin z populace pro poddruhy *carthusianorum* a *latifolius* a 20 rostlin pro poddruh *capillifrons*. Z jediné lokality poddruhu *sudeticus* (Velká Kotlina) bylo získáno 35 rostlin (s ohledem na velikost populace). Zástupci poddruhu *capillifrons* byli sbíráni na všech známých lokalitách v ČR a v Rakousku. Navíc byla k tomuto poddruhu přiřazena také jedna populace z Polska (Radunia), která rovněž osidlovala hadcový substrát a morfologicky odpovídala ssp. *capillifrons*, přestože výskyt tohoto poddruhu nebyl v Polsku udáván. Kontaktní zóna poddruhů *carthusianorum* a *latifolius* prochází Moravou, proto byly tyto poddruhy sbírány kromě této oblasti zejména v místech výskytu jen jednoho z obou poddruhů (Slovensko pro poddruh *latifolius* a střední a severní Čechy pro poddruh *carthusianorum*). Do analýz bylo kvůli srovnání zařazeno i několik populací blízkého druhu *Dianthus pontederæ* z jižní Moravy. Několik lokalit zůstalo bez jednoznačně určeného druhu či poddruhu; nejčastěji šlo o nejasnost v rozlišení poddruhů *latifolius* a *carthusianorum* nebo rozlišení posledního uvedeného poddruhu od *D. pontederæ*.

Pro každou lokalitu byly zaměřeny její zeměpisné souřadnice a nadmořská výška pomocí systému GPS (eTrex Summit, Garmin). Z nasbíraných rostlin bylo odebráno několik listů a uloženo do silikagelu pro molekulární analýzy. Část listu byla použita pro cytometrické analýzy. Z každé rostliny byl rovněž odebrán jeden květ na morfometrické zpracování (viz. příslušná kapitola) a zbylá rostlina byla zaherbářována jako dokladový materiál a na následná měření. Herbářové položky budou uloženy v herbáři Přírodovědecké fakulty UK (PRC).



Obr. 23: Mapa sběrů *D. carthusianorum* a *D. pontederæ*. Legenda: *D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum* (červeně), subsp. *latifolius* (modře), subsp. *capillifrons* (zeleně), subsp. *sudeticus* (žlutě), *D. pontederæ* (fialově) a fenotypově přechodné populace (šedě).

Průtoková cytometrie

Metodika

K ověření stupně ploidie a relativní velikosti jaderného genomu byly téměř všechny sebrané rostliny (733 ze 779) podrobeny cytometrické analýze (barvivo DAPI, směsné vzorky po 2-5 jedincích). U 67 populací byla navíc změřena absolutní velikost genomu pro jednu rostlinu z populace. Pro každý poddruh *D. carthusianorum* byla alespoň jedna rostlina změřena 3x ve třech různých dnech k určení absolutní velikosti genomu. Metodika analýz (včetně použitého standardu) je shodná s částí I. (viz str. 17).

Statistické zpracování dat

Analýza histogramů byla provedena v programu Partec FloMax 2.4b. Pro hodnocení variability ve velikosti genomu byly použity jen kvalitní analýzy s nízkým CV (variační koeficient; do 3%). Data byla statisticky zpracována v programech R 2.9.2. (krabicové diagramy) a SAS 9.1 (procedura GLM a CORR). Procedura GLM (General Linear Model) testuje rozdíly ve velikosti genomu jednotlivých taxonů. Jedná se o modifikovanou analýzou rozptylu (ANOVA), která porovnává průměry a rozptyl, a je robustní vůči rozdílným velikostem skupin. Jako hranice rozdílnosti byla zvolena hladina $\alpha = 5\%$. Procedurou CORR byla testována korelace mezi velikostí genomu a zeměpisnou šířkou či délkou.

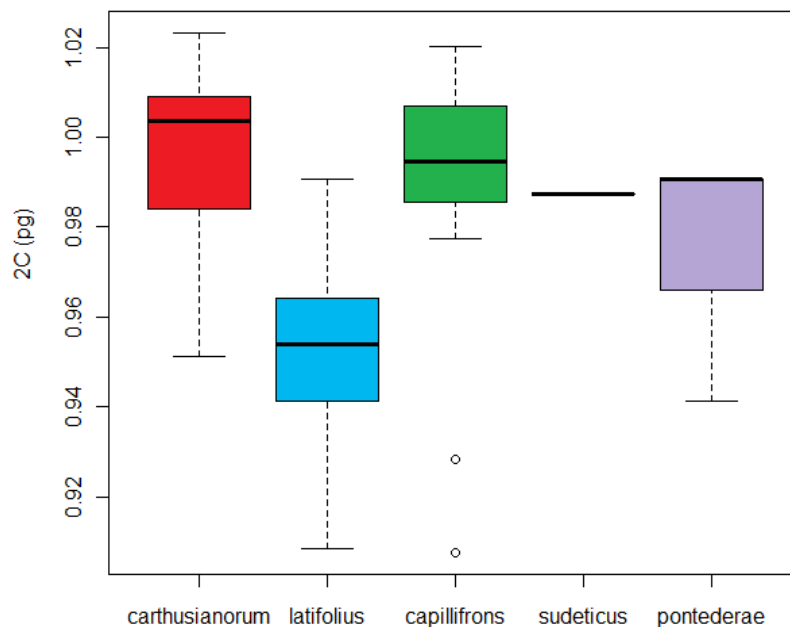
Výsledky

Měření relativní velikosti genomu 733 jedinců potvrdilo, že *D. carthusianorum* a *D. pontederiae* jsou diploidní druhy (DNA ploidie; Suda et al. 2006). Výjimkou byl jeden triploidní jedinec z Holubovských hadců (*D. carthusianorum* subsp. *capillifrons*) vzniklý s největší pravděpodobností za účasti neredukované gamety jednoho z rodičů.

Průměrné velikosti genomu pro jednotlivé taxony jsou shrnuty v tab. 15 (s vyloučením údajů pro taxonomicky nezařazené populace). Z výsledků je zřejmé, že se jednotlivé taxony liší ve velikosti genomu jen nepatrně (< 4,2%). Ačkoli rozdíly mezi jednotlivými taxony jsou ve většině případů statisticky průkazné (viz tab. 16), vzhledem ke značnému překryvu hodnot (patrné např. z krabicových diagramů; obr. 24) není možné velikost genomu použít jako diskriminační znak pro jednotlivé taxony. Relativně nejvíce se liší poddruhy *carthusianorum* a *latifolius* (v průměru o 4,2%).

Tab. 15: Absolutní velikosti genomu v pikogramech. 2C = obsah DNA somatických buněk, CV = variační koeficient píků vzorku, SD = směrodatná odchylka, N = počet analyzovaných jedinců.

	průměrné 2C (pg)	SD	min	max	průměrné CV	N
<i>D. carthusianorum</i> subsp. <i>carthusianorum</i>	0.99	0.02	0.95	1.02	2.60	19
<i>D. carthusianorum</i> subsp. <i>latifolius</i>	0.95	0.02	0.91	0.99	2.85	26
<i>D. carthusianorum</i> subsp. <i>capillifrons</i>	0.99	0.03	0.91	1.02	2.79	12
<i>D. carthusianorum</i> subsp. <i>sudeticus</i>	0.99	-	0.99	0.99	2.92	3
<i>D. pontederæ</i>	0.97	0.03	0.94	0.99	2.48	3



Obr. 24: Srovnání velikosti genomu (v pg) jednotlivých taxonů (první čtyři taxony jsou poddruhy *C. carthusianorum*, poslední představuje *D. pontederæ*). *D. carthusianorum* subsp. *sudeticus* má jedinou populaci, proto je zobrazena jediná hodnota velikosti genomu. Dvě odlehle hodnoty u subsp. *capillifrons* představují populace Raškov a Aggsbach-Dorf-Mitterbachgraben.

Tab. 16: Statistická průkaznost rozdílů ve velikosti genomu mezi jednotlivými dvojicemi taxonů testována procedurou GLM v programu SAS. Statisticky průkazné hodnoty jsou označeny tučně.

	<i>D. carthusianorum</i> subsp. <i>carthusianorum</i>	<i>D. carthusianorum</i> subsp. <i>latifolius</i>	<i>D. carthusianorum</i> subsp. <i>sudeticus</i>	<i>D. carthusianorum</i> subsp. <i>capillifrons</i>
<i>D. carthusianorum</i> subsp. <i>carthusianorum</i>				
<i>D. carthusianorum</i> subsp. <i>latifolius</i>	<.0001			
<i>D. carthusianorum</i> subsp. <i>sudeticus</i>	0.0006	<.0001		
<i>D. carthusianorum</i> subsp. <i>capillifrons</i>	<.0001	<.0001	0.0698	
<i>D. pontederae</i>	<.0001	0.0025	0.2038	0.9989

Vzhledem k relativně velké variabilitě ve velikosti genomu v rámci jednotlivých poddruhů (až 12,09% pro subsp. *capillifrons*; viz také hodnoty minima a maxima v tab. 15 nebo krabicové diagramy na obr. 24) byla testována korelace velikosti genomu s geografí (zeměpisná šířka a délka). Nemůžeme ale také vyloučit, že je tento jev způsoben variabilitou přesnosti přístroje či absencí třech různých měření u většiny vzorků, která by potvrdila stabilitu absolutní velikosti genomu vzorku. Jako signifikantní vyšla pouze korelace velikosti genomu *D. carthusianorum* subsp. *capillifrons* se zeměpisnou šířkou (tab. 17). Přesto však není pravděpodobně tento výsledek možné považovat za trend („velikost genomu subsp. *capillifrons* se mění ve směru západo-východním“), jelikož má tento poddruh nesouvislý areál a měl ho nejspíš – vzhledem ke své vazbě na hadec – i v minulosti a jednotlivé populace tedy nejspíš vznikly nezávisle.

Tab. 17: Korelace velikosti genomu poddruhů *carthusianorum*, *latifolius* a *capillifrons* se zeměpisnou šířkou a délkou. Uvedeny jsou Spearmanovy koeficienty a jejich *p* hodnoty v závorkách. Tučně jsou zvýrazněny signifikantní hodnoty. N = počet analyzovaných jedinců.

poddruh	N	zeměpisná šířka	zeměpisná délka
<i>carthusianorum</i>	17	0.06185 (0.8136)	0.08287 (0.7518)
<i>latifolius</i>	27	-0.17118 (0.3933)	0.27144 (0.1708)
<i>capillifrons</i>	11	-0.65604 (0.0284)	-0.51936 (0.1016)

Morfometrika

Metodika

Do morfometrických analýz bylo zahrnuto 724 rostlin (ze 779 nasbíraných). Vzhledem k tomu, že v určovacích klíčích existuje jen málo diakritických znaků odlišujících všechny čtyři studované poddruhy (a část z nich se navíc týká barvy květů či trsnatosti), bylo vytipováno co možná největší množství měřitelných znaků na generativních (15) i vegetativních (13) částech. Z těchto znaků je 26 kvantitativních a 2 poměrové (jejich přehled viz tab. 18). Barva květu nebyla kvůli velmi jemným rozdílům v odstínech do analýz zahrnuta, stejně tak jako trsnatost kvůli obtížnému hodnocení a vysoké vnitropopulační variabilitě.

Ihned po sběru byl 1 květ z každé rostliny odebrán a jeho jednotlivé části nalepeny na čtvrtku papíru pro pozdější měření (viz příloha 5). Vegetativní znaky byly měřeny na herbářové položce. Výška lodyhy byla měřena plastovým pravítkem (přesnost 1 mm) a zbytek kvantitativních znaků pomocí digitálního posuvného měřítka (přesnost 0,01 mm). U každé rostliny byl také zaznamenán typ květu (hermafroditní/samičí). Vzhledem k velké variabilitě i v rámci květů stejného pohlaví byly v analýzách ponechány i samičí rostliny (které mívají v průměru menší koruny; Rohweder 1934). Nejdříve byla však pro kontrolu provedena analýza PCA bez těchto samičích jedinců, její výsledky se však nijak výrazně nelišily od výsledků získaných analýzou celého datového souboru (data nezobrazena).

Statistické zpracování dat

Stejně jako v části týkající se *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus* byla morfometrická data zpracována v programu SAS (verze 9.1, SAS Institute 2003). Byly vypočteny základní popisné statistiky a korelační matice. Pro zjištění základní struktury v datech byly provedeny různé varianty analýzy hlavních komponent (PCA) a také kanonická diskriminační analýza (CDA; detaily všech procedur viz str. 28). Chybějící znaky byly nahrazeny populačním průměrem daného znaku pro příslušný poddruh, přičemž počet jedinců s chybějícími znaky byl vždy výrazně nižší než počet jedinců bez chybějících dat.

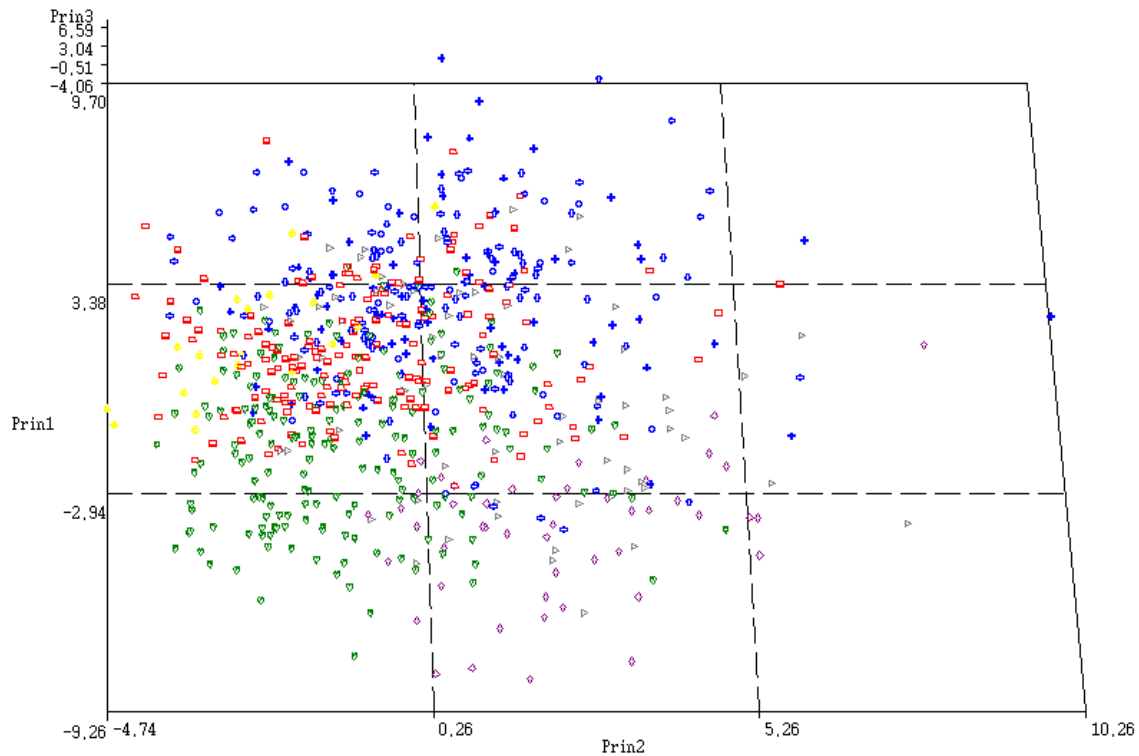
Tab. 18: Přehled měřených/počítaných morfologických znaků.

číslo znaku	kód v SAS	znak	jednotka
1	v4	délka lodyhy	cm
2	v5	počet uzlů na lodyze	počet
3	v6	délka dolního listu	mm
4	v7	šířka dolního listu	mm
5	v8	délka listové pochvy dolního listu	mm
6	v9	délka prostředního listu	mm
7	v10	šířka prostředního listu	mm
8	v11	délka listové pochvy prostředního listu	mm
9	v12	délka horního listu	mm
10	v13	šířka horního listu	mm
11	v14	délka listové pochvy horního listu	mm
12	v15	průměrná délka listu	mm
13	v16	průměrná šířka listu	mm
14	v17	délka vnitřního podkališního listence	mm
15	v18	šířka vnitřního podkališního listence	mm
16	v19	poměr š./d. vnitřního podkališního listence	poměr
17	v20	délka vnějšího podkališního listence	mm
18	v21	šířka vnějšího podkališního listence	mm
19	v22	poměr š./d. vnějšího podkališního listence	mm
20	v23	výška kalichu	mm
21	v24	obvod kalichu	mm
22	v25	poměr š./o. kalichu	poměr
23	v26	výška kališních zubů	mm
24	v27	délka korunního lístku	mm
25	v28	délka nehtu korunního lístku	mm
26	v29	délka čepele korunního lístku	mm
27	v30	šířka čepele korunního lístku	mm
28	v31	počet květů v květenství	počet

Výsledky

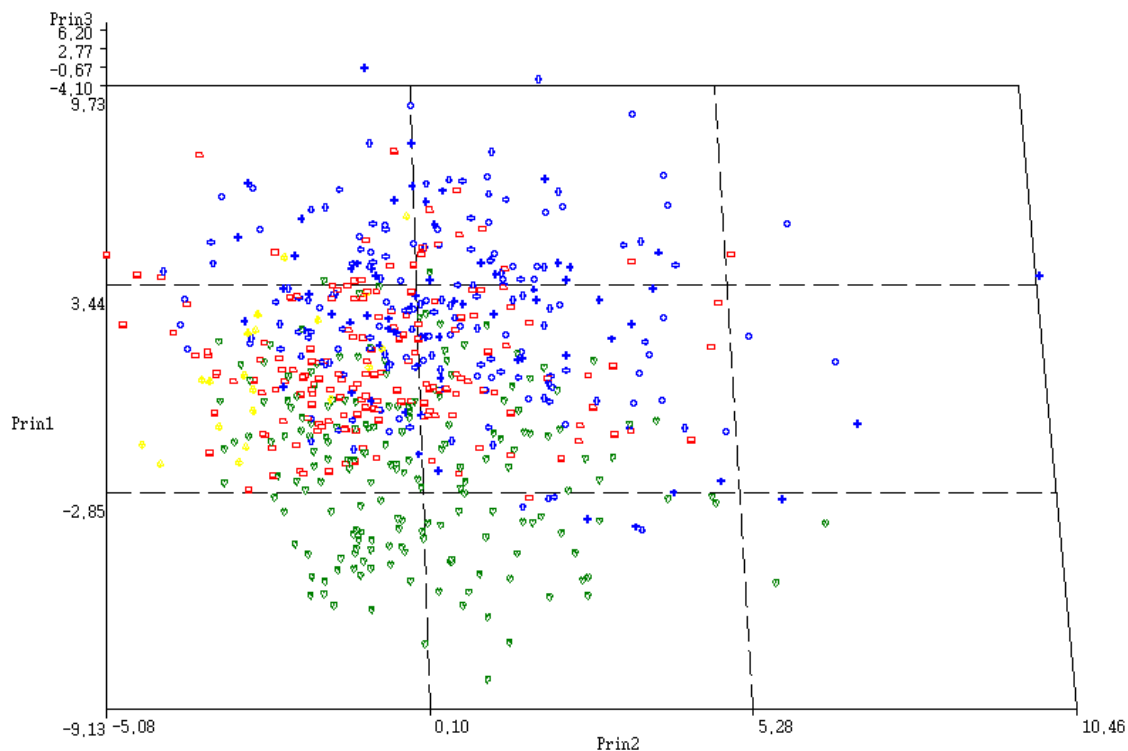
Souhrn základních statistik (průměr, minimum, maximum, 5% a 95% kvantil) pro celý datový soubor bez nezařazených populací (populace s přechodnými znaky mezi taxony) je v součásti elektronické přílohy. Podle Shapiro-Wilkova testu nemá 16 z 28 znaků normální rozdělení; dále byly proto použity neparametrické metody. Podle korelační matice znaků vypočtené na základě neparametrického Spearmanova koeficientu není žádná dvojice znaků v těsné korelaci (tzn. rovna či vyšší než 0,95; Marhold & Suda 2002), proto mohly být všechny znaky ponechány v diskriminační analýze.

Již v PCA s použitím celého datového souboru je patrný určitý trend (obr. 25). Žádná skupina se sice viditelně neodděluje od zbytku, avšak tvoří ve všech případech více či méně kompaktní shluky, což naznačuje kontinuální variabilitu všech taxonů.



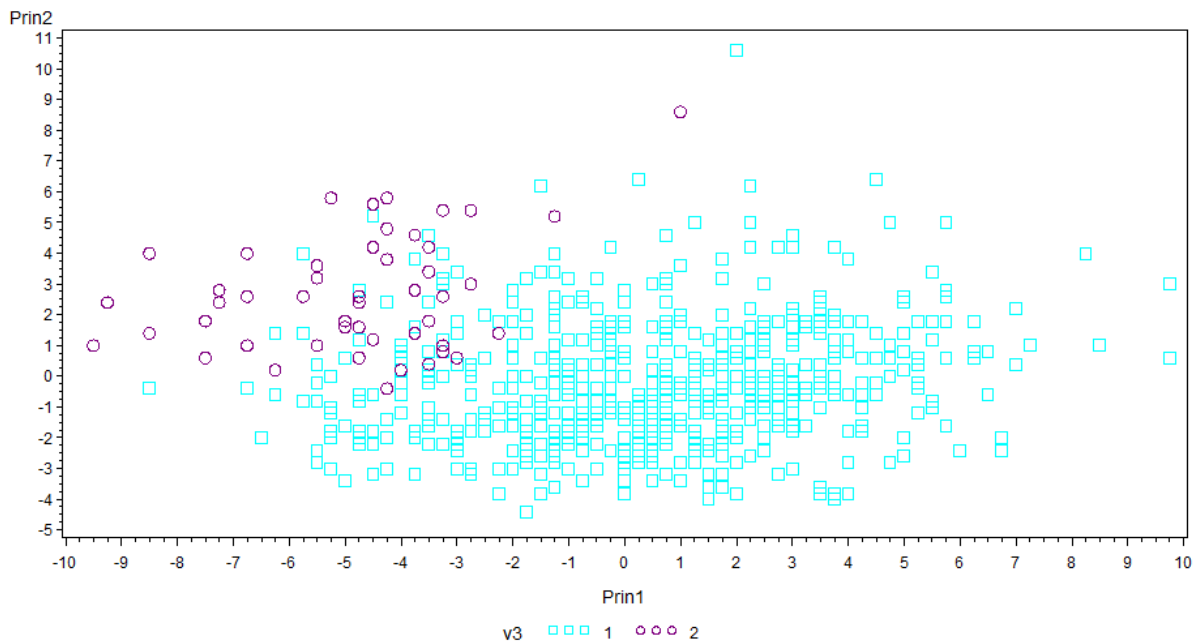
Obr. 25: PCA zobrazující fenotypové podobnosti 724 jedinců všech studovaných taxonů s použitím všech 28 znaků. Červeně *D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum*, modře subsp. *latifolius*, zeleně subsp. *capillifrons*, žlutě subsp. *sudeticus*, fialově *D. pontederiae* a šedě nezařazené populace s přechodným fenotypem. Jednotlivé osy vysvětlují 35,2%, 16,6%, 10,3% variability.

Jelikož se v prvotní PCA relativně nejlépe oddělil *D. pontederiae*, byla následně pro náhled do fenotypových vztahů mezi jednotlivými poddruhy *D. carthusianorum* provedena PCA jen s těmito taxony a bez nezařazených populací (obr. 26). Zatímco poddruhy *carthusianorum*, *latifolius* a *capillifrons* se od sebe oddělují podél první osy, subsp. *sudeticus* se od nich odděluje podél osy druhé. I zde se ukazuje, že jsou si jednotlivé poddruhy feneticky velice blízké. Vysvětlením však také může být příliš velké množství znaků, kterými se stírá vliv potenciálně důležitých pro oddělení jednotlivých skupin (PCA neváží jednotlivé znaky, tzn. všechny přispívají stejnou měrou k tvorbě komponentních os).



Obr. 26: PCA pro všechny 4 studované poddruhy *D. carthusianorum* (bez nezařazených populací a *D. pontederiae*) s použitím všech 28 znaků. Červeně subsp. *carthusianorum*, modře subsp. *latifolius*, zeleně subsp. *capillifrons* a žlutě subsp. *sudeticus*. Jednotlivé osy vysvětlují 33,3%, 15,1% a 11,2% variability.

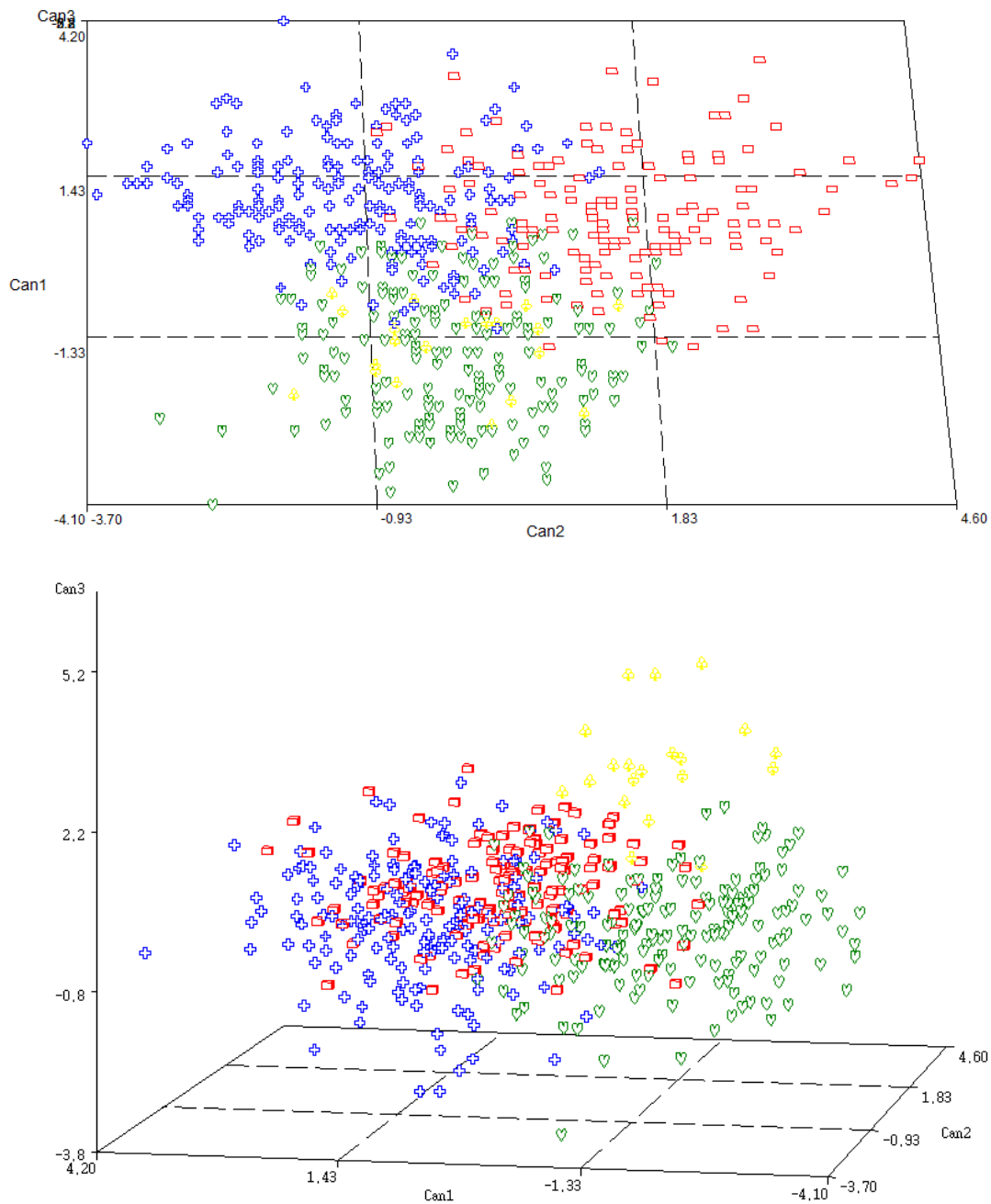
Pro lepší vizualizaci fenotypových vztahů mezi *D. carthusianorum* (jako celku, bez rozlišených poddruhů) a *D. pontederiae* byla provedena samostatná PCA analýza jen s těmito dvěma druhy (obr. 27). Z výsledků je patrné, že ačkoli oba druhy sice tvoří relativně kompaktní shluky, z velké míry je *D. pontederiae* fenotypově podobný s několika jedinci *D. carthusianorum*. Při samostatné analýze *D. pontederiae* a *D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum*, kteří obvykle rostou geograficky nejblíže a mohli by být zaměňováni, došlo k výraznému oddělení obou taxonů, což potvrzuje jejich dobrou morfologickou diferenciaci (data nezobrazena). Jedinci h. kartouzku, kteří jsou podobní h. Pontederovu (obr. 27), představují ve skutečnosti jedince z hadcových populací (subsp. *capillifrons*), které mají menší vzrůst a květy, podobně jako *D. pontederiae* (překryv obou skupin je patrný z PCA všech skupin, obr. 25).



Obr. 27: PCA pro *D. pontederae* (fialově) a *D. carthusianorum* (všechny studované poddruhy; tyrkysově) s použitím všech 28 znaků. Jednotlivé osy vysvětlují 36,0% a 16,1% variability.

Dále byly použity diskriminační analýzy pro odhalení taxonově-specifických znaků. Aby však bylo zabráněno definici taxonů kruhem, byly pro diskriminační analýzy ponechány pouze populace, které jsou dostatečně vymezeny geograficky či ekologicky, tzn. všechny hadcové populace (subsp. *capillifrons*), populace z Velké Kotliny (subsp. *sudeticus*) a dále populace, které nebyly z kontaktní zóny poddruhů *carthusianorum* a *latifolius* na jižní a střední Moravě a v severním Rakousku (tedy populace ze středního a východního Slovenska a z území Čech). Do diskriminačních analýz nebyl dále zahrnut *D. pontederae*, který není možné jednoznačně definovat podle výše uvedených kritérií jako skupinu. Vypuštěny byly také nezařazené populace, ve kterých se nacházejí přechodné morfotypy. Celkem bylo pro diskriminační analýzy ponecháno 569 jedinců z 51 populací.

V CDA všech poddruhů *D. carthusianorum* tvoří jednotlivé poddruhy ± oddělené kompaktní shluky, opět ale s určitým překryvem (obr. 28). Podél první kanonické osy se společně oddělují poddruhy *latifolius* a *carthusianorum* vůči poddruhům *capillifrons* a *sudeticus*; nejtěsněji korelované znaky s touto osou jsou (v pořadí; viz tab. 19): *délka lodyhy* (v4), *délka listové pochvy prostředního listu* (v11), *počet květů v květenství* (v31) a *průměrná šířka listu* (v16). Tento výsledek je v souladu s publikovanými údaji, tj. že rostliny z hadců a Velké Kotliny jsou v průměru nižší, mají chudší květenství a užší listy. Podél 2. osy se oddělují poddruhy *carthusianorum* a *latifolius*; nejtěsněji korelované znaky s touto osou jsou: *délka prostředního listu* (v9), *průměrná délka listu* (v12) a *šířka prostředního listu* (v10). Tento výsledek opět odpovídá hlavnímu znaku v určovacích klíčích, kterým je délka a šířka listu. Podél 3. osy se odděluje subsp. *sudeticus* od zbylých poddruhů. Znaky, které jsou s touto osou nejtěsněji korelované jsou *délka nehtu korunního lístku* (v28) a *délka korunního lístku* (v27). Tento výsledek opět odráží hlavní uváděný diakritický znak pro tento poddruh, kterým je větší velikost květu.



Obr. 28: CDA pro všechny poddruhy *D. carthusianorum* (červeně subsp. *carthusianorum*, modře subsp. *latifolius*, zeleně subsp. *capillifrons* a žlutě subsp. *sudeticus*) s použitím všech 28 znaků. Jednotlivé osy vysvětlují 52,6%, 35,8% a 11,6% variability. Diagramy představují pohled na tutéž analýzu ze dvou různých pohledů.

Tab. 19: Kanonické korelační koeficienty pro analýzu všech poddruhů *D. carthusianorum* s použitím všech znaků. Tučně jsou označeny kódy znaků (a odpovídající hodnoty koeficientů), které nejvíce přispívají k oddělení skupin (poddruhů).

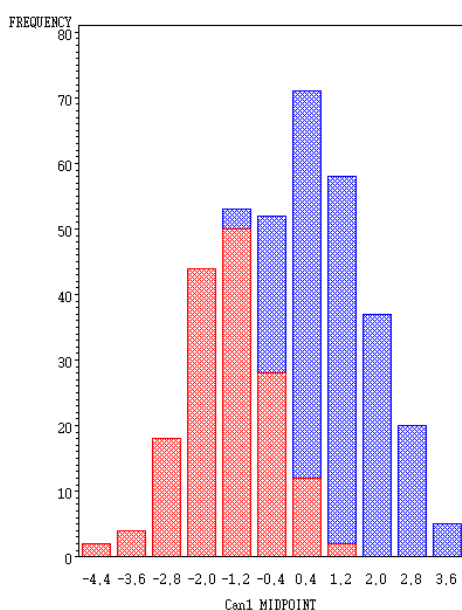
kód znaku	Can1	Can2	Can3	kód znaku	Can1	Can2	Can3
v4	0.721036	-0.193845	-0.093662	v18	0.521598	0.032492	0.239659
v5	0.483472	-0.112119	-0.124026	v19	0.072972	0.289328	-0.106979
v6	0.516995	0.379954	0.074946	v20	0.518260	-0.342812	0.260999
v7	0.494179	-0.293332	0.083490	v21	0.564215	-0.076952	0.108442
v8	0.498604	-0.368261	0.223348	v22	0.139350	0.285857	-0.160415
v9	0.337676	-0.530531	0.060559	v23	0.529542	0.137790	0.429959
v10	0.599604	-0.430265	0.159561	v24	0.371464	0.192781	0.439470
v11	0.700039	-0.381794	-0.074417	v25	-0.077675	0.062743	0.031827
v12	0.058650	-0.443325	0.264935	v26	0.293678	0.058248	0.106078
v13	0.473354	-0.161131	0.196467	v27	0.238381	0.314166	0.655300
v14	0.436718	-0.214056	0.031782	v28	0.238547	0.171709	0.629910
v15	0.517971	-0.128328	0.142031	v29	0.176924	0.394152	0.515522
v16	0.613715	-0.360932	0.163070	v30	0.275780	0.299400	0.374575
v17	0.547159	-0.247735	0.368032	v31	0.617085	0.052444	-0.054176

Z výsledků následující klasifikační diskriminační analýzy (s parametrem $k=16$ nejbližších sousedů) všech poddruhů *D. carthusianorum* (tab. 20) vyplývá, že na základě použitých znaků lze určit jedince do poddruhu jen s relativně velkou chybovostí a to zejména u subsp. *sudeticus*, kdy bylo 58 jedinců chybně přiřazeno k tomuto poddruhu. U poddruhů *carthusianorum* a *latifolius* byla cca jedna pětina jedinců chybně zařazena. Nejvyšší úspěšnost správného zařazení je u subsp. *capillifrons*. Analýza také nedokázala klasifikovat 2 jedince do žádné ze čtyř kategorií.

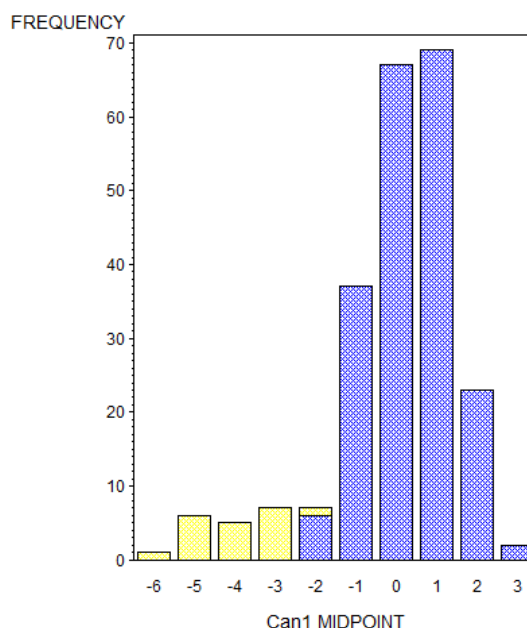
Tab. 20: Klasifikační diskriminační analýza všech 4 studovaných poddruhů *D. carthusianorum* (subsp. *carthusianorum*, subsp. *latifolius*, subsp. *capillifrons* a subsp. *sudeticus*) s použitím všech znaků. Řádky označují skutečnou příslušnost objektu ke skupině, sloupce klasifikaci na základě diskriminační funkce. Uveden je vždy absolutní počet jedinců a jejich procentuální vyjádření. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při parametru $k = 16$ nejbližších sousedů.

Z taxonu	přiřazeno k taxonu					celkem
	<i>carthusianorum</i>	<i>latifolius</i>	<i>capillifrons</i>	<i>sudeticus</i>	jiný	
<i>carthusianorum</i>	122 76.25%	21 13.13%	5 3.13%	12 7.50%	0 0.00%	160 100.00%
<i>latifolius</i>	19 9.31%	164 80.39%	5 2.45%	16 7.84%	0 0.00%	204 100.00%
<i>capillifrons</i>	15 8.11%	18 9.73%	120 64.86%	30 16.22%	2 1.08%	185 100.00%
<i>sudeticus</i>	0 0.00%	0 0.00%	1 5.00%	19 95%	0 0.00%	20 100.00%
celkem	156 27.42%	203 35.68%	131 23.02%	77 13.53%	2 0.35%	569 100.00%
chybně zařazených	34 21.79%	39 19.21%	11 8.40%	58 75.34%	2 100%	

Pro poddruhy *carthusianorum* a *latifolius*, které rostou nejtěsněji v kontaktu (např. kontaktní zóna na jižní Moravě), byla provedena samostatná CDA (bez zahrnutí populací z této kontaktní zóny; obr. 29). Výsledky potvrzují pozorované fenotypové kontinuum mezi těmito poddruhy, ačkoli do analýzy nebyly zahrnuty populace z kontaktní zóny. Znaky, které nejvíce oddělují obě skupiny, odpovídají znakům uváděným v určovacích klíčích: *délka prostředního listu* (v9), *šířka prostředního listu* (v10) a *délka listové pochvy prostředního listu* (v11). Podle výsledků klasifikační analýzy (při parametru $k = 25$) byla úspěšnost správného určení do poddruhu *carthusianorum* 88,75% a do poddruhu *latifolius* 87,25%.



Obr. 29: CDA pro *D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum* (červeně) a subsp. *latifolius* (modře) s použitím všech 28 znaků.

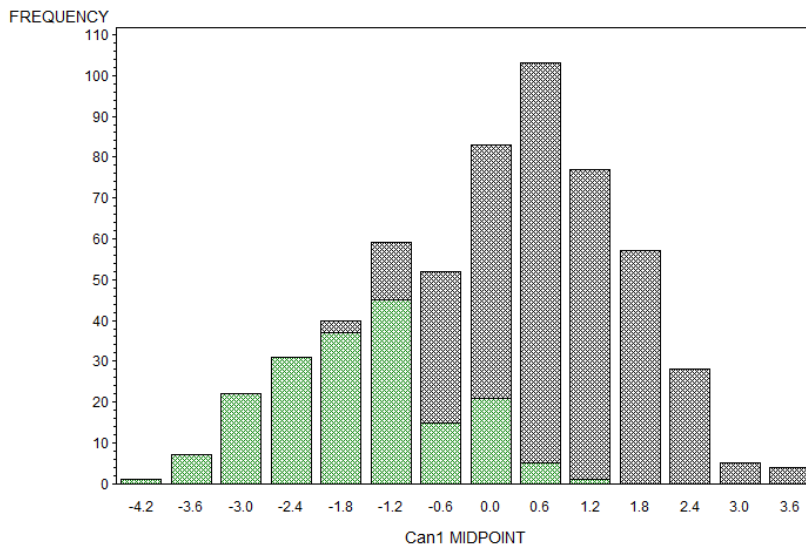


Obr. 30: CDA pro *D. carthusianorum* subsp. *sudeticus* (žlutě) a subsp. *latifolius* (modře) s použitím všech 28 znaků.

Pro (pod)horské poddruhy *latifolius* a *sudeticus* byla rovněž provedena samostatná CDA (obr. 30). Skupiny se oddělují podstatně lépe než předešlá dvojice, přesto existuje minimální překryv (pouze jeden jedinec). Znaky, které nejlépe oddělují oba poddruhy, jsou *délka listové pochvy dolního lodyžního listu* (v11) a *délka lodyhy* (v4). V závěsu jsou pak květní znaky jako *šířka čepele korunního lístku* (v27), *délka čepele korunního lístku* (v29), *počet květů v květenství* (v31) a *délka nehtu korunního lístku* (v28). Podle výsledků klasifikační analýzy (při parametru $k = 5$) byla úspěšnost správného určení do poddruhu *sudeticus* 100% a do poddruhu *latifolius* 93,63%.

V další CDA byly analyzovány hadcové (subsp. *capillifrons*) a nehadcové populace (zbylé tři poddruhy). Z výsledků je patrný velký překryv obou skupin (obr. 31). Znaky, které nejvíce přispívají k oddělení obou skupin, jsou *délka lodyhy* (v4), *výška kalicha* (v23), *průměrná šířka listu* (v16), a *délka vnitřního podkališního listence* (v17). Podle výsledků klasifikační analýzy (při parametru

$k = 13$) byla úspěšnost správného určení do poddruhu *capillifrons* 87,03% a do zbylých nehadcových poddruhů 92,71%.



Obr. 31: CDA pro hadcové (subsp. *capillifrons*, zeleně) a nehadcové populace *D. carthusianorum* (subsp. *carthusianorum*, subsp. *latifolius* a subsp. *sudeticus*; černě).

Analýza mikrosatelitů

Mikrosatelity (nebo také SSR – *simple sequence repeats*) jsou krátké repetitivní úseky v molekule DNA. Opakující se úseky – motivy – mají obvykle délku pouze 2-6 párů bází (bp), čímž se liší od tzv. minisatelitů, které mají motivy dlouhé cca 10-60bp (Weising et al. 2005). Nejčastěji používané mikrosatelity mají opakující se motiv dlouhý 2, 3 nebo 4 páry bází. Opakování motivu může být nepřerušené (úplné mikrosatelity, např. (TA)_n) nebo existují také mikrosatelity spojitě (např. (TA)_n(CT)_n) nebo jsou tyto spojitě mikrosatelity přerušené několika bázemi, např. (GAA)_nGTT(AG)_n (Weising et al. 2005).

Výhody mikrosatelitů jako molekulárního markeru: (i) jsou vysoce početné a nacházejí se v celém genomu, (ii) jsou velmi variabilní (vysoká mutační rychlost), (iii) jedná se o kodominantní marker, tj. můžeme rozpoznat homozygotní a heterozygotní jedince, (iv) obvykle nevyžadují složité a časově náročné optimalizace (pokud již máme k dispozici potřebné primery) a relativně snadno se vyhodnocují, (v) analýza je relativně levná, zejména pak pokud provádíme PCR reakci v multiplexu⁶ a (vi) je možné pracovat i s méně kvalitní DNA, která je do určité míry degradovaná, neboť délka mikrosatelitů je výrazně kratší (cca 80-300 bp) oproti jiným DNA markerům (Weising et al. 2005, Mandák 2011).

Samotná variabilita mikrosatelitů se detekuje na úrovni délkového polymorfismu jednotlivých alel. Při použití fluorescenčně značených primerů pak můžeme vzorky analyzovat fragmentační analýzou na sekvenátoru a to i několik mikrosatelitových lokusů najednou při použití odlišných fluorescenčních barev.

Hlavní nevýhody mikrosatelitů jsou: (i) potřeba vyvinout druhově specifické primery, (ii) nejasný či složitý mutační mechanismus, (iii) často neznámé umístění mikrosatelitového lokusu v genomu, (iv) výskyt homoplázií⁷ a (v) výskyt nulových alel (pokud dojde k mutaci v místě, kde nasedá primer; Goldstein & Schlötterer 1999, Mandák 2011). Za prvním zmiňovaným omezením se však skrývá i určitá výhoda, která spočívá v tom, že nehrozí tolik kontaminace nepříbuzným druhem (např. parazitem, houbou). Použít lze navíc mnohdy i primery navržené pro blízce příbuzný druh (tzv. cross-amplifikace).

Mikrosatelity se hojně využívají při mapování genomu, při forenzních analýzách, na určení paternity, ale čím dál častěji také v populačních studiích (Mandák 2011).

Metodika

Počet analyzovaných jedinců z jednotlivých populací, u kterých se podařilo úspěšně vyzolovat DNA, namplifikovat ji s pomocí použitých mikrosatelitových primerů a vyhodnotit

⁶ Multiplex: současná analýza několika mikrosatelitových primerů v jedné PCR reakci.

⁷ Homoplázie u mikrosatelitů: stejná délka alel vzniklá odlišným způsobem.

výsledky fragmentační analýzy, je uveden v tabulce v příloze 4. Celkově bylo analyzováno 252 jedinců.

DNA byla izolována z vysušených listových pletiv podle modifikované CTAB metody (Štorchová et al. 2000). Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru Nanodrop ND1000 a následně naředěna na pracovní koncentraci 5 ng/μl. Mikrosatelitové primery byly vybrány z prací Smulders et al. 2000, 2003 a Kimura et al. 2009. První uvedená práce obsahuje primery navržené pro několik zástupců rodu *Dianthus*, včetně *D. carthusianorum*, v dalších pracích jsou mikrosatelitové primery navržené pro *D. caryophyllus* a několik z nich se podařilo úspěšně cross-amplifikovat pro *D. carthusianorum* (seznam všech testovaných primerů viz tab. 21).

Při testovací fázi byla provedena PCR všech primerů na dvou vzorcích od každého poddruhu. PCR produkty byly nanесeny na 3% agarózový gel (agaróza Amresco, 1x TBE pufr). Primery, které úspěšně amplifikovaly studovanou DNA a vykazovaly variabilitu na 3% gelu, byly následně použity fluorescenčně značené. Fluorescenční barva byla k jednotlivým primerům přiřazena tak, aby bylo možné primery použít i v multiplexu. Za tímto účelem byla zároveň testována případná tvorba dimerů mezi jednotlivými primery v programu Fast PCR (verze 3.6; Kalendar 2005). Kombinací různých fluorescenčně značených primerů a jejich udávanou délkou byly navržené dvě multiplexové sady primerů (I a II). První z nich (I) byla dále kvůli přesnějšímu vyhodnocování výsledků rozdělena na dva multiplexy. První multiplex (A) obsahuje 3 dvojice primerů: MS-DCAMCRBSY, CF003a a CB018a, druhý multiplex (B) obsahuje 4 dvojice primerů: MS-DCDIA30, MS-DINGSTA, CB057a a DCB109. Multiplex II, obsahující 6 primerů, byl optimalizován, ale nebyly prozatím zanalyzovány všechny vzorky (v této práci není proto dále uváděn).

Vlastní multiplexová PCR reakce probíhala po optimalizaci v mikrozkuvkách v objemu 6 μl podle mixu uvedeného v tabulce 22 a v termocykleru Eppendorf Mastercycler ep S s programem uvedeným v tab. 23.

Před vlastní fragmentační analýzou bylo 0,5 μl PCR produktu smícháno s 10 μl směsi HiDi formamidu a LIZ 600 Size Standardu (20:1; Applied Biosystems). Výsledná směs byla denaturována po dobu 3 minut při 95°C. Vzniklý produkt byl analyzován na šestnáctikapilárním sekvenátoru 3130xl Genetic Analyzer (Laboratoř sekvenace DNA PšF UK).

Data z fragmentační analýzy byla analyzována v programu GeneMarker Demo (verze 1.8; Soft Genetics). Výstupem pro každý lokus je žádný (nulová alela), jeden (homozygot) nebo dva mikrosatelitové píky (heterozygot). Skórovány byly jen zřetelné píky s klasickým mikrosatelitovým *pattern*. Tím je obvykle soubor několika píků, z nichž jeden (nejintenzivnější) představuje alelu a ostatní tzv. *stutter bands* (přidatné proužky; o jeden motiv kratší než je alela) či tzv. +A alelu (o jednu bázi delší než je alela (Mandák 2011)).

Tab. 21: Přehled vyzkoušených mikrosatelitových primerů a jejich základní charakteristiky (sekvence, typ repetitivní sekvence, délka amplifikovaných fragmentů, fluorescenční označení).

název ^a	sekvence (5'-3')	repetitivní sekvence ^b	délka fragmentů (bp) ^c	fluor. barva	zdroj
MS-DCAMCRBSY	F: CAA CAA TGA CAA CAA CAT CAG R: TCT TCG ATT GTT GAA GCT AAG	(CAA) ₁₇	82-130	6-FAM	Smulders et al. 2000
MS-DCDIA30	F: CAC TGA CGA CAC AGC TGA TGT R: ACT CGT CCA AAC ACA AAC GAC	(TA) ₇₋₁	134-170	NED	Smulders et al. 2000
CF003a	F: CAG TTG AAG AAG TTT GAA TGA ATC GC R: TTC TCT CTC TAA ACC CCC CCA A	(GAA) ₅ GTT(AG) ₉	111-150	VIC	Kimura et al. 2009
CB018a	F: AGT GTC TAA GAG TCT AAG GTT GTG R: GTA ATA CAA TGG CAT AAC TTC A	(AGAGAGT) ₆	86-114	PET	Kimura et al. 2009
CB057a	F: GTT ATC CGC CAT TGT TGC T R: AAA AAC ATA ACT CCA AAT ACC TCC	(AG) ₁₄	98-144	PET	Kimura et al. 2009
DCB109	F: ATA ATT CAC TTA ACG GAA GGC R: AAT TAA GGT CCA CTA CAT CCC	(GT) ₂₄₋₁	79-115	NED	Smulders et al. 2003
MS-DINGSTA	F: CAC AAA CCT GAA AGT ACG ATC R: ACA TTC GAG CCC TCA TAT AAG	(T) ₂₃₋₁	163-245	6-FAM	Smulders et al. 2000
CB016a*	F: CCT GGT GTT GAT AAT GAA TAC G R: AAT AGC CTC CZC TCC TCT CCT C	(AG) ₁₀	185	NED	Kimura et al. 2009
MS-DINMADSBOX*	F: ACG AGT GTC CAG GAT CG R: CCC CTA TTG CAA ACT GC	(TA) ₇	128-136	6-FAM	Smulders et al. 2000
CB004a*	F: GAT TTG GGT GGG GCG TGA R: CCA TCC TCC TCC TTT CTA TCT TCC CT	(AG) ₁₂	157	PET	Kimura et al. 2009
CB026a*	F: CCG AGT GGA AGA GAG AGA G R: GGA GGG AGT AGA AAA TAG TGT G	(AG) ₃₁	175	VIC	Kimura et al. 2009
CB011a*	F: GGA TTG TTT GGA CTA GGA TGA R: AGG ACA TGG ATG ATT TAC AGT G	(AG) ₁₅	206	VIC	Kimura et al. 2009
DCA221*	F: CAA CTG GTA TTG AGA AGT GTT G R: AAC CTT GAA ATG GAT TTG G	(CT) ₃₅₋₁	116-156	NED	Smulders et al. 2003
DCD010	F: GCA TTC GTT TTT CCT TCT ACT F:AAC AAC GTT CAG ACA ACC TAA	(CTT) ₂₄₋₂	135-219		Smulders et al. 2003
DCD224	R: CGT CAC AAG CTC TAA ATC TTT F: AAC CAA AAA CCC TTC TAA CAC	(CTT) ₁₀	123-184		Smulders et al. 2003
DCE218	R: TTT CAT AGG AGA CTA ACA TAA ATC C F: GGG TGA AAT TTA GGT AGA AA	(T) ₆₇₋₁₁	127-176		Smulders et al. 2003
DCF115	F: TTT ACG AAC AAA CGA TCA TTT R: CCT AAT CAA CAA CAA GTT TCT ATG	(A) ₅₆₋₁₀	144-162		Smulders et al. 2003
MS-DINCARACC	F: GGT CTT AAT CTT TGT CAC TTT R: ACC CAT CAA AGT ACT CCA AAT	(TA) ₈	190-227		Smulders et al. 2000
CB047a	F: AGG CTA AAA TGC TGT GTC TCG T R: GAT AAA CTT TTC TCT CTC TCA TCT CTC	(AT) ₁₄ (AT) ₃ T(GA) ₅	149		Kimura et al. 2009

^a Tučně vyznačené primery jsou použity v této práci, primery označené * jsou již optimalizované, ostatní primery byly vyzkoušeny, ale neamplifikovaly úspěšně.

^b Zápis opakujícího se motivu (TA)₇₋₁ znamená, že se motiv opakuje až 7x s jedním neúplným opakováním (mluvíme o mikrovariantě)

^c Uvedená délka fragmentů (v párech bází) vychází z výsledků této práce nebo z údajů z příslušného článku (kurzívou).

Tab. 22: Multiplex PCR mix pro jeden vzorek. První multiplex obsahuje 3 primery (MS-DCAMCRBSY, CF003a, CB018a) a druhý 4 (MS-DCDIA30, MS-DINGSTA, CB057a, DCB109).

	multiplex I A	multiplex I B
Multiplex PCR Kit (Qiagen)	3 μ l	3 μ l
značený primer FORWARD (25 pmol/ μ l) \times 3-4	[0.036 μ l] \times 3	[0.036 μ l] \times 4
primer REVERSE (25 pmol/ μ l) \times 3-4	[0.036 μ l] \times 3	[0.036 μ l] \times 4
dd H ₂ O	1.78 μ l	1.71 μ l
DNA (5 ng/ μ l)	1 μ l	1 μ l
reakční objem	6 μ l	6 μ l

Tab. 23: PCR cyklus

Krok	Teplota (°C)	čas	počet cyklů
Iniciální denaturace	95	15 min	
Denaturace	94	30 s	35x
Annealing	55	1.5 min	
Elongace	72	1 min	
Závěrečná elongace	60	30 min	
Hold	10	-	

Analýza dat

Primer MS-DINGSTA byl při vyhodnocování vyloučen, protože se jedná o primer s mononukleotidovým motivem a při vyhodnocování byly některé alely nejednoznačné. Dále se u čtyř vzorků vyskytly pro některé primery tři alely, proto byly rovněž vyloučeny z datasetu. U řady vzorků (zejména pak ty, ve kterých se vyskytovaly nulové alely) byla analýza opakována (tzn. PCR a následná fragmentační analýza).

Jelikož jsou *D. carthusianorum* i *D. pontederiae* diploidní druhy, byla data vyhodnocována alelicky (matice vyhodnocených alel je součástí přílohy). Pro prvotní náhled na strukturu v datech však byla primární matice délky jednotlivých fragmentů nejdříve převedena do binární matice, ze které byl vytvořen vstupní soubor pro analýzu hlavních koordinát (PCoA; Jaccardův koeficient podobnosti bez standardizace) v programu SYNTAX (Podani 2001). První tři osy byly vizualizovány v programu SAS (procedura G3D).

Vlastní délkový polymorfismus alel byl pak analyzován v programu FSTAT (Goudet 1995) a Arlequin (verze 3.01; Excoffier et al. 2005). Konverze mezi jednotlivými datovými formáty byla provedena v programu CONVERT (Glaubitz 2004).

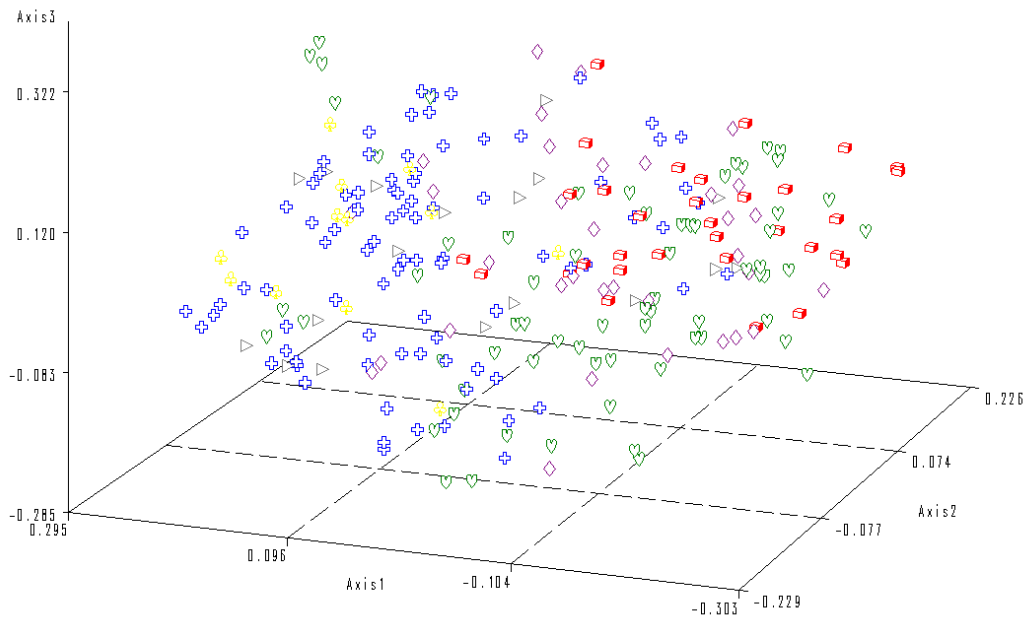
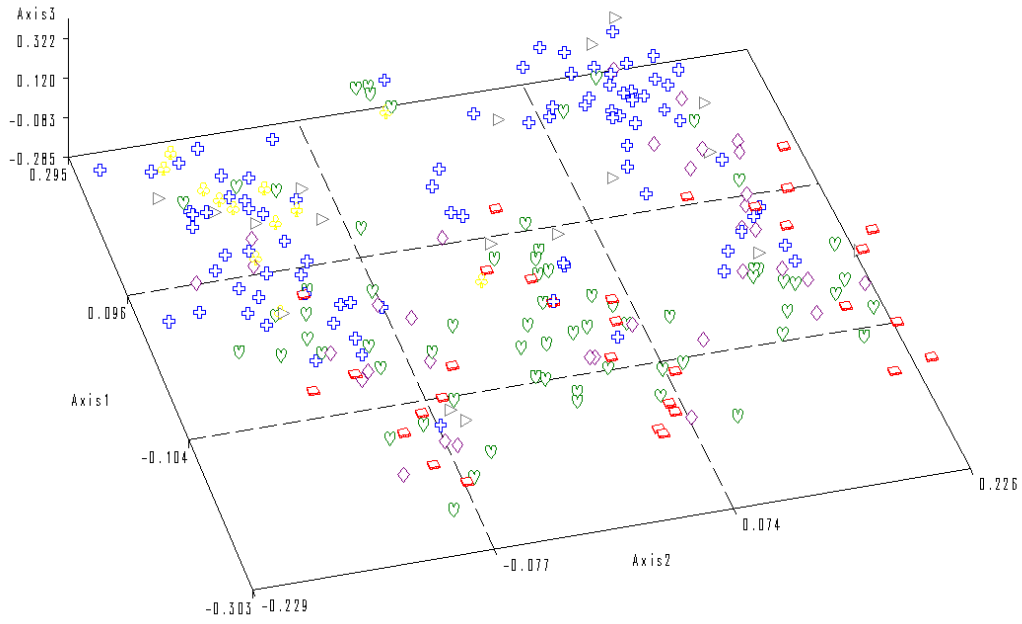
V programu FSTAT byly vypočteny základní F-statistiky (F_{ST} – stupeň populační diferenciace na subpopulaci, F_{IS} – stupeň inbreedingu), genetická diverzita a míra heterozygotnosti (skutečná H_o vs. očekávaná H_e).

Analýza molekulární variability (AMOVA; v programu Arlequin) slouží k odhalení mezipopulační variability a variability mezi taxony. Jako *groups* byly v programu Arlequin nastaveny jednotlivé taxony a jako *samples* skutečné populace. Sledovaným parametrem byla procenta variability a jejich rozložení v datovém souboru s přihlédnutím k vytvořeným skupinám (odpovídajícím jednotlivým taxonům).

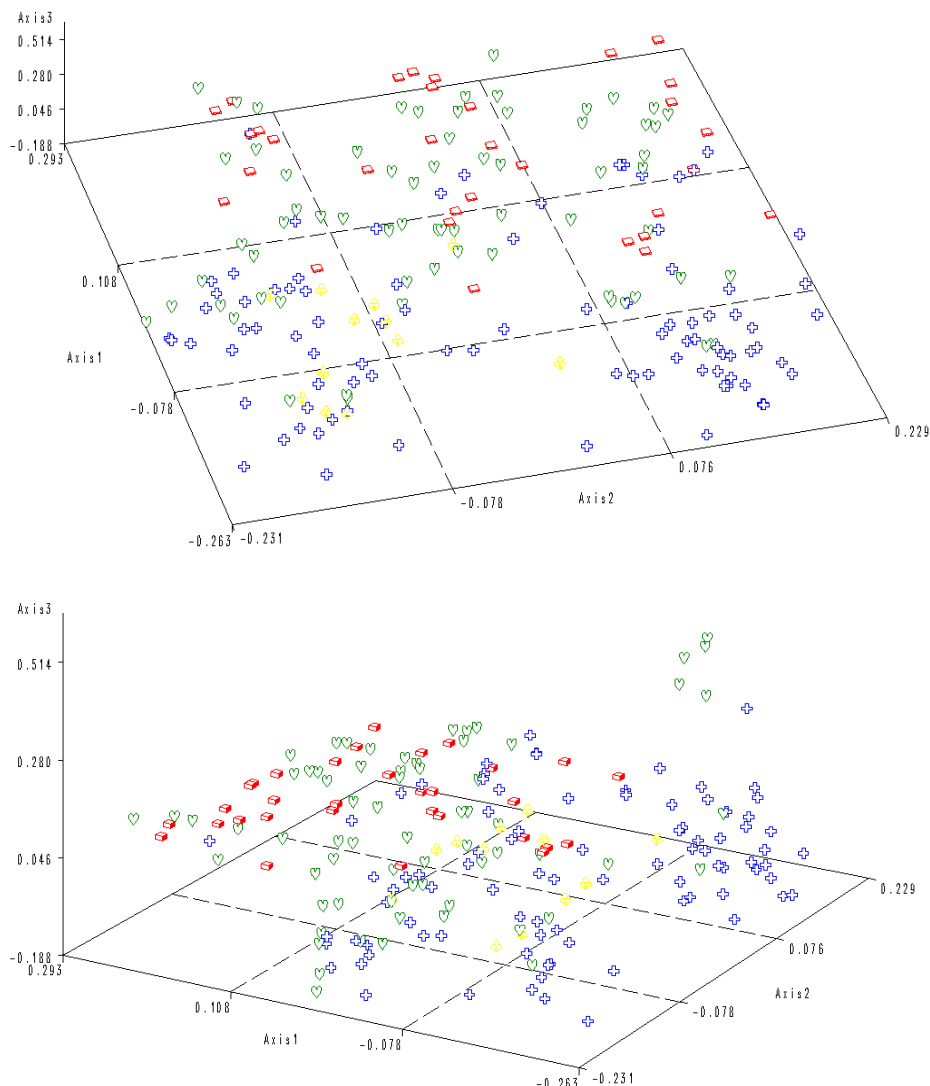
Pro porovnání „rozdílností“ jednotlivých taxonů mezi sebou byly vypočteny v programu Arlequin hodnoty „*Population pairwise difference*“, odpovídající vážené F_{ST} statistice přes všechny lokusy (Weir & Cockerham 1984) – jde o srovnání hodnot F_{ST} mezi jednotlivými páry taxonů. Jako parametr „rozdílnosti“ je brána hodnota „*Pairwise difference*“, přičemž statistická významnost rozdílů je testována permutacemi alel mezi taxony.

Výsledky

PCoA byla provedena jednak pro všechny studované taxony (poddruhy *D. carthusianorum* a *D. pontederae*, včetně nezařazených populací, obr. 32 a 33) a dále jen pro jednotlivé poddruhy *D. carthusianorum* (obr. 34 a 35). Jednotlivé osy u obou analýz vysvětlují poměrně málo variability celého datasetu. První tři zobrazené osy tak vysvětlují pouze 11,52% celkové variability u první analýzy a 12,01% u druhé. V datech tedy pravděpodobně chybí nějaká vysvětlující struktura a variabilita uvnitř taxonů je vysoká (v rámci jednotlivých taxonů je pravděpodobně pouze málo sdílených alel).



Obr. 32 a 33: PCoA délek mikrosatelitových alel (převedených do binární matice) pro všechny studované taxony. Červeně *D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum*, modře subsp. *latifolius*, zeleně subsp. *capillifrons*, žlutě subsp. *sudeticus*, fialově *D. pontederai* a šedě nezařazené populace s přechodným fenotypem. Jednotlivé osy vysvětlují velice málo variability (4,7%, 3,7% a 3,1%).



Obr. 34 a 35: PCoA mikrosatelitových alel (převedených do binární matice) pro všechny poddruhy *D. carthusianorum* (červeně subsp. *carthusianorum*, modře subsp. *latifolius*, zeleně subsp. *capillifrons* a žlutě subsp. *sudeticus*). Jednotlivé osy vysvětlují velice málo variability (5,0%, 3,7% a 3,3%).

Z výsledků molekulární variability (AMOVA) vyplývá, že nejvyšší pozorovaná variabilita je uvnitř populací (80,7%; viz tab. 24). Naproti tomu nízká variabilita mezi taxony (4,89%) odpovídá jejich nízké diferenciaci.

Tab. 24: Výstup analýzy AMOVA (Arlequin) porovnávající jednotlivé populace a taxony *D. carthusianorum* a *D. pontederiae*.

zdroj variability	d. f.	součet čtverců	variační komponenty	procenta variability
mezi taxony	5	77.252	0.11881 va	4.89
mezi populacemi v rámci taxonů	40	225.094	0.34997 vb	14.41
uvnitř populací	450	882.15	1.96033 vc	80.7
celkem	495	1184.496	2.42911	
F_{ST}: 0.19298 (p = 0,00000)				
F_{CT}: 0.04891 (p = 0,00000)				

Podobnost mezi jedinci v rámci populací vzhledem k ostatním jedincům v celém souboru (F_{ST}) je relativně nízká (0,19298; tab. 24), stejně jako míra podobnosti mezi vzorky v rámci taxonu vzhledem k vzorkům z celého souboru (F_{CT}).

Z výsledků párového mezitaxonového porovnání genetické rozdílnosti mezi jednotlivými taxony vyplývá, že rozdíly jsou velice nízké (nízké hodnoty *pairwise difference*, viz tab. 25). Nejmenší rozdíl je mezi poddruhy *carthusianorum* a *capillifrons*, což můžeme vysvětlit relativní geografickou blízkostí těchto taxonů a pravděpodobně probíhajícím genovým tokem mezi jejich populacemi nebo tím, že hadcová subsp. *capillifrons* vznikla ze subsp. *carthusianorum*. Naopak nejvyšší rozdíl je mezi poddruhy *carthusianorum* a *sudeticus*, což může odrážet rozdílné ekologické nároky těchto taxonů (nížinný vs. horský poddruh) či dlouhodobou izolaci populace z Velké Kotliny.

Tab. 25: Hodnoty vážené F_{ST} přes všechny mikrosatelitové lokusy mezi jednotlivými studovanými taxony (*Number of pairwise difference*, Arlequin). Všechny hodnoty jsou na hladině $\alpha = 0.05$ statisticky průkazné. *D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum* - car, subsp. *latifolius* - lat, subsp. *capillifrons* - cap a subsp. *sudeticus* - sud, *D. pontederiae* - pon a nezařazené populace - nez.

	car	lat	cap	sud	pon	nez
car	0					
lat	0.11833	0				
cap	0.06079	0.06651	0			
sud	0.19998	0.10600	0.14994	0		
pon	0.07989	0.07567	0.06575	0.14574	0	
nez	0.07849	0.02491	0.03195	0.11596	0.06422	0

U jednotlivých lokusů byl také sledován stupeň inbreedingu (F_{IS}). U sledovaných lokusů byl zaznamenán relativně vyšší stupeň inbreedingu u téměř všech taxonů (tab. 26).

Tab. 26: Stupeň inbreedingu (F_{IS}) v rámci taxonu pro jednotlivé mikrosatelitové lokusy a taxony (*D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum* - car, subsp. *latifolius* - lat, subsp. *capillifrons* - cap a subsp. *sudeticus* - sud, *D. pontederiae* - pon a nezařazené populace - nez).

mikrosatelitový lokus	car	lat	cap	sud	pon	nez
MS-DCAMCRBSY	0.445	0.254	0.253	0.337	0.115	0.343
MS-DCDIA30	0.423	0.584	0.624	-0.059	0.474	0.74
CF003a	0.273	0.487	0.255	0.316	0.174	0.464
CB018a	0.633	0.343	0.389	-0.231	0.113	0.148
CB057a	0.457	0.359	0.241	0.553	0.297	0.422
DCB109	0.358	0.067	0.458	0.459	0.162	0.378
Celkem	0.41	0.344	0.368	0.295	0.226	0.417

Posledním sledovaným parametrem byla míra heterozygotnosti jednotlivých mikrosatelitových lokusů (tab. 27). Tato hodnota (H_o) byla porovnáвана s vypočtenou očekávanou hodnotou heterozygotnosti (H_s). Výslednou hodnotu je možné vztahovat k Hardy-Weinbergově rovnováze (obdobně jako hodnota $F_{IS} = 0$). Pozorovaná míra heterozygotnosti je výrazně nižší než

očekávaná, což svědčí o tom, že studované populace se od Hardy-Weinbergovy rovnováhy výrazně vychylují.

Tab. 27: Míra heterozygotnosti jednotlivých mikrosatelitových lokusů podle Nei (1975). H_o = skutečná, H_s = očekávaná, H_t = celková heterozygotita.

mikrosatelitový lokus	H_o	H_s	H_t
MS-DCAMCRBSY	0.521	0.716	0.808
MS-DCDIA30	0.284	0.619	0.683
CF003a	0.615	0.919	0.94
CB018a	0.472	0.615	0.737
CB057a	0.542	0.882	0.904
DCB109	0.549	0.798	0.835
průměr	0.497	0.758	0.818

Analýza jednotlivých lokusů na přítomnost nulových alel byla provedena v programu MICROCHECKER (van Oosterhout et al. 2004). Výsledkem byly hodnoty pravděpodobností, že lokus bude mít nulové alely. Ve srovnání s reálnými hodnotami frekvencí nulových alel (frekvence nulových alel v daném lokusu pro daný taxon; viz tab. 28) byly pravděpodobnosti výskytu nulových alel výrazně vyšší (data nezobrazena).

Tab. 28: Frekvence nulových alel pro jednotlivé lokusy a taxony (*D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum* - car, subsp. *latifolius* - lat, subsp. *sudeticus* - sud, subsp. *capillifrons* a *D. pontederae*).

mikrosatelitový lokus	car	lat	cap	sud	pon	nez	celkem
MS-DCAMCRBSY	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
MS-DCDIA30	0.0625	0.0114	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0121
CF003a	0.1250	0.0114	0.0441	0.0000	0.0910	0.0000	0.0403
CB018a	0.0000	0.0114	0.0147	0.0000	0.0000	0.0000	0.0081
CB057a	0.0000	0.0000	0.0147	0.0000	0.0000	0.0000	0.0040
DCB109	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Diskuze

Cílem této části práce bylo (i) stanovit stupeň morfologické, cytologické a genetické diferenciace poddruhů *Dianthus carthusianorum* rostoucí na území střední Evropy a (ii) odhalit zda jednotlivé poddruhy tvoří samostatné evoluční linie nebo mezi nimi probíhá genový tok. Do analýz bylo zahrnuto 779 jedinců ze 75 lokalit z území České republiky, Slovenska, Rakouska a Polska. Zastoupeny byly všechny 4 poddruhy hvozdíku kartouzku rostoucí na tomto území: široce rozšířené poddruhy *carthusianorum* a *latifolius*, dále endemický poddruh *sudeticus* z Velké Kotliny a subendemický poddruh *capillifrons* vázaný na hadec. Zahrnuto bylo také několik populací blízkého a fenotypově podobného druhu *D. pontederæ*.

Všechny použité metody (průtoková cytometrie, morfometrika a analýza mikrosatelitů) ukazují na relativně nižší diferenciaci všech studovaných taxonů (čtyř poddruhů *D. carthusianorum* i blízkého *D. pontederæ*). Morfometrické analýzy oddělují relativně dobře jednotlivé taxony; naopak ve výstupech cytometrických a molekulárních analýz jsou sice obvykle patrné určité trendy, ale nevysvětlují dostatečně definované skupiny.

Výsledky analýzy absolutní velikosti genomu ukázaly, že tento parametr je v této skupině velice variabilní (rozdíly až 12,1% v rámci některých poddruhů), avšak nekoreluje příliš s jednotlivými poddruhy, jejichž rozptyl velikosti genomu se z velké míry překrývá. Jistý trend lze vyzorovat u subsp. *latifolius*, která má v průměru menší velikost genomu než zbylé taxony. Jako znak pro determinaci jednotlivých taxonů se tedy velikost genomu použít nedá (Kron et al. 2007). Překvapivé také je, že velký rozptyl ve velikosti genomu v rámci *D. carthusianorum* není možné vysvětlit ani korelací s geografickou polohou (zeměpisná šířka či délka). Častým případem přitom bývá, že máme-li větší počet vzorků pokrývajících rozsáhlé území, tak při existenci rozdílů ve velikosti genomu lze určitý trend najít (Slovák et al. 2009). Zajímavým výsledkem rovněž je, že dvě populace subsp. *capillifrons* (Raškov a Aggsbach-Dorf-Mitterbachgraben) se ve velikosti genomu liší od zbytku hadcových populací o 10,3% a 7,8% a blíží se tak hodnotám pro subsp. *latifolius*. Vysvětlení pro odlehle hodnoty u těchto dvou populací může být trojí: (i) tyto populace se oddělily od zbytku již dávno a výrazně se diferencovaly na úrovni velikosti genomu, (ii) vznikly ze subsp. *latifolius*, která má rovněž menší velikost genomu, zatímco zbylé hadcové populace vznikly ze subsp. *carthusianorum*, která má přibližně odpovídající velikost genomu, (iii) měření velikosti genomu nebyla zcela přesná, např. kvůli chybovosti přístroje (ta bývá však obvykle jen 2-4%); tři různá měření u každého vzorku či společná analýza by v tomto případě výrazně zpřesnily odhady o velikosti genomu. Obdobný trend nebyl v ostatních metodických přístupech zaznamenán. Další analýzy a zejména zmíněná společná analýza více vzorků jsou v tomto směru do budoucna nutné.

Také výsledky morfometrických analýz ukazují na kontinuum mezi jednotlivými taxony, byť dopadly v tomto směru z použitých metod nejlépe. Poukazují na to shodně ordinační diagramy a výsledky klasifikační diskriminační analýzy. Z výsledků je tedy zřejmé, že hvozdík kartouzek je velice variabilní taxon a správné určení do poddruhu není na základě morfologie vždy spolehlivé. O mnoho lépe však překvapivě nedopadlo ani rozlišení hvozdíku Pontederova od hvozdíku kartouzku (při zahrnutí všech poddruhů). Tento výsledek je patrně ale způsoben tím, že *D. pontederiae* má celkově menší vzrůst a květy, podobně jako hadcový *D. carthusianorum* subsp. *capillifrons*. V terénu však záměna těchto dvou taxonů není příliš reálná vzhledem k odlišným biotopům, které tyto taxony osidlují (hadec vs. suché trávníky). Při samostatné PCA *D. pontederiae* pouze se subsp. *carthusianorum* (rostoucí na obdobných biotopech) je odlišení těchto taxonů výrazně lepší. CDA těchto dvou taxonů však nebyla provedena kvůli absenci nezávislého znaku pro vytvoření skupiny *D. pontederiae*, který by zabránil definici kruhem.

Z poddruhů *D. carthusianorum* byla úspěšnost správného určení v klasifikační analýze nejvyšší u subsp. *sudeticus* (95%, avšak do analýz bylo zařazeno pouze 20 vzorků), naopak nejnižší úspěšnost byla u subsp. *capillifrons* (necelých 65%). Poddruh *sudeticus* se od poddruhu *latifolius*, ke kterému byl dříve přiřazován, odlišuje v samostatné diskriminační analýze s úspěšností téměř 100%. Nízká úspěšnost správného určení subsp. *capillifrons* odpovídá velké variabilitě tohoto taxonu, kterou můžeme vysvětlit (i) jako důsledek různé míry hadcové toxicity jednotlivých lokalit, která má za následek různý fenotyp rostlin nebo (ii) vícenásobným nezávislým vznikem jednotlivých hadcových populací (případně i z odlišných poddruhů; efekt zakladatele) či (iii) jednoduše tím, že hadcové populace jsou od sebe vzájemně izolované a působí v nich genetický drift. Překryv široce rostoucích poddruhů, nominátního *carthusianorum* a subsp. *latifolius* je značný, a to i pokud byly z analýzy vyřazeny populace z kontaktní zóny těchto dvou poddruhů. Do správného poddruhu bylo v tomto případě přiřazeno méně než 9 z 10 rostlin, což je na poddruhovou úroveň velmi dobrým výsledkem.

Ačkoli se jednotlivé taxony fenotypově dosti překrývají, znaky pro ně typické nejčastěji odpovídají znakům, uváděným v determinačních klíčích a flórách (Kovanda 1990, Kubát et al. 2002). Pro poddruh *capillifrons* jsou to znaky odrážející jeho menší vzrůst (typický pro hadcovou květenu) oproti ostatním poddruhům (délka lodyhy, výška kalichu, šířka listu). Pro oddělení subsp. *sudeticus* a subsp. *latifolius*, přispívají však znaky, které v klíči uvedené nejsou: délka listové pochvy dolního lodyžního listu a délka lodyhy. Největší kontinuum nalezneme u široce rozšířených poddruhů, *carthusianorum* a *latifolius*. Jak název druhého poddruhu napovídá, nejdůležitějším znakem pro jeho odlišení je šířka a délka listů.

Výsledky analýzy mikrosatelitů jsou zatíženy relativně malým počtem vzorků (nejčastěji od tří do šesti na populaci; subsp. *sudeticus* je zastoupena jedinou populací s deseti vzorky) a mikrosatelitových primerů (celkem 6 mikrosatelitových lokusů), proto je třeba považovat výsledky

pouze jako předběžné a závěry jen jako hypotézy, které budou v budoucnu testovány na základě robustnějších dat.

Již prvotní náhled na datový soubor pomocí PCoA neukazuje žádné trendy oddělení jednotlivých taxonů (náznak je pouze u subsp. *sudeticus*, která tvoří jedinou populaci). Z diagramu jsou patrné náznaky tří skupin, které však neodpovídají taxonům, ani nekorelují s geografickým rozšířením. Vysvětlením může být artefakt způsobený použitím binárních dat. Nízké rozdíly mezi taxony ukazují shodně i výsledky párového mezitaxonového porovnání genetické rozdílnosti. Dle očekávání byl nejmenší rozdíl mezi subsp. *carthusianorum* a *capillifrons*, mezi nimiž pravděpodobně probíhá genový tok. Naopak největší rozdíl je mezi subsp. *sudeticus* a *carthusianorum*, což ukazuje na izolovanost populace z Velké Kotliny.

Z výstupů analýzy molekulární variability vyplývá, že většina variability je soustředěna uvnitř jednotlivých populací (80,7%), což je typický stav pro cizosprašné rostliny (Weising et al. 2005). Naproti tomu většina ostatních počítaných populačních parametrů se od „ideální“ populace (tj. populace v Hardy-Weinbergově rovnováze; Goudet 1995) více či méně odchyluje. Byl tak zjištěn vysoký stupeň inbreedingu (F_{IS}), který může naznačovat, že celkově nedochází k výraznému genovému toku mezi populacemi. Avšak vysvětlením může být také vysoký stupeň samosprašení. U hvozdíků bývá samosprašení obvykle zabráněno proterandrií, avšak ta nezabraňuje geitonogamii (opylení jiným květem téhož jedince; Richards 1997). Např. u druhu *Dianthus guliae* JANKA bylo zjištěno, že je autokompatibilní a ke geitonogamii pravděpodobně dochází často (Gargano et al. 2009).

Se stupněm inbreedingu také úzce souvisí srovnání zjištěné a očekávané heterozygotnosti. Zjištěná míra heterozygotnosti se výrazně odlišuje od očekávané (průměrná zjištěná a očekávaná heterozygotnost všech lokusů $H_o=0,497$ a $H_s=0,758$). Běžný rozdíl je přitom řádově $H_o=0,58$ a $H_s=0,61$ (průměrné hodnoty ze 64 studií; Nybom 2004). Tento výsledek naznačuje, že studované populace se výrazně odchyľují od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Z tohoto důvodu nemohla být data analyzována zamýšleným Bayesovským klastrováním (*admixture* analýza v programu STRUCTURE; Pritchard et al. 2000), pro který je rovnováha jednou z podmínek. Významný rozdíl mezi H_o a H_s může být též způsoben přítomností nulových alel. U většiny lokusů se frekvence nulových alel pohybovala na nízké úrovni, výraznější odklon od Hardy-Weinbergovy rovnováhy způsobují až více než 10% přítomnost nulových alel v datasetu (van Oosterhout et al. 2004). Dalším možným vysvětlením je přítomnost gynodioecie v populacích (řádově 6% samičích jedinců z populace), která vytváří nerovnováhu v zastoupení pohlaví (hermafroditní či samičí květy).

Výše uvedené výsledky ukazují, že hvozdík kartouzek je pravděpodobně typickým příkladem nedávné ekologické (zejména edafické) speciace, kdy jednotlivé poddruhy prozatím netvoří samostatné evoluční linie, nejsou od sebe reprodukčně izolované a probíhá tedy mezi nimi stále genový tok. Jednotlivé poddruhy se tak projevují zejména na morfologické úrovni (byť s velkými překryvy) jako reakce na biotop, který osídľují: subsp. *carthusianorum* roste ne suchých, mělkých,

hlinitých nebo sprašových půdách, subsp. *latifolius* roste na mezofilních loukách pastvinách a (leso)stepích na hlubokých, bohatých hlinitých nebo jílovitých půdách, subsp. *sudeticus* roste ve Velké Kotlině na skalkách a subsp. *capillifrons* je vázaná na hadcové substráty.

Původ a vznik hadcového poddruhu *capillifrons* zasluhuje samostatnou pozornost. Výsledky měření velikosti genomu i analýzy mikrosatelitů naznačují polytopní vznik tohoto taxonu. Tento výsledek není překvapivý vzhledem k tomu, že hadcová podloží jsou ve střední Evropě rozšířena ostrůvkovitě (Brady et al. 2005) a nikdy neměla spojitý areál. Jednotlivé hadcové populace tak vznikaly pravděpodobně opakovaně z nejbližší nehadcové populace prostřednictvím disruptivní selekce jedinců tolerantních nebo preadaptovaných na hadec (Kruckeberg 1951, 1986). Polytopní vznik hadcových taxonů není tedy nikterak ojedinělý, předpokládá se u většiny z nich (Brady et al. 2005). Společným rysem takto vzniklých hadcových forem jsou pak xeromorfní listy, menší listová plocha, menší celkový vzrůst (ve srovnání s nehadcovými příbuznými) a bohatší kořenový systém. Specificita hadcového podkladu obnáší i velké zastoupení endemitů (Brady et al. 2005). Adaptace na hadec není v rámci čeledi Caryophyllaceae ojedinělá: hadcové taxony (či taxony s několika hadcově-tolerantními populacemi) jsou také např. *Cerastium alsinifolium* TAUSCH, *C. alpinum* L. či *Silene dioica* (L.) CLAIRV. (u posledních dvou jmenovaných se také předpokládá polytopní vznik; Nyberg Berlung et al. 2004, Brady et al. 2005). Rovněž mezi hvozdíky existuje další taxon vázaný na hadec: *D. haematocalyx* BOISS. & HELDR. subsp. *phitosianus* CONSTANTINIDIS, rostoucí v Řecku (Constantinidis 1999). V rámci *D. carthusianorum* najdeme i další populace adaptované na toxické podloží, např. populace rostoucí na zinkovo-olověných haldách v Polsku (Zalecka & Wierzbicka 2002).

(Sub) endemické taxony *sudeticus* a *capillifrons* mají natolik specifické stanoviště (Velká Kotlina a hadcové bory či skalky), že jejich záměna není možná (avšak spíše z těchto stanovištních důvodů než z morfologických či genetických). Naproti tomu určování široce rozšířených poddruhů *carthusianorum* a *latifolius* (byť každý z nich upřednostňuje trochu jiný biotop) je zejména v kontaktní zóně na Moravě občas obtížné kvůli přechodnému fenotypu rostlin a biotopu, na němž se vyskytují. Avšak ani *D. pontederae*, který se odlišuje jako samostatný druh, není příliš jednoznačně oddělen od poddruhů *D. carthusianorum*.

Zjištěné výsledky zapadají do názoru, že rod *Dianthus* je velice diverzifikovaná skupina, jejíž rozsáhlá speciace se odehrála relativně nedávno (Valente et al. 2010).

Zajímavé výsledky do budoucna by mohly přinést kultivační experimenty všech poddruhů na stejném substrátu, které by odfiltrovaly vliv ekologických podmínek na fenotyp jednotlivých poddruhů. Zejména je také žádoucí provést test reprodukčních způsobů k odhalení inkompatibility

(Richards 1997). Pro analýzy mikrosatelitů je vhodné mít populační vzorek cca desíti jedinců a více lokusů.

Část třetí:

Revize ploidní variability *Dianthus moravicus*

***Dianthus moravicus* KOVANDA**

Dianthus moravicus – hvozdík moravský – byl jako samostatný druh popsán až v roce 1982 Kovandou při taxonomické revizi *Dianthus gratianopolitanus* VILL. (Kovanda 1982). Holub tento taxon uznává pouze jako poddruh hvozdíku sivého – *Dianthus gratianopolitanus* subsp. *moravicus* (Kovanda) Holub (Čeřovský & Grulich, 1999).

Hvozdík moravský je reliktním endemitem jihozápadní Moravy, kde roste na sedmi lokalitách v údolích řek Dyje (Růžový vrch u Chvaltic), Želetavky (PR Suché skály u Lubnice), Rokytné (Florián a Buben u Moravského Krumlova a Tábor u Rokytné) a Jihlavy (PP Pekárka, Červená skála u Moravských Bránic; obr. 36). Jsou známy také dvě zaniklé lokality: Křížová hora u Moravského Krumlova a Baba u Budkovic (Rybka & Tichý 2005). Nelze vyloučit jeho případné nalezení v sousedním Rakousku.



Obr. 36: Rozšíření *Dianthus moravicus*.

Hvozdík moravský roste na skalách a skalnatých svazích, zejména při horním okraji hluboce zaříznutých říčních údolí, ve výškách 240–460 m n. m. Rostlina není vázána na specifický podklad; roste na vápnlitých slepencích, granodioritech, granulitu a rule (Kovanda, 1982, 1990; Čeřovský & Grulich, 1999).

Hvozdík moravský je zákonem chráněný jako kriticky ohrožený druh. V červeném seznamu ČR je v kategorii silně ohrožený (Procházka, 2001). Tento druh je také součástí soustavy NATURA 2000 (Rybka et al., 2004)

Je to vytrvalá, hustě trsnatá, sivozelená bylina se silným primárním kořenem a plazivým, větveným oddenkem. Lodyha je krátce vystoupavá nebo přímá, (5-)10-18(-25) cm vysoká, 1-2(-3) květá, oblá, lysá, s 3-4(-6) lodyžními články a nevýraznými uzlinami. Listy jsou čárkovité, v horní třetině zúžené, špičaté, kratší než lodyžní články; pochvy jsou 1,5-2,0 mm dlouhé. Květy jsou vonné. Podkاليšní listénce jsou 4, eliptické až okrouhle vejčité, vnitřní většinou s krátkou nasazenou špičkou, bylinné, většinou červenofialově naběhlé. Kalich je trubkovitý, (15-)17-20(-24) mm dlouhý, více či méně hladký, lysý, zelený, červenofialově naběhlý; zuby jsou trojúhelníkovité, špičaté nebo zašpičatělé, vzácně tupé, většinou bez blanitého lemu, více či méně celokrajné; čepel



Obr. 37: *Dianthus moravicus*

korunních lístků je obvejčitá až okrouhlá, k bázi klínovitě zúžená, zastříhovaně zubatá až dřipená, (11-)12-15(-17) mm dlouhá, červená nebo růžová, na líci ve střední části chlupatá, nehet je poněkud delší než kalich. Tobolka je více či méně zdéli kalicha nebo poněkud delší. Semena jsou 2,6-3,2 mm dlouhá. (Kovanda 1990 ; obr. 37).

Pro *Dianthus moravicus* jsou v literatuře udávány dva různé cytotypy, tetraploidní ($2n = 4x = 60$) a hexaploidní ($2n = 6x = 90$). Kovanda uvádí jak čistě tetraploidní a hexaploidní populace, tak i dvě populace smíšené (Kovanda, 1982, 1984). Novější práce se však s těmito počty rozcházejí: u celkem dvou počítaných populací nebyly nalezeny očekávané tetraploidy, ale hexaploidy (Weiss et al. 2002; viz tab. 29).

Metodika

Stupeň DNA ploidie druhu *Dianthus moravicus* byl stanoven měřením relativní velikosti genomu (barvivo DAPI) pomocí průtokového cytometru. V sezóně 2009 a 2010 byl za tímto účelem odebrán jeden list u reprezentativního počtu jedinců na všech známých lokalitách *D. moravicus*. Přehled všech lokalit a počet odebraných vzorků udává tab. 29.

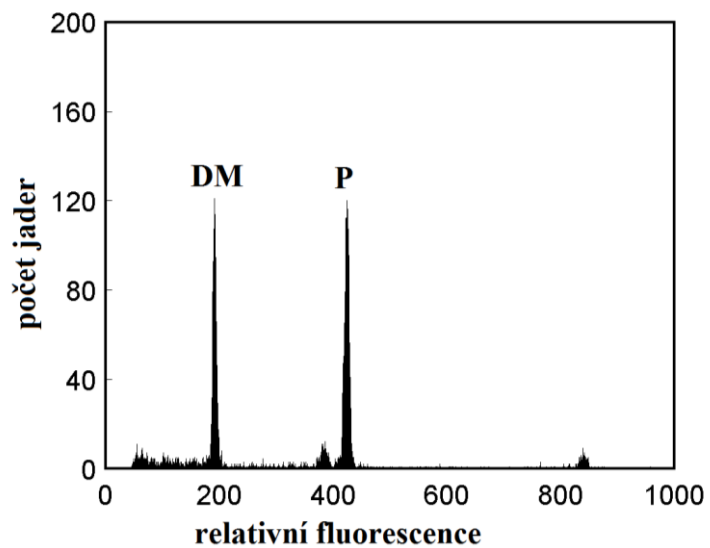
Samotná analýza i vyhodnocování probíhalo totožným způsobem jako v předchozích částech (viz str. 17). Vzorky byly analyzovány po 10 jedincích a jako interní standard byl použit *Pisum sativum* cv. Ctirad ($2C = 8,76$ pg; Doležel et al. 2007). Stupeň ploidie byl interpretován porovnáním s intenzitou fluorescence dalších (karyologicky ověřených) zástupců rodu *Dianthus*. Monoploidní velikost genomu u různých druhů hvozdíků se téměř neliší, u polyploidních taxonů navíc nedochází k tzv. „genome downsizing“ (tj. se zvyšující ploidii se monoploidní velikost genomu nesnižuje).

Výsledky

Všech 379 analyzovaných rostlin *D. moravicus* pocházejících ze sedmi známých lokalit je hexaploidní (obr. 37, tab. 29). Veškeré analýzy měly nízký variační koeficient (do 3%).

Tab. 29: Chromozomové počty v populacích *D. moravicus* podle různých pramenů. Uvedené ploidie jsou u Kovandy (1982, 1984) a Weiss et al. (2002) na základě počítání chromozomů, v této práci (Kalůsková 2012) byla použita průtoková cytometrie. $2n = 60$ představuje tetraploidní počet chromozomů, $2n = 90$ hexaploidní.

lokality	Kovanda 1982	Kovanda 1984	Weiss et al. 2002	Kalůsková (2012)	
				počet jedinců	
Kaple Sv. Floriána	60		90	90	70
Rokytná – vrch Tábor		60	90	90	10
Řeznovice – vrch Pekárka	60			90	39
Nové Bránice - Červená skála	60, 90			90	34
Bitov – Růžový vrch	90			90	95
Lubnice – údolí Želetavky	60, 90			90	95
Buben				90	36



Obr. 37: Histogram analýzy FCM hexaploidního *Dianthus moravicus*. DM je pík vzorku, P je pík standardu (*Pisum sativum*). Pík vzorku je v 0,45 násobku standardu. CV vzorku je 1,6.

Diskuze

Pro druh *Dianthus moravicus* byly udávány dva stupně ploidie: tetraploidní a hexaploidní, včetně smíšených populací těchto dvou cytotypů (Kovanda 1982, 1984). Weiss et al. (2002) našla o 20 let později u dvou populací, které byly udávány jako tetraploidní, pouze hexaploidní cytotyp. Počet somatických chromozomů byl však určen jen u 20 rostlin ze dvou populací, Kovanda počet analyzovaných jedinců neuvádí (Weiss et al. 2002).

K vyřešení tohoto rozporu byla v předkládané práci použita metoda průtokové cytometrie, která na rozdíl od počítání chromozomů umožňuje analyzovat velké množství vzorků v relativně krátkém čase a změřit tak relativní velikost genomu takřka celých populací. Výsledky ukázaly, že všechny analyzované rostliny (celkem 379 rostlin), které představovaly reprezentativní vzorek ze všech populací, jsou bez výjimky hexaploidní.

Vysvětlení pro odlišnost ve zjištěném stupni ploidie oproti údajům od Kovandy (1982, 1984) může být dvojí: (i) stupeň ploidie se na minimálně pěti ze sedmi lokalit (2 „smíšené“, 3 čistě „tetraploidní“) *D. moravicus* během 20-30 let změnil na výhradní zastoupení hexaploidů nebo (ii) uváděné tetraploidní chromozomové počty byly chybné. Existují čtyři důvody pro to se domnívat, že druhá možnost je mnohem pravděpodobnější: (i) chromozomy hvozdíků jsou malé a obtížně se počítají (Carolin 1957; Meusel & Mühlberg 1978), tudíž chybovost při jejich počítání může nastat, (ii) Kovanda neuvádí počet analyzovaných rostlin a neexistují trvalé preparáty ani jejich fotografie (Kovanda 1982, 1984), (iii) změnu ploidie během takto krátké doby sice nemůžeme zcela vyloučit, ale nezdá se být příliš pravděpodobnou (herbářové doklady rostlin počítaných Kovandou pro případnou revizi chybí) a (iv) při pohledu do jiných rodů, u kterých stejný autor počítal chromozomy (*Sorbus*; Vít 2006; *Campanula*; Rauchová 2007) se nemůže nezaujatý pozorovatel ubránit dojmu, že chybných počtů chromozomů je až příliš mnoho.

Závěr

Rod *Dianthus* je velice diverzifikovanou skupinou, u níž byla prokázána velice rychlá a relativně nedávná rozsáhlá speciace (Valente et al. 2010), která dala vznik velikému množství druhů, často dále členěných na infraspecifické úrovni. Důsledkem jsou jednak slabé reprodukčně-izolační bariéry mezi taxony (a tedy častá hybridizace) a obtížně rozpoznatelné taxony v raných stádiích speciace. Cílem této práce bylo odhalit některé mikroevoluční procesy probíhající u českých endemických zástupců rodu *Dianthus*. Diverzita rodu, v jehož evoluci sehrály významnou roli hybridizace, polyploidie a alopatriká speciace, z něj činí mimořádně vhodnou modelovou skupinu pro studium mikroevolučních procesů. Studium těchto procesů u endemických taxonů, které jsou prioritou ochrany přírody, navíc přispělo k jejich lepšímu poznání. V práci byla použita průtoková cytometrie, molekulární metody (mikrosatelity, sekvenace cpDNA), morfometrika a barvení pylu.

Výsledky práce jsou následující:

1. Pomocí průtokové cytometrie byla potvrzena mezidruhová hybridizace probíhající na NPP Kleneč mezi endemickým *D. arenarius* subsp. *bohemicus* a běžným *D. carthusianorum*. Četnost hybridů však není příliš vysoká a jsou z velké části sterilní. Endemický taxon tak pravděpodobně není ohrožen erozí genofondu. Hybridizace je obousměrná. V práci je přiložen klíč k rozpoznání hybridů od rodičovských taxonů.
2. Významnou roli v evoluci *D. carthusianorum* pravděpodobně sehrála edafická speciace. Morfologické odlišnosti jednotlivých poddruhů rostoucích ve střední Evropě (subsp. *carthusianorum*, subsp. *latifolius*, endemická subsp. *sudeticus* a *capillifrons*) odpovídá jejich poddruhové úrovni, tzn. existuje určité kontinuum mezi nimi (65-95% úspěšnost správného určení na základě morfometrických dat). Na úrovni velikosti genomu a genetické variability se jednotlivé poddruhy odlišují nedostatečně, ale pro potvrzení budou nutné další analýzy. Data prozatím naznačují polytopní vznik hadcového poddruhu *capillifrons*.
3. Revize cytotypové variability u *D. moravicus* nepotvrdila existenci udávaného tetraploidního cytotypu. Všechny analyzované vzorky byly hexaploidní.

Seznam literatury

- Abbott R. J. (1992):** Plant invasions, interspecific hybridization and the evolution of new plant taxa. – Trends in Ecology & Evolution 7: 401-405.
- AIPH/Union Fleurs (1997):** Yearbook of the international horticultural statistics, vol 45. – The Hague, The Netherlands: AIPH.
- Alexander M. P. (1969):** Differential staining of aborted and nonaborted pollen. – Stain Technology 44 (3): 117-122.
- Allendorf F. W., Leary R. F., Spruell P. & Wenburg J. K. (2001):** The problems with hybrids: setting conservation guidelines. – Trends in Ecology & Evolution 16(11): 613-622.
- Anderson E. (1948):** Hybridization of the habitat. – Evolution 2:1-9.
- Arnold M. L., Hodges S. A. (1995):** Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? – Trends in Ecology and Evolution 10: 67–71.
- Balao F., Casimiro-Soriguer R., Talavera M., Herrera J. & Talavera S. (2009):** Distribution and diversity of cytotypes in *Dianthus broteri* as evidenced by genome size variations. – Annals of Botany 104: 965–973.
- Balao F., Valente L. M., Vargas P, Herrera J. & Talavera S. (2010):** Radiative evolution of polyploid races of the Iberian carnation *Dianthus broteri* (Caryophyllaceae). – New Phytologist 187: 542–551.
- Beck-Pay S. L. (2012):** Optimisation of pollen viability tests for *Acacia podalyriifolia* and two ploidys of *Acacia mearnsii*. – South African Journal of Botany 78 (2012) 285–289.
- Bělohoubek J. (2008):** Záchraný program pro hvozdík písečný český. – AOPK ČR – Středisko Ústí n. Labem.
- Bleeker W. (2007):** Interspecific hybridization in *Rorippa* (Brassicaceae): patterns and processes. – Systematics and Biodiversity 5 (3): 311–319.
- Bleeker W. & Hurka H. (2001):** Introgressive hybridization in *Rorippa* (Brassicaceae): gene flow and its consequences in natural and anthropogenic habitats. – Molecular Ecology 10: 2013–2022.
- Bloch D., Werdenberg N. & Erhardt A. (2006):** Pollination crisis in the butterfly-pollinated wild carnation *Dianthus carthusianorum*? – New Phytologist 169: 699-706.

- Bookstein, F.L. (1991):** Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. – Cambridge Univ. Press. New York. 435 pp.
- Brady K. U., Kruckeberg A. R. & Bradshaw H. D. Jr (2005):** Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 243–266.
- Briggs D. & Walters S. M. (2001):** Proměnlivost a evoluce rostlin. – Olomouc 2001.
- Buell K. M. (1953):** Developmental Morphology in *Dianthus*. III. Seed failure Following Interspecific Crosses. – *American Journal of Botany* 40(3): 116-123.
- Bureš P., Šmarda P., Rotreklová O., Oberreiter M., Burešová M., Konečný J., Knoll A., Fajmon K. & Šmerda J. (2010):** Pollen viability and natural hybridization of Central European species of *Cirsium*. – *Preslia* 82: 391–422.
- Bureš P., Tichý L., Wang Y. F. & Bartoš J. (2003):** Occurrence of *Polypodium* × *mantoniae* and new localities for *P. interjectum* in the Czech Republic confirmed using flow cytometry. – *Preslia* 75: 293-310.
- Carolin R. C. (1957):** Cytological and hybridization studies in the genus *Dianthus*. – *New Phytologist* 56: 81-97.
- Constantinidis T. (1999):** *Dianthus haematocalyx* subsp. *phitosianus* (Caryophyllaceae), a new serpentine endemic from Greece. – *Phyton* 39(2): 277-291.
- Coyne J. A. & Orr H. A. (2004):** Speciation. – Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Cozzolino S., Nardella A. M., Impagliazzo S., Widmer A. & Lexer C. (2006):** Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? – *Biological Conservation* 129:14–23.
- Čeřovský J. (1992):** Hvozdík písečný český. Rostliny československé červené knihy. – *Živa*, Praha, 40 (79): 115.
- Čeřovský J. & Abtová M. (1999):** *Dianthus arenarius* L. subsp. *bohemicus* (Novák) O. Schwartz. – In: Čeřovský J., Feráková V., Holub J., Maglocký Š., Procházka F.: Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů ČR a SRO. Vol. 5 Vyšší rostliny. Str.128. Příroda, Bratislava.

- Čeřovský J. & Grulich V. (1999):** *Dianthus moravicus* Kovanda. – In: Čeřovský J., Feráková V., Holub J., Maglocký Š. & Procházka F.: Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů ČR a SRO. Vol. 5 Vyšší rostliny. Str. 130. Příroda, Bratislava.
- Dafni A. (1992):** Pollination Ecology: Practical Approach. – Oxford Univ. Press, Oxford.
- Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (2007):** Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Eggler J. (1963):** Bemerkungen zur Serpentinvegetation in der Gulsen und auf dem Kirchkogel bei Pernegg in Steiermark. – Mitteilungen des Naturwissenschaftlichen Vereins für Steiermark 93:49-54.
- Ekrt L., Holubová R., Trávníček P. & Suda J. (2010):** Species boundaries and frequency of hybridization in the *Dryopteris carthusiana* (Dryopteridaceae) complex: a taxonomic puzzle resolved using genome size data. – American Journal of Botany 97(7): 1208–1219.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. (2005):** Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. – Evolutionary Bioinformatics Online 1: 47–50.
- Fant J. B., Kamau E. A. & Preston C. D. (2003):** Chloroplast evidence for the multiple origins of the hybrid *Potamogeton* × *sudermanicus* Hagstr. – Aquatic Botany 75: 351–356.
- Ferguson C. J., Levin D. A. & Jansen R. K. (1999):** Natural hybridization between an outcrossing and the selfing *Phlox* (*Polemoniaceae*): the maternal species of F₁ hybrids. – Plant Systematics and Evolution 218: 153-158.
- Gargano D., Gullo T. & Bernardo L. (2009):** Do inefficient selfing and inbreeding depression challenge the persistence of the rare *Dianthus guliae* Janka (Caryophyllaceae)? Influence of reproductive traits on a plant's proneness to extinction. – Plant Species Biology 24: 69–76.
- Gerža M. (2009):** Endemismus v České republice. Rostliny - 1.část. – Ochrana přírody 2009/2: 12-19.
- Glaubitz J. C. (2004):** CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. – Molecular Ecology Notes 4: 309-310.
- Goldstein D. B. & Schlötterer C. [eds.] (1999):** Microsatellites. Evolution and Applications. – Oxford University Press.
- Goudet J. (1995):** FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. – Journal of Heredity 86:485–486.

- Hall T. A. (1999):** Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – Nucleic Acids Symposium Series 41: 95–98.
- Harris S. A. & Ingram, R. (1991):** Chloroplast DNA and biosystematics. The effect of intraspecific diversity transmission. – Taxon 40: 393-412.
- Heiser C. B. (1979):** Hybrid populations of *Helianthus divaricatus* and *H. microcephalus* after 22 years. – Taxon 28:71-75.
- Hegarty M. J. & Hiscock S. J. (2005):** Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. – New Phytologist 165: 411-423.
- Chytrý M. [ed.] (2007):** Vegetace České republiky. 1. Travná a keříčková vegetace. – Academia.
- Iwata H. & Ukai. Y. (2002):** SHAPE: A Computer Program Package for Quantitative Evaluation of Biological Shapes Based on Elliptic Fourier Descriptors. – The Journal of Heredity 93(5): 384-385.
- Iwata H., Niikura S., Matsuura S., Takano Y. & Ukai Y. (1998):** Evaluation of variation of root shape of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) based on image analysis using elliptic Fourier descriptors. – Euphytica 102 (2): 143-149.
- Jalas J. & Suominen J. [eds.] (1986):** Atlas Florae Europaeae: Distribution of vascular plants in Europe, Volume 7 – Caryophyllaceae (Silenoideae). – Helsinki: Committee for Mapping the Flora of Europe, 1986, 220 s.
- Kalendar R. (2005):** *Fast PCR*. Computer program, version 3.6.28, Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland.
- Kaplan Z. (2012):** Flora and phytogeography of the Czech Republic. – Preslia 84: 505–573.
- Kaplan Z. & Fehrer J. (2006):** Comparison of natural and artificial hybridization in *Potamogeton*. – Preslia 78: 303–316.
- Kimura T., Yagi M., Nishitani C., Onozaki T., Ban Y. & Yamamoto T. (2009):** Development of SSR markers in Carnation (*Dianthus caryophyllus*). – Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 78 (1): 115-123.
- Kmet'ová E. (1985):** Taxonómia druhu *Dianthus praecox* Kit. na Slovensku. – Biologické Práce Slovenskej Akadémie Vied 31(5): 1-80.
- Kolář F. & Vít P. (2008):** Endemické rostliny českých hadců 2. Chrastavec, mochna, hvozdík a trávnička. – Živa 2/2008.

- Kolář F., Lučanová M., Těšitel J., Loureiro J. & Suda J. (2012):** Glycerol-treated nuclear suspensions - an efficient preservation method for flow cytometric analysis of plant samples. – *Chromosome Research* 20 (2): 303-315.
- Kováč J. (1996):** Využití explantátových kultur k ochraně genofondu ohrožených druhů rostlin. [Doktorská disertační práce]. – Pedagogická fakulta UJEP Ústí nad Labem a Přírodovědecká fakulta UP Olomouc.
- Kovanda M. (1980):** A neglected endemic of the Eastern Sudeten. – *Preslia* 52: 117- 126.
- Kovanda M. (1982):** *Dianthus gratianopolitanus*: variability, differentiation and relationship. – *Preslia* 54: 223-242.
- Kovanda M. (1984):** Chromosome numbers in selected Angiosperms 2. – *Preslia, Praha*, 56: 289-301.
- Kovanda M. (1986):** Tři příběhy českého hvozdíku. – *Živa, Praha*, 34, 3: 83-84, 4: 128-129.
- Kovanda M. (1990):** *Dianthus* L. – hvozdík. – In: Hejný S. & Slavík B. [eds.]: *Květena České republiky* 2, pp. 200-213, Academia, Praha.
- 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.
- Krahulcová A., Krahulec F. & Kirschner J. (1996):** Introgressive hybridization between a native and an introduced species: *Viola lutea* subsp. *sudetica* versus *V. tricolor*. – *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* 31:219-244.
- Krahulcová A. & Rotreková O. (2010):** Use of flow cytometry in research on apomictic plants. – *Preslia* 82(1): 23–39.
- Krak K. (2011):** Využití sekvencí DNA při studiu evoluce rostlin. – *Zprávy České Botanické Společnosti* 46, *Materiály* 25: 95-125.
- Králik E. (1970):** Štúdium variability populácií *Dianthus carthusianorum* L. s. l. na Slovensku (diplomová práce). – Přírodovědecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave.
- Kron P., Suda J. & Husband B. C. (2007):** Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. – *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 847-876.
- Kruckeberg A. R. (1951):** Intraspecific variability in response of certain native plant species to serpentine soil. – *American Journal of Botany* 38: 408–419.

- Kruckeberg A. R. (1986):** An essay: The stimulus of unusual geologies for plant speciation. – *Systematic Botany* 11: 455–463.
- Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J. & Štěpánek J. [eds.] (2002):** Klíč ke květeně České republiky. – Academia, Praha.
- Kuhl F. P. & Giardina C. R. (1982):** Elliptic Fourier features of a closed contour. – *Computer Graphics and Image Processing* 18: 236–258.
- Lepší M., Vít P., Lepší P., Boublík K. & Kolář F. (2009):** *Sorbus portae-bohemicae* and *Sorbus albensis*, two new endemic apomictic species recognized based on a revision of *Sorbus bohemica*. – *Preslia* 81: 63–89.
- Leslie A. C. (1983):** The international *Dianthus* register (1983) + 20 následujících dodatků. – Royal Horticultural Society.
- Levin D. A., Francisco-Ortega J. & Jansen R. K. (1996):** Hybridization and the extinction of rare plant species. – *Conservation Biology* 10:10-16.
- Lihová J., Kochjarová J. & Marhold K., (2007):** Hybridization between polyploids *Cardamine enneaphyllos* and *C. glanduligera* in the West Carpathians: evidence from morphology, pollen fertility and PCR-RFLP patterns. – *Preslia* 79: 101–125.
- Löve A. (1982):** IOPB chromosome number reports LXXVI. – *Taxon* 31(3): 574-598.
- Lowe A. J. & Abbott R. J. (2000):** Routes of origin of two recently evolved hybrid taxa: *Senecio vulgaris* var. *hibernicus* and York radiate groundsel (Asteraceae). – *American Journal of Botany* 87: 1159–1167.
- Mahelka V., Suda J., Jarolímová V., Trávníček P. & Krahulec F. (2005):** Genome size discriminates between closely related taxa *Elytrigia repens* and *E. intermedia* (Poaceae: Triticeae) and their hybrid. – *Folia Geobotanica* 40: 367-384.
- Mandák B. (2011):** Mikrosatelity – jejich funkce, význam a použití. – *Zprávy České Botanické Společnosti* 46, Materiály 25: 79-94.
- Marhold K. & Suda J (2002):** Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody). Karolinum, Praha.
- Meusel H., Jäger E. & Weinert E. [eds.] (1965):** Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora. p. 142. – Gustav Fischer Verlag Jena, Jena.

- Meusel H. & Mühlberg H. (1978):** *Dianthus* L. – In: Hegi G.: Illustrierte Flora von Mitteleuropa, ed. 2, vol. 3/2, p. 984-1037. – München, Berlin et Hamburg.
- Nei M. (1975):** Molecular Population Genetics and Evolution. – Amsterdam: North Holland.
- Neumayer H. (1930):** Floristisches aus Österreich einschließlich einiger angrenzender Gebiete I. – Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft 79: 336-411.
- Neustupa J. (2006):** Co je to geometrická morfometrika aneb morfologie znovu na scéně. – Živa 2/2006: 54-56.
- Novák F. A. (1915):** Kritická studie o *Dianthus arenarius* L. a jemu blízce příbuzných druhích, a o jeho stanovišti v Čechách. – Věstník Královské České Společnosti Nauk, Praha, ser. math.-natur, 8: 1-27.
- Novák F. A. (1921):** Přehled českých hvozdíků. – Časopis Musea Království českého, 95: 54-62.
- Novák F. A. (1926):** Monografická studie o *Dianthus gratianopolitanus* Vill. – Spisy vydávané Přírodovědeckou fakultou Univerzity Karlovy 51: 1-32.
- Novák F. A. (1927a):** Monografická studie evropských hvozdíků rodu *Dianthus* ze skupiny *Dianthi fimbriati* (sekcio *Plumaria*). – Spisy vydávané Přírodovědeckou fakultou Univerzity Karlovy 76: 1-71.
- Novák F. A. (1927b):** Monografická studie o postglaciálních druhích rodu *Dianthus* ze sekce *Plumaria* (Opiz.). – Věstník Královské České Společnosti Nauk 9(2): 1-100.
- Nyberg Berglund A. B., Saura A. & Westerbergh A. (2001):** Genetic differentiation of a polyploid plant on ultramafic soils in Fennoscandia. – South African Journal of Science 97:533–35.
- Nybom H. (2004):** Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. – Molecular Ecology 13(5): 1143-1155.
- Olmstead R. G. & Palmer J. D. (1994):** Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. – American Journal of Botany 81: 1205-1224.
- Otto F. (1990):** DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. – In: Crissman H. A. & Darzynkiewicz Z. (eds.): Methods in Cell Biology, Vol. 33. Academic Press, New York, 105–110.
- Palmer, J. D., Jansen R. K., Michaels H. J., Chase M. W., Manhart J. R. (1988):** Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. – Annals of the Missouri Botanical Garden 75: 1180-1206.

- Peterson R., Slovin J. P. & Chen C. (2010):** A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. – *International Journal of Plant Biology* 1(e13): 66-69.
- Podani J. (2001):** *SYN-TAX 2000*. Computer programs for data analysis in ecology and systematics. User's manual. Scientia Publishing, Budapest.
- Procházka F., Bureš L. & Burešová Z. (1999):** *Dianthus carthusianorum* L. subsp. *sudeticus* Kovanda. – In: Čeřovský J., Feráková V., Holub J., Maglocký Š. & Procházka F.: Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů ČR a SRO. Vol. 5 Vyšší rostliny. Str. 129. Příroda, Bratislava.
- Procházka F. [ed.] (2001):** Černý a červený seznam cévnatých rostlin české republiky (stav v roce 2000). – *Příroda*, Praha, 18: 1-166.
- Prentis P. J., White E. M., Radford E. J., Lowe A. J. & Clarke A. R. (2007):** Can hybridization cause local extinction: a case for demographic swamping of the Australian native *Senecio pinnatifolius* by the invasive *Senecio madagascariensis*? – *New Phytologist* 176: 902–912.
- Pritchard J. K., Stephens M. & Donnelly P. (2000):** Inference of population structure using multilocus genotype data. – *Genetics* 155:945–959.
- Ramsey J. & Schemske D. W. (1998):** Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:4676–4501.
- Randell R. A., Howarth D. G. & Morden C. W. (2004):** Genetic analysis of natural hybrids between endemic and alien *Rubus* (Rosaceae) species in Hawai'i. – *Conservation genetics* 5: 217-230.
- Rauchová J. (2007):** Karyologická, fenetická a genetická diferenciace českého subendemického taxonu *Campanula gentilis* Kovanda. – Ms. [Dipl. práce, depon. In: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- Richards A. J. (1997):** Plant breeding systems. Second edition. – Chapman and Hall.
- Rieseberg L. H. (1995):** The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. – *American Journal of Botany* 82 (7): 944–953.
- Rieseberg L. H. & Carney S. E. (1998):** Tansley Review No. 102. Plant hybridization. – *New Phytologist* 140: 599– 624.
- Rieseberg L. H. & Ellstrand N. C. (1993):** What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? – *Critical Review in Plant Sciences* 12: 213–241.

- Rieseberg L. H., Whitton J. & Gardner K. (1999):** Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. – *Genetics* 152: 713-727.
- Rhymer J. M. & Simberloff D. (1996):** Extinction by hybridization and introgression. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 83-109.
- Rohweder H. (1934):** Beiträge zur Systematik und Phylogenie des Genus *Dianthus* unter Berücksichtigung der karyologischen Verhältnisse. – *Botanische Jahrbucher* 66: 249-368.
- Rosenbaumová R., Plačková I. & Suda J. (2004):** Variation in *Lamium* subg. *Galeobdolon* (Lamiaceae) – insights from ploidy levels, morphology and isozymes. – *Plant Systematics and Evolution* 244: 219-244.
- Rybka V., Rybková R. & Pohlová R. (2004):** Rostliny ve svitu evropských hvězd. Rostliny soustavy Natura 2000 v České republice. – *Sagittaria*.
- Rybka V. & Tichý L. (2005):** Metodika monitoringu evropsky významného druhu hvozdík moravsky (*Dianthus moravicus*). – *Agentura Ochrany Přírody a Krajiny ČR*.
- Schönswetter P., Suda J., Popp M., Weiss-Schneeweiss H. & Brochmann C. (2007):** Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (Juncaceae) inferred from AFLP fingerprints, cpDNA sequences, nuclear DNA content and chromosome numbers. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 92–103.
- Seifertová K. (2009):** Zhodnocení mezidruhové hybridizace hadcového endemita *Cerastium alsinifolium* Tausch (Caryophyllaceae). – Ms. [Dipl. práce, depon. In: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- Shaw J., Lickey E. B., Beck J. T., Farmer S. B., Liu W., Miller J., Siripun K. C., Winder C. T., Schilling E. E. & Small R. L. (2005):** The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. – *American Journal of Botany* 92(1): 142–166.
- Shaw J., Lickey E. B., Schilling E. E. & Small R. L. (2007):** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. – *American Journal of Botany* 94(3): 275–288.
- Slovák M., Vít P., Urfus T. & Suda J. (2009):** Complex pattern of genome size variation in a polymorphic member of Asteraceae. – *Journal of Biogeography* 36: 372-384.
- Smulders M. J. M., Rus-Kortekaas W. & Vosman B. (2000):** Microsatellite markers useful throughout the genus *Dianthus*. – *Genome* 43: 208-210.

- Smulders M. J. M., Noordijk Y., Rus-Kortekaas W., Bredemeijer G. M. M. & Vosman B. (2003):** Microsatellite genotyping of carnation varieties. – *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1191-1195.
- Suda J. (2011):** Průtoková cytometrie a její využití v botanice. – *Zprávy České Botanické Společnosti* 46, Materiály 25: 79-94.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P. & Krahulec F (2006):** Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. – *Taxon* 55 (2): 447-450.
- Suda J., Malcová R., Abazid D., Banaš M., Procházka F., Šída O. & Štech M. (2004):** Cytotype distribution in *Empetrum* (Ericaceae) at various spatial scales in the Czech Republic. – *Folia Geobotanica* 39: 161-171.
- Suda J. & Trávníček P. (2006):** Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry: new prospects for plant research. – *Cytometry Part A* 69A/4: 273-280.
- Štorchová H., Hrdličková R., Chrtěk J., Tetera M., Fitze D. & Fehrer J. 2000:** An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. – *Taxon* 49 (1): 79-84.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. & Bouvet J. (1991):** Universal primers for amplification of 3 noncoding regions of chloroplast DNA. – *Plant molecular biology* 17(5): 1105-1109.
- Thompson J. D., Gaudeul M. & Debussche M. (2010):** Conservation value of sites of hybridization on peripheral populations of rare species. – *Conservation biology* 24(1): 236-245.
- Toman M. (1986):** Taxonomische Problematik und Populationcharakteristik des angeblichen Endemiten der tschechoslowakischen Flora, *Dianthus novakii*. – *Gleditschia* 14(1): 68- 84.
- Toman M. (2000):** Problematika klenečského hvozdíku. – *Vlastivědný sborník Podřipska* 10: 134-139.
- Tutin T. G. & Walters S. M. (1993):** *Dianthus* L. in Tutin T. G., Burges N. A., Chater A. O., Redmonson J. R., Heywood V. H., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. [ed.] (1993): *Flora europaea* – Vol. 1, Lycopodiaceae to Platanaceae. – Cambridge University Press.
- Valente L. M., Savolainen V. & Vargas P. (2010):** Unparalleled rates of species diversification in Europe. – *Proceedings of the royal society B-biological science* 277: 1489-1496.

- Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M. & Shipley P. (2004):** MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. – *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Vinter V., Mikulík J., Blahoušek O. (2001):** Hvozdík kartouzek hadcový u Raškova. – *Živa* 6: 255.
- Viscosi V. & Fortini P. (2011):** Leaf shape variation and differentiation in the three sympatric white oak species revealed by elliptic Fourier analysis. – *Nordic Journal of Botany* 29: 632-640.
- Vít P. (2006):** Variabilita endemických zástupců rodu *Sorbus* L. v ČR: morfometrické, karyologické a molekulární zhodnocení. – Ms. [Dipl. práce, depon. In: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- Weir B. S. & Cockerham C. C. (1984):** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. – *Evolution* 38: 1358-1370.
- Weising K., Nybom H., Wolff K. & Kahl G. (2005):** DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods, and Applications. – CRC Press.
- Weiss H., Dobeš C., Schneeweiss G. M. & Greimler J. (2002):** Occurrence of tetraploid and hexaploid cytotypes between and within populations in *Dianthus* sect. *Plumaria* (Caryophyllaceae). – *New Phytologist* 156: 85-94.
- Werlemark G., Uggla M. & Nybom H. (1999):** Morphological and RAPD markers show a highly skewed distribution in a pair of reciprocal crosses between hemisexual dogrose species, *Rosa* sect. *Caninae*. – *Theoretical and Applied Genetics* 98: 557-563.
- Williams F. N. (1893):** A monograph of the genus *Dianthus* Linn. – *Journal of the Linnean Society (Botany)* 29: 346-478.
- Wissemann V. (2006):** Plant evolution by means of hybridization. – *Systematics and Biodiversity* 5(3): 243-253.
- Wolf D. E., Takebayashi N. & Rieseberg L. H. (2001):** Predicting the Risk of Extinction through Hybridization. – *Conservation Biology* 15: 1039-1053.
- Yoshioka Y., Iwata H., Ohsawa R. & Ninomiya S. (2004):** Analysis of petal shape variation of *Primula sieboldii* by Elliptic Fourier Descriptors and Principal Component Analysis. – *Annals of Botany* 94: 657-664.
- Záchranné programy [online].** ©2012 [cit. 2012-08-02]. Dostupné z: <http://www.zachranneprogramy.cz/index.php?docId=2291&parentId=2259&spec=rosliny>.

Zalecka R. & Wierzbicka M. (2002): The adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. (*Caryophyllaceae*) to growth on a zinc–lead heap in southern Poland. – *Plant and Soil* 246: 249–257.

Zohary D. & Nur U. (1959): Natural triploids in the orchard grass, *Dactylis glomerata* L., polyploid complex and their significance for gene flow from diploid to tetraploid levels. – *Evolution* 13(3): 311-317.

Seznam obrázků

Část první: Frekvence a důsledky mezidruhové hybridizace *D. arenarius* subsp. *bohemicus*

Dianthus arenarius L.

Obr. 1: Rozšíření *D. arenarius* subsp. *borussicus* (kolečko), subsp. *arenarius* (trojúhelník) a subsp. *bohemicus* (hvězdička; převzato z Jalas & Suominen 1986).

Obr. 2: Rozšíření *D. arenarius* subsp. *pseudoserotinus* (kolečko) a subsp. *pseudosquarrosus* (trojúhelník) na Ukrajině (převzato z Jalas & Suominen 1986).

Dianthus arenarius L. subsp. *bohemicus* (NOVÁK) O. SCHWARZ

Obr. 3: *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus*.

Rizika hybridizace

Obr. 4: Základní typy hybridizace (převzato z Allendorf et al. 2001).

Terénní práce a odběr vzorků

Obr. 5: Schéma části lokality NPP Kleneč s vyznačenými hybridy.

Obr. 6: Upravený letecký snímek NPP Kleneč (www.mapy.cz). Segment A je vyznačen červeně.

Průtoková cytometrie

Obr. 7: Histogram společné analýzy diploidního *D. carthusianorum* (C), tetraploidního *D. arenarius* subsp. *bohemicus* (B) a jejich triploidního křížence (H).

Obr. 8: Variabilita *D. arenarius* subsp. *bohemicus* (vlevo rostlina s červenými skvrnami a brvami na bázi čepele korunního lístku; vpravo jedinec s růžovými korunními lístky). Oba jedinci vykazují obsah jaderné DNA typický pro *D. arenarius*.

Zhodnocení fertility hybridů

Obr. 9: Ukázka preparátů prašníků s pylovými zrny obarvenými Alexandrovým barvivem (fialově - životaschopný pyl, zeleně - abortovaný pyl). Na snímku vlevo je hybrid H30, který má cca 25% životaschopného pylu, na snímku vpravo je *D. arenarius* subsp. *bohemicus*.

Morfometrika

Obr. 10: Gynodioecie u *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus*. Zleva: hermafroditní rostlina, rostlina se zakrnělými prašníky, samičí rostlina.

- Obr. 11: Grafický výstup PCA pro *D. arenarius* subsp. *bohemicus* (červeně), *D. carthusianorum* (modře), hybrida, jehož mateřskou rostlinou je *D. arenarius* (růžově) a hybrida, jehož mateřskou rostlinou je *D. carthusianorum* (oranžově), s použitím všech 13 znaků.
- Obr. 12: Kanonická diskriminační analýza (CDA) pro *D. arenarius* subsp. *bohemicus* (červeně), *D. carthusianorum* (modře), hybrida, jehož mateřskou rostlinou je *D. arenarius* (růžově) a hybrida, jehož mateřskou rostlinou je *D. carthusianorum* (oranžově), s použitím 12 znaků.
- Obr. 13: Obkreslené obrysy korunních lístků. Zleva: *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, hybrid a *D. carthusianorum*.
- Obr. 14: Obkreslené obrysy podkališních listenců. Zleva: *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, hybrid a *D. carthusianorum*.
- Obr. 15: Obkreslené poloviny obrysů kalichů. Zleva: *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, hybrid a *D. carthusianorum*.
- Obr. 16: PCA Fourierových koeficientů popisující celkový tvar podkališních listenců *D. arenarius* subsp. *bohemicus* (červeně), *D. carthusianorum* (modře), hybrida, jehož mateřskou rostlinou je *D. arenarius* (růžově) a hybrida, jehož mateřskou rostlinou je *D. carthusianorum* (žlutě).

Část druhá: Evoluční historie *Dianthus carthusianorum* ve střední Evropě

Dianthus carthusianorum L.

- Obr. 17: Celkové rozšíření *Dianthus carthusianorum* (převzato z Jalas & Suominen 1986).
- Obr. 18: Rozšíření *D. carthusianorum* subsp. *latifolius* (černé body), subsp. *sudeticus* (červený bod) a subsp. *capillifrons* (zelené body) (převzato z Jalas & Suominen 1986; upraveno).
- Obr. 19: *Dianthus carthusianorum* subsp. *carthusianorum*
- Obr. 20: *Dianthus carthusianorum* subsp. *latifolius*
- Obr. 21: *Dianthus carthusianorum* subsp. *capillifrons*
- Obr. 22: *Dianthus carthusianorum* subsp. *sudeticus*

Terénní práce a odběr vzorků

- Obr. 23: Mapa sběrů *D. carthusianorum* a *D. pantederae*. Legenda: *D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum* (červeně), subsp. *latifolius* (modře), subsp. *capillifrons* (zeleně), subsp. *sudeticus* (žlutě), *D. pantederae* (fialově) a fenotypově přechodné populace (šedě).

Průtoková cytometrie

Obr. 24: Srovnání velikosti genomu (v pg) jednotlivých taxonů (první čtyři taxony jsou poddruhy *C. carthusianorum*, poslední představuje *D. pontederae*).

Morfometrika

Obr. 25: PCA zobrazující fenotypové podobnosti 724 jedinců všech studovaných taxonů s použitím všech 28 znaků.

Obr. 26: PCA pro všechny 4 studované poddruhy *D. carthusianorum* (bez nezařazených populací a *D. pontederae*) s použitím všech 28 znaků.

Obr. 27: PCA pro *D. pontederae* (fialově) a *D. carthusianorum* (všechny studované poddruhy; tyrkysově) s použitím všech 28 znaků.

Obr. 28: CDA pro všechny poddruhy *D. carthusianorum* (červeně subsp. *carthusianorum*, modře subsp. *latifolius*, zeleně subsp. *capillifrons* a žlutě subsp. *sudeticus*) s použitím všech 28 znaků.

Obr. 29: CDA pro *D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum* (červeně) a subsp. *latifolius* (modře) s použitím všech 28 znaků.

Obr. 30: CDA pro *D. carthusianorum* subsp. *sudeticus* (žlutě) a subsp. *latifolius* (modře) s použitím všech 28 znaků.

Obr. 31: CDA pro hadcové (subsp. *capillifrons*, zeleně) a nehadcové populace *D. carthusianorum* (subsp. *carthusianorum*, subsp. *latifolius* a subsp. *sudeticus*; černě).

Analýza mikrosatelitů

Obr. 32 a 33: PCoA délek mikrosatelitových alel (převedených do binární matice) pro všechny studované taxony.

Obr. 34 a 35: PCoA mikrosatelitových alel (převedených do binární matice) pro všechny poddruhy *D. carthusianorum* (červeně subsp. *carthusianorum*, modře subsp. *latifolius*, zeleně subsp. *capillifrons* a žlutě subsp. *sudeticus*).

Část třetí: Revize ploidní variability *Dianthus moravicus*

Obr. 36: Rozšíření *Dianthus moravicus*.

Obr. 37: Histogram analýzy FCM hexaploidního *Dianthus moravicus*.

Seznam tabulek

Část první: Frekvence a důsledky mezidruhové hybridizace *D. arenarius* subsp. *bohemicus*

***Dianthus arenarius* L.**

Tab. 1: Přehled znaků pro jednotlivé poddruhy *Dianthus arenarius* (podle Tutin & Walters 1993 a Kovanda 1990).

Průtoková cytometrie

Tab. 2: Absolutní velikosti genomu (v pikogramech DNA) studovaných taxonů.

Tab. 3: Velikost genomu skutečné a teoretických hybridních kombinací.

Analýza haplotypů

Tab. 4: Přehled použitých chloroplastových úseků.

Tab. 5: PCR mix pro jeden vzorek.

Tab. 6: PCR cyklus.

Tab. 7: cpDNA haplotypy (úsek *psbJ-petA*) *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, *D. carthusianorum* a jejich hybrida.

Zhodnocení fertility hybridů

Tab. 8: Složení barvicích směsí podle Alexandra (Alexander 1969) a Peterson et al. (2010).

Tab. 9: Viabilita pylu hybridů na základě barvení podle Alexandra (Alexander 1969) a podle Peterson et al. (2010).

Tab. 10: Počet analyzovaných tobolek u jednotlivých hybridů.

Morfometrika

Tab. 11: Přehled měřených morfologických znaků.

Tab. 12: Kanonické korelační koeficienty pro všechny znaky kromě v12 (těsně korelován s v11).

Tab. 13: Klasifikační diskriminační analýza *D. arenarius* subsp. *bohemicus*, *D. carthusianorum* a hybrida s použitím všech znaků.

Tab. 14: Přehled základních statistik pro jednotlivé znaky (minimum, maximum, průměr, 5% a 95% kvantil) a jednotlivé taxony.

Část druhá: Evoluční historie *Dianthus carthusianorum* ve střední Evropě

Průtoková cytometrie

Tab. 15: Absolutní velikosti genomu v pikogramech.

Tab. 16: Statistická průkaznost rozdílů ve velikosti genomu mezi jednotlivými dvojicemi taxonů testována procedurou GLM v programu SAS..

Tab. 17: Korelace velikosti genomu poddruhů *carthusianorum*, *latifolius* a *capillifrons* se zeměpisnou šířkou a délkou.

Morfometrika

Tab. 18: Přehled měřených/počítaných morfologických znaků.

Tab. 19: Kanonické korelační koeficienty pro analýzu všech poddruhů *D. carthusianorum* s použitím všech znaků.

Tab. 20: Klasifikační diskriminační analýza všech 4 studovaných poddruhů *D. carthusianorum* (subsp. *carthusianorum*, subsp. *latifolius*, subsp. *capillifrons* a subsp. *sudeticus*) s použitím všech znaků.

Analýza mikrosatelitů

Tab. 21: Přehled vyzkoušených mikrosatelitových primerů a jejich základní charakteristiky (sekvence, typ repetitivní sekvence, délka amplifikovaných fragmentů, fluorescenční označení).

Tab. 22: Multiplex PCR mix pro jeden vzorek. První multiplex obsahuje 3 primery (MS-DCAMCRBSY, CF003a, CB018a) a druhý 4 (MS-DCDIA30, MS-DINGSTA, CB057a, DCB109).

Tab. 23: PCR cyklus

Tab. 24: Výstup analýzy AMOVA (Arlequin) porovnávající jednotlivé populace a taxony *D. carthusianorum* a *D. pontederiae*.

Tab. 25: Hodnoty vážené F_{ST} přes všechny mikrosatelitové lokusy mezi jednotlivými studovanými taxony (*Number of pairwise difference*, Arlequin).

Tab. 26: Stupeň inbreedingu (F_{IS}) v rámci taxonu pro jednotlivé mikrosatelitové lokusy a taxony (*D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum* - car, subsp. *latifolius* - lat, subsp. *capillifrons* - cap a subsp. *sudeticus* - sud, *D. pontederiae* - pon a nezařazené populace - nez).

Tab. 27: Míra heterozygotnosti jednotlivých mikrosatelitových lokusů podle Nei (1975).

Tab. 28: Frekvence nulových alel pro jednotlivé lokusy a taxony (*D. carthusianorum* subsp. *carthusianorum* - car, subsp. *latifolius* - lat, subsp. *sudeticus* - sud, subsp. *capillifrons* a *D. pontederiae*).

Část třetí: Revize ploidní variability *Dianthus moravicus*

Tab. 29: Chromozomové počty v populacích *D. moravicus* podle různých pramenů.