

**Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity  
Karlovy v Praze**



**Diplomová práce**

**Variabilita endemických zástupců rodu  
*Sorbus* L. v ČR: morfometrické, karyologické a  
molekulární zhodnocení**

**Petr Vít**

**Školitel: RNDr. Jan Suda, PhD.**

**Praha 2006**

Diplomová práce **Petra Víta** byla obhájena na katedře botaniky PřF UK v Praze dne 19.9.2006 a ohodnocena klasifikačním stupněm **v ý b o r n ě**.



### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně s použitím zdrojů, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

*Petr Nový*

Poděkování patří na prvním místě Honzovi Sudovi za precizní vedení práce a připomínkování prvotin až do finální verze.

Dále bych rád poděkoval Tomášovi Férovi za vedení a mnohé konzultace molekulární části práce, Pavlovi Trávníčkovi za pomoc při cytometrických analýzách a statistickém zpracování všech dat, panu Sponkovi za věcné připomínky, Tomášovi Urfusovi za vytvoření zdravě kompetičního prostředí, rodině a Tereze za ideální podmínky, které mi poskytly pro zpracování této práce.

**Obsah**

<b>Úvod</b> .....	<b>3</b>
<b>Charakteristika rodu <i>Sorbus</i> L.</b> .....	<b>4</b>
Podrobná morfologická charakteristika znaků rodu .....	4
Počet taxonů .....	6
Geografická distribuce čeledi <i>Maloideae</i> a rodu <i>Sorbus</i> .....	6
Karyologie .....	9
Reprodukční způsoby a embryologie rodu <i>Sorbus</i> .....	10
Hybridizace .....	12
<b>Výskyt zástupců rodu <i>Sorbus</i> v ČR</b> .....	<b>16</b>
<b>Charakteristika jednotlivých druhů</b> .....	<b>22</b>
<i>Sorbus alnifrons</i> KOVANDA .....	22
<i>Sorbus bohemica</i> KOVANDA .....	22
<i>S. eximia</i> KOVANDA .....	23
<i>Sorbus gemella</i> KOVANDA .....	24
<i>Sorbus hardeggensis</i> KOVANDA .....	25
<i>Sorbus rhodanthera</i> KOVANDA .....	26
<i>Sorbus quernea</i> KOVANDA .....	27
<i>Sorbus sudetica</i> (TAUSCH) BLUFF, NEES ET SCHAUER .....	28
Populace Knobloška .....	30
Populace Milá .....	30
<b>Cytometrie a karyologie</b> .....	<b>32</b>
Metodika .....	32
Výsledky cytometrie a karyologie .....	35
<b>Morfometrické analýzy</b> .....	<b>42</b>
Metodika .....	42
Výsledky morfometrických analýz .....	49
<b>Molekulární analýzy</b> .....	<b>65</b>
Metodika .....	65
Výsledky molekulárních analýz .....	71
<b>Diskuse</b> .....	<b>81</b>



<b>Závěr .....</b>	<b>91</b>
<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>92</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>98</b>
<b>Seznam obrázků.....</b>	<b>99</b>
<b>Seznam tabulek.....</b>	<b>102</b>
<b>Přílohy .....</b>	<b>104</b>

## ÚVOD

Rod *Sorbus* L. (jeřáb) patří mezi taxonomicky značně problematickou skupinu cévnatých rostlin. Svoji diverzitou ho lze zařadit po bok obdobně složitých rodů jako jsou *Hieracium* L., *Taraxacum* WIGG., případně *Rubus* L. Z květeny České republiky je udáváno minimálně 17 taxonů, jiné středoevropské státy jsou co do počtu taxonů ještě výrazně bohatší (např. 36 druhů udávaných z Německa; Meyer et al. 2005).

Velkou měrou se na taxonomické složitosti rodu podílí souhra několika evolučních procesů jako je mezidruhovná hybridizace, s ní spojená polyploidizace a přechod k agamospermickému způsobu reprodukce. Vzniká tak řada hybridogenních morfotypů, které jsou „úspěšné“ v místě vzniku a jejich populace jsou jasně geograficky ohraničené. Tyto taxony, ač mají stejnou rodičovskou kombinaci, jsou diferencovány souborem minuciálních, avšak ±stálých znaků a jejich rozpoznání často činí potíže.

Vzhledem k tomu, že různých hybridizačních událostí se účastnili genotypově odlišní jedinci rodičovských druhů, bývají i produkty hybridizace více či méně rozdílné. Jednotlivé ustálené morfotypy jsou odlišovány jako samostatné taxony, často vázané na geograficky omezené oblasti (endemity). V rámci české květeny je rod *Sorbus* se svými 8 druhy, které svým rozšířením (téměř) nepřekračují území naší republiky, nejbohatší endemickou skupinou cévnatých rostlin (tvoří přibližně jednu čtvrtinu všech endemických taxonů). Tento endemický statut je nominuje mezi skupiny, které si zasluhují podrobné biosystematické studium.

### **Cíle diplomové práce**

V diplomové práci jsou řešeny následující okruhy otázek:

- 1) Jaký je ploidní stupeň jednotlivých hybridogenních druhů (s cílem zahrnout všechny známé jedince) a jaká je absolutní velikost jejich jaderného genomu? Existuje vnitrodruhovná variabilita ve stupni ploidie? Lze nelézt mezidruhovové rozdíly v absolutní velikosti genomu? Lze velikost genomu použít jako druhově-specifický marker?
- 2) Jaká je morfologická variabilita jednotlivých taxonů (vnitropopulační, mezipopulační, mezidruhovová)? Jsou jednotlivé dosud uznávané taxony morfologicky vyhraněné?
- 3) Jaké způsoby reprodukce lze u jednotlivých taxonů zaznamenat?
- 4) Jaká je molekulární variabilita jednotlivých taxonů (vnitropopulační, mezipopulační, mezidruhovová)? Vznikly jednotlivé druhy jen jedenkrát nebo mají polytopní vznik?



## **Charakteristika rodu *Sorbus* L.**

Rod *Sorbus* patří do čeledi *Rosaceae* a podčeledi *Maloideae*. Tato čeleď je charakterizována přítomností *hypanthia* (češule) a základním chromozómovým číslem  $x = 17$ . Zástupci rodu jsou keře nebo stromy s opadavými palistnatými listy. Listy jsou většinou jednoduché nebo lichožpeřené. Květy mají v chocholičnatých latách (*corymbothyrus*) s češulí nálevkovitého tvaru. Kališní lístky jsou vytrvávající v zaschlé či ve zdužnatělé podobě. Korunní lístky bývají většinou okrouhlé až eliptické, bílé až nažloutlé, vzácně růžové. Plodolistů je 2-5 a jsou buď volné nebo do různé míry vzájemně srostlé s volným vrcholem semeníku. Semeník je spodní nebo polospodní. V každém pouzdru jsou dvě vajíčka, z nich však dozrává většinou jen jedno. Plody jsou malvice, různého tvaru, velikosti i barvy. Endokarp malvic je značně variabilní - blanitý, kožovitý, chrupavčitý nebo peckovitý (Kovanda 1959, 2002, 2003, Kutzelnigg et Silbereisen 1994).

### **Podrobná morfologická charakteristika znaků rodu**

Listy jsou u jeřábů opadavé se zřetelně vyvinutými palisty, které zasychají s rozkvetem květů. Řapík je různě dlouhý (u *S. torminalis* (L.) CRANTZ<sup>\*)</sup> až 50 mm, u *S. chamaemespilus* (L.) CRANTZ pouze 3-6 mm). Tvar listů u jeřábů je velmi variabilní, bývá však charakteristický pro jednotlivé skupiny. Pokud je čepel jednoduchá, pak je vždy pilovitá. Okraje jsou buď jemně pilovité (např. *S. chamaemespilus*), dvojité pilovité až zastříhované (*S. danubialis* (JÁVORKA) PRODAN) nebo slabě až hluboce laločnaté (hybridogenní druhy). U lichožpeřených listů jsou lístky vždy vstřícné, okraje jsou slabě pilovité, u hybridogenních druhů s lichožpeřenými listy může být spodní část čepele zpeřená a horní pouze laločnatá. Odění listů je variabilní mezi taxony a mění se i během vegetační sezóny (lysé listy u *S. torminalis*, *S. chamaemespilus*, *S. aucuparia* ssp. *glabrata* (W. ET GR.) CAJANDER; oděné až hustě plstnaté listy během sezóny částečně olysávají např. u *S. aria* (L.) CRANTZ). Listy jsou také jedním ze spolehlivých znaků k determinaci hybridních typů oproti rodičovským druhům.

Květenství je u rodu *Sorbus* chocholičnatá lata (*corymbothyrus* – lata s prodlouženými postranními větvemi, květy tak leží v jedné rovině). Květy jsou pravidelné, cyklické, heterochlamydní, hermafroditické, původně pentamerické (K5 C5 A10+5+5 G(5) ) semeník spodní nebo polospodní. Pro jeřáby je stejně jako pro celý řád *Rosales* charakteristický útvar *hypanthium* – češule. Korunní plátky jsou okrouhlé až široce eliptické,

---

<sup>\*)</sup> Nomenklatura jmen taxonů byla sjednocena dle Kubát et al. 2002.

případně až vejčité podlouhlé. Největší korunní plátky má *S. aria* (až 8 mm dlouhé), nejmenší *S. aucuparia* L. (3 mm). Kališní lístky přisedají na okraji češule, jsou špičaté či tupé, v době květu jsou ohrnuty vně a dolů, nebo podepírají korunní plátky, za plodu jsou zaschlé nebo zdužnatělé. Stavbou pestíku se jednotlivé druhy podstatně liší. Počet plodolistů kolísá od dvou (*S. torminalis*) do pěti (*S. domestica* L.). Stupeň srůstu čnělky je výrazně proměnlivý i v rámci jednoho květenství, zvláště u *S. torminalis* a rodičovských kombinací *S. torminalis* × *S. aria*, např. u *S. torminalis* jsou dvě čnělky srostlé jen v dolní polovině, u *S. aria*, *S. danubialis* a *S. aucuparia* jsou dvě až tři volné. Plodem jeřábů jsou malvice různého tvaru, velikosti, barvy a přítomnosti lenticel. Endokarp je blanitý (*S. domestica*), chrupavčitý až dřevnatý (*S. torminalis*). Fylogeneticky se malvice odvozují od peckovice (Kovanda 1959). Sklereidy vyskytující se v mesokarpu rodů *Sorbus* jsou dle autora zbytkem vnější části sklerokarpického endokarpu (pecky), malvice tak pravděpodobně vznikla z peckovice redukcí endokarpu (Kovanda 1959, 2003).

Jméno *Sorbus* je prvně doložené u Plinia staršího (Kovanda 1959), avšak staří Římané pod tímto názvem rozuměli *S. domestica* (oskeruši) a možná i *S. torminalis* (břek). Plody těchto stromů používali jako ovoce a léčiva. Jméno samotné je odvozeno buď od latinského *sorbere* = polknouti, pohltni nebo od arabského *sorbet* = jeřáb. Z tohoto základu vzniklo evropské *ereb*, které se v různých obměnách vyskytuje ve většině slovanských jazyků. České jméno odvozuje Polívka (1900) od slovanského *rjab* (*rjaboj* rusky, *jarabý* slovensky, v moravských nářečích *jeřabý*) – což představuje strakatý, pestrý či kropenatý, pravděpodobně vzhledem k plodům, případně listům na podzim (V. Větvicka, úst. sděl). Rostafínski (1900) dává původ jména do souvislosti s hrabavým ptákem jeřábkem (*Bonasia bonasia* ssp. *rupestris* Brehm), kterému prý slouží malvice jeřábů jako potrava. Potrava tohoto hrabavého ptáka se skládá také z pupenů a plodů, vzhledem k jeho rozšíření, jeřábu ptačího – *S. aucuparia* (Hudec et Černý 1977). Ve většině národních jazyků mají jednotlivé jeřáby vlastní pojmenování (muk, břek, mišpulka, oskeruše), což nasvědčuje odlišnému vnímání jednotlivých taxonů historickými kulturami. Jako jeřáb byl dříve i v našich zeměpisných šířkách vnímán pouze *S. aucuparia*.

Rod *Sorbus* je dále tradičně (Kovanda 1961a) členěn do pěti podrodů, ze kterých tři jsou monotypické a dva jsou polymorfní:

Podrody: *Torminaria* (*S. torminalis*)  
*Cormus* (*S. domestica*)  
*Chamaemespilus* (*S. chamaemespilus*)  
*Aria*  
*Sorbus* s. str.

Toto relativně jednoduché rozdělení na jednotlivé primární sexuální taxony je v kontrastu s existencí složitých apomiktických a hybridogenních taxonů v celé Evropě (Challice et Kovanda 1978). Fritschovo (1898, 1899) rozdělení je analogické uvedeným pěti skupinám, rozeznává je však na úrovni sekcí. Tyto podrody jsou morfologicky odlišné a jsou jasně definovány. Jedná se o pohlavně se rozmnožující, většinou diploidní druhy ( $2n = 34$ ). Triploidie a tetraploidie byla nalezena u dvou rodičovských druhů – *S. torminalis* a *S. chamaemespillus*, jedná se ale o vzácné případy ze severní Afriky a jižní Evropy a Polska (více viz část Karyologie; Aldasoro et al. 1998, Liljefors 1953, Pogan et al 1985).

### Počet taxonů

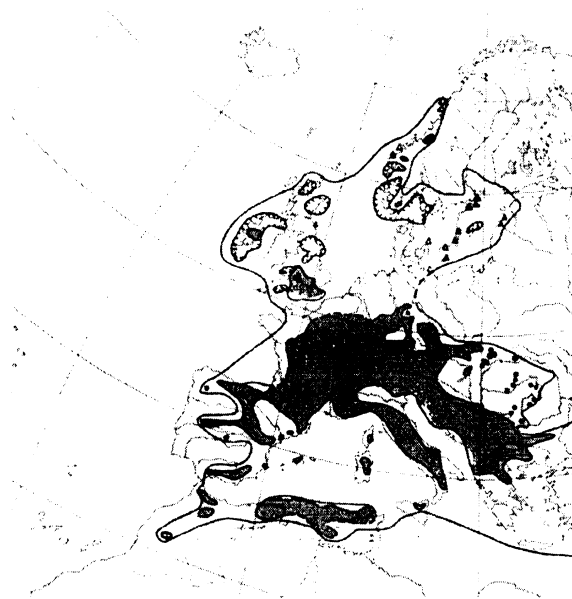
Počet druhů není možné s jistotou určit, neboť záleží na jejich pojetí. Monograf rodu Hedlung (1901) uvádí v prvním uceleném zpracování pouhých 55 druhů, včetně několika poddruhů. Během 20. století přibylo mnoho taxonů, zvláště ve Velké Británii (Warburg 1952) a ve Skandinávii (Liljefors 1953). Warburg a Kárpáti (1968) udávají přibližný počet taxonů v celé Evropě kolem 100. Kutzelnigg et Silbereisen 1994 již udávají 200 taxonů, a tento počet nadále vzrůstá.

### Geografická distribuce čeledi *Maloideae* a rodu *Sorbus*

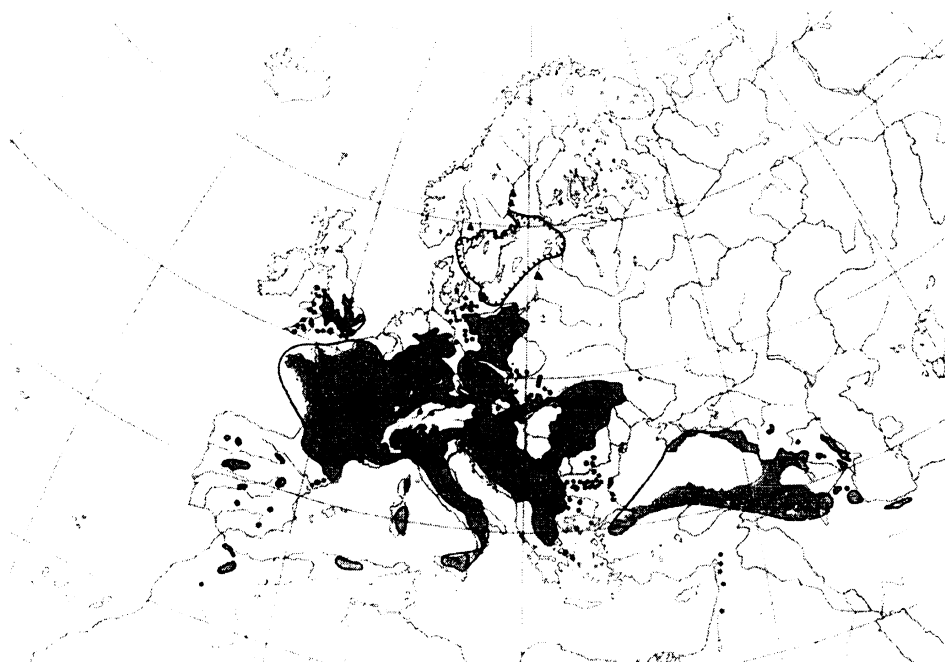
Vývojovým centrem podčeledi *Maloideae* je Asie, zvláště její centrální část. Většina rodů se vyskytuje v Asii, odkud migrovali směrem západním i východním (Kovanda 1959). Rod *Sorbus* je rozšířen převážně v mírném pásu severní polokoule, především v celé Evropě, severní Africe, Asii (od severu po Himaláj) a stejně v severní Americe po sever Mexika (Kutzelnigg et Silbereisen 1994). Podrody *Aria* a *Torminaria* obývají pouze Evropu a jihozápadní Asii, podrod *Aucuparia* celou Eurasii a Severní Ameriku a podrod *Cormus* a

*Chamaemespilus* pouze část Evropy. Současné centrum diverzity rodu leží v Evropě (Challice et Kovanda 1978).

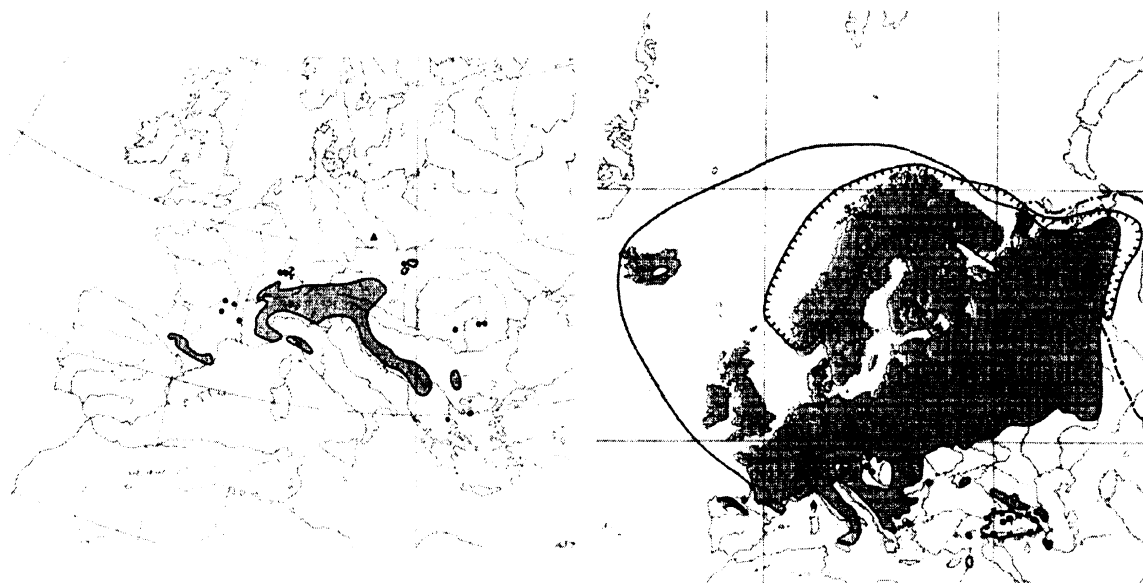
Kovanda (1961b) předpokládá vztah mezi frekvencí hybridogenních taxonů a geografickými areály jednotlivých primárních druhů. Porovnáním jejich geografické distribuce zjistil, že největší polymorfismus hybridů se vyskytuje právě v blízkosti geografické hranice jednoho z primárních druhů. Je obecně známo, že morfotypy vyskytující se na okrajích areálů taxonů se podstatně liší od typů z evolučního centra. U rodičovské kombinace *S. aria* × *S. torminalis* uvádí Kovanda (1961b) jako centrum zvláště Duryňsko, České středohoří a západní část maďarských centrálních pohoří, z kombinace *S. aria* × *S. aucuparia* jižní část Skandinávie a jih a západ Velké Británie a z kombinace *S. aria* × *S. chamaemespilus* Schwarzwald, Vogézy a pohoří Jura. Mapy rozšíření jednotlivých rodičovských druhů zachycují obrázky 1 až 4 (Meusel et al. 1965).



Obr. 1: Rozšíření *S. aria* (tmavé šrafování) (Meusel et al. 1965).



Obr. 2: Rozšíření *S. torminalis* (tmavé šrafování) (Meusel et al. 1965).



Obr. 3 a 4: Rozšíření *S. chamaemespilus* (vlevo, tmavé šrafování, trojúhelník označuje výskyt *S. sudetica*) a *S. aucuparia* (vpravo, tmavé šrafování) (Meusel et al. 1965).

V České republice se přirozeně vyskytuje 17 druhů jeřábů, z tohoto počtu je 8 (sub)endemitních. Jejich výčet společně s oblastmi výskytu udává tabulka 1.

Tab. 1: (Sub)endemitní jeřáby ČR a oblasti jejich výskytu.

Druh	Výskyt
<i>S. bohemica</i> KOVANDA	České středohoří (18 populací)
<i>S. rhodantha</i> KOVANDA	Chlumská hora u Manětína (1 populace)
<i>S. gemella</i> KOVANDA	okolí Konětop u Loun (1 populace)
<i>S. alnifrons</i> KOVANDA	okolí zříceniny Templštiny (1 (2) populace)
<i>S. eximia</i> KOVANDA	Český kras (13 populací)
<i>S. hardeggensis</i> KOVANDA	Podyjí (5 populací)
<i>S. querne</i> KOVANDA	Praha (2 populace)
<i>S. sudetica</i> (TAUSCH) BLUFF, NEES et SCHAUER	Krkonoše (4 populace)

### Karyologie

Základním chromozómovým číslem v podčeledi *Maloideae* je  $x = 17$ . Toto číslo je výrazně odlišné od ostatních podčeledí v čeledi *Rosaceae* – *Prunoideae* ( $x = 8$ ), *Rosoideae* ( $x = 7, 8$  vz. 9), *Spiraeoideae* ( $x = 9$ ) (Challice 1981). Názory na jeho vznik se různí mezi jednotlivými autory. Tischler (1928) přikládá vznik základního chromozómového čísla 17 tetraploidizací hypotetického předka s číslem  $x = 8$ , přičemž došlo k duplikaci jednoho páru chromozómů (tj.  $2n = 4 \times 8 + 2$ ). Gládková (1972) však nesouhlasí s názorem, že pouhá adice jednoho chromozómového páru mohla mít takové zásadní evoluční důsledky jako je vznik nové čeledi. Nebel (1929) vysvětluje  $x = 17$  aneuploidií - jako ztrátu jednoho chromosomu u pentaploida vzniklého z  $x = 7$ , čili  $2n = 35 - 1 = 34$ . Tato hypotéza však není v současné době podporovaná. Darlington a Mofett (1930) odvozují číslo  $x = 17$  od čísla 7, jejich analýzy meiosis hrušní potvrdili přítomnost 4 kvadrivalentů a 3 hexavalentů, tj. čtyři chromosomy původního genomu ( $x = 7$ ) jsou reprezentované dvojnásobně a tři chromosomy trojnásobně, čili  $x = 8$  plus  $9 = 17$ . O rok později Sax (1931) vyslovil dodnes přijímanou hypotézu, že  $x = 17$  vznikla hybridizací mezi dvěma předchůdci s  $x = 8$  a  $x = 9$ . Tito předchůdci patřily buď do podčeledi *Spiraeoideae*, nebo *Spiraeoideae* a *Rosoideae*. Šlo však o „primitivní typy“, které se současným typům těchto podčeledí sotva podobaly, přirozená hybridizace mezi nynějšími podčeleděmi není možná (Challice 1981). Z pohledu genetického jsou si všechny *Maloideae* velmi blízké, je tím tedy hypoteticky umožněna i relativně vzdálená hybridizace – jsou známé hybridy jako *Crataegomespilus* (*Crataegus* × *Mespilus*), *Sorbaronia* (*Sorbus* × *Aronia*), *Sorbopyrus* (*Sorbus* × *Pyrus*), *Crataegosorbus* (*Crataegus* × *Sorbus*) (Kovanda 1959).



Literární údaje o chromosomových počtech endemických jeřábů České republiky a předpokládaných rodičovských druzích shrnuje tabulka 2.

Tab. 2: Somatické chromosomové počty zjištěné u hybridogenních a jejich potenciálních rodičovských taxonů.

Hybridogenní taxony	2n =	Zdroj
<i>S. alnifrons</i>	68	Kovanda 1996b
<i>S. bohemica</i>	51	Jankun et Kovanda 1987
<i>S. eximia</i>	34	Jankun et Kovanda 1988
	68	Kovanda 1984
<i>S. gemella</i>	68	Kovanda 1996a
<i>S. hardeggensis</i>	68	Kovanda 1996b
<i>S. querneae</i>	68	Kovanda 1996a
<i>S. rhodantha</i>	68	Kovanda 1996a
<i>S. sudetica</i>	68	Jankun et Kovanda 1986
Rodičovské taxony		
<i>S. aucuparia</i>	34	Kutzelnigg et Silbereisen 1994
<i>S. aria</i>	34	Kutzelnigg et Silbereisen 1994
<i>S. graeca</i>	34	Warburg et Kárpáti 1968
<i>S. danubialis</i>	34	Kutzelnigg et Silbereisen 1994
<i>S. chamaemespilus</i>	34	Kutzelnigg et Silbereisen 1994
	51	Liljefors 1953
	68	Pogan et al. 1985, Liljefors 1953
<i>S. torminalis</i>	34	Kutzelnigg et Silbereisen 1994
	68	Aldasoro et al. 1998

Je patrné, že rodičovské druhy jsou udávány převážně diploidní, s výjimkou *S. chamaemespilus* a *S. torminalis*, jejichž vyšší ploidie jsou uváděny z Polska, Rakouska a Španělska (Pogan et al. 1985, Liljefors 1953, Aldasoro et al. 1998). U hybridogenních taxonů převládají polyploidie, ačkoliv i zde najdeme výjimku. Tou je na základě literárních údajů *S. eximia*, u kterého Jankun a Kovanda (1988) udávají dva cytotypy – hojnější tetraploidní, který se vyskytuje na několika lokalitách v Českém krasu a diploidní, který obývá jedinou lokalitu – krasovou planinu Koda u obce Srbsko (viz kapitola o jednotlivých druzích). Autoři dokonce tvrdí, že na lokalitě se vyskytují pouze tyto diploidní jedinci, kteří jsou mírně morfologicky odlišní od tetraploidního cytotypu. Campbell et Dickinson (1991) však uvádějí výskyt diploidních agamospermických jedinců *S. eximia* na Kodě slovy: „...vyskytuje se u některých jedinců na jediné lokalitě...“.

### Reprodukční způsoby a embryologie rodu *Sorbus*

V rámci podčeledi *Maloideae* existuje široké spektrum reprodukčních mechanismů. Tento fakt může mít vliv na evoluční úspěšnost této podčeledi (Campbell et al. 1991). Rodičovské diploidní druhy u rodu *Sorbus* se rozmnožují vesměs sexuálně, mají pravidelnou meiosis, u *S. aria* s. str. byla pozorována mírná tendence k agamospermii při vývoji

zárodečných vaků (Jankun et Kovanda 1986). U hybridogenních druhů je udávána převládající agamospermie, tj. nedochází při rozmnožování k oplození, zcela nebo částečně vymizel pohlavní proces (Kovanda 1961a). Dochází k tvorbě životaschopných semen, která vznikají bez předcházejícího splynutí gamet. Pro čeleď *Rosaceae* je charakteristické mnohobuněčné archesporium, které ztěžuje klasické studium vývoje zárodečných vaků embryologických preparátů pomocí optické mikroskopie – lze jen obtížně definovat hranici mezi buňkami archesporia a vegetativními buňkami. Zárodečný vak nemá u agamospermických rostlin redukovaný počet chromozómů, obsahuje 2C (u tetraploidů tedy tetraploidní) vaječnou buňku, která se může vyvíjet bez účasti samčí gamety. Neredukovaný gametofyt může být dvojího původu, tj. mohou nastat dvě situace: u diplosporie vzniká megagametofyt (zárodečný vak) z neredukované mateřské buňky megaspory (ve které nedochází ke kompletní meiose), zatímco u aposporie gametofyt vzniká z běžné somatické buňky sporofytu, nejčastěji z nucellu (Bicknell et Koltunow 2004). Důkazem agamospermie u většiny taxonů je ploidie megagametofytu (je neredukovaný, tj. centrální jádro zárodečného vaku a vaječná buňka jsou tetraploidní, v případě tetraploidních taxonů), přítomnost více megagametofytů ve vajíčku, polyembryonie, tvorba semen bez opylení, pylová sterilita (Campbell et al. 1991).

Reprodukčními způsoby se u tří českých hybridogenních druhů podrobně zabývali Jankun a Kovanda (1986, 1987, 1988), kteří prováděli embryologické studie u *S. sudetica*, *S. bohemica*, *S. eximia* – jde o tři druhy, u kterých jsou udávány rozdíly v ploidii (tetraploidní *S. sudetica*, triploidní – *S. bohemica*, tetraploidní i diploidní jedinci – *S. eximia*). U vajíček hybridogenních druhů rodu *Sorbus* je častá jejich degenerace, která většinou začíná z vrcholu nucellu. Jen málo vajíček pokračuje ve vývoji. Pravidlem je, že iniciální buňky zárodečného vaku se vyvíjejí z buněk situovaných v centrální části nucellu a z buněk umístěných bezprostředně pod nucellární čepičkou (tj. aposporický vývoj zárodečného vaku) (Jankun et Kovanda 1987). Iniciální buňky zárodečného vaku podstupují vakuolizaci a stávají se 1-jaderným zárodečným vakem. Po třech mitotických děleních dává 1-jaderný zárodečný vak vzniknout 8-jadernému zárodečnému vaku (přes 2-jaderný a 4-jaderný zárodečný vak). V typickém meiotickém 8-jaderném zárodečném vaku se vaječný aparát skládá z vaječné buňky a dvou synergid, které se nacházejí na mikropylárním pólu, centrální buňka obsahuje 2 polární jádra a 3 antipody jsou na chalázovém pólu. Vaječný aparát se u *S. sudetica* skládá z vaječné buňky a jedné synergidy, v centrální buňce byla tři polární jádra a na chalázovém pólu tři antipody. Obdobný vývoj zárodečného vaku je u *S. bohemica* a tetraploidního *S. eximia*. V udávaném diploidním cytotypu *S. eximia* byla sporadicky pozorována diplosporie, ale

celkově převládajícím typem vývoje zárodečného vaku je také aposporie. U všech zkoumaných hybridogenních druhů byla prokázána nutnost opylení a následně oplození sekundárního jádra zárodečného vaku, bez kterého by nedošlo k vývinu endospermu (tzv. pseudogamie, u *S. sudetica* pouze fakultativní). Již Liljeforsovy (1953) experimenty s emaskulací, izolací a samoopylováním jednotlivých květů hybridogenních jeřábů ze Skandinávie nutnost opylení pro zdárný vývin semene prokázaly. Endosperm, nutný pro výživu semene se tedy nevyvíjí autonomně, ale pseudogamicky.

Agamospermie u *S. sudetica* není obligátní, ale fakultativní. U *S. sudetica* byl pozorován autonomní vývoj embrya z vaječné buňky, která vykazovala redukovaný počet chromosomů (tzv. haploidní parthenogenesi), kombinovaný s autonomním vývojem endospermu (který je diploidní) a polyembryonií (mimo embrya, které se vyvíjí z vaječné buňky je přítomno ještě jedno, které se vyvíjí ze synergidy). Udávaná agamospermie na diploidní úrovni mohla dle Jankuna a Kovandy (1988) u *S. eximia* teoreticky vzniknout dvěma způsoby: 1. dosáhnutím schopnosti agamospermické reprodukce jako úniku ze sterility selekcí primárních hybridů, kteří zdělili tendenci k apospornímu vývoji zárodečného vaku od rodičovských druhů. 2. cestou partenogenetického vývoje vaječné buňky, která má redukovaný počet chromosomů (jako dihaploid, podobně jako u tetraploidního *S. sudetica*) (Jankun et Kovanda 1986, 1987, 1988).

Vzácně byla pozorována u *S. hardeggensis* (Kovanda 1999) a *S. sudetica* (Kociánová et Štursová 1986, Kociánová et al. 2005) vegetativní reprodukce spontánním hřížením.

### Hybridizace

Hybridizace je hlavním mikroevočním procesem v rodu *Sorbus*. Výše zmíněné podrody jsou vzájemně propojeny mnoha hybridy a hybridogenními druhy (Kovanda 1961b), avšak pozoruhodný je směr křížení. Hlavním hybatelem jsou taxony z podrodu *Aria* (např. *S. aria* s. str., *S. danubialis*, *S. graeca*) – všichni přirození hybridy a hybridogenní taxony vznikli křížením za účasti zástupce *S. aria* s. lat. Hybridy produkují čtyři z pěti podrodů (vyjma podr. *Cormus*), které však nehybridizují volně – *Sorbus* s. str., *Torminaria* a *Chamaemespilus* jsou schopny přirozené hybridizace jen s podrodem *Aria*, zatímco křížení mezi těmito podrody není možné.

Determinace, který z hybridů je primární a který je fixovaným, geneticky stabilizovaným hybridogenním druhem, je velmi složitá bez časově náročné experimentální kultivace a cytologických analýz (zvláště časově náročná je kultivace za cílem získání potomstva). Přesná znalost podmínek na lokalitě může poskytnout alespoň odhad situace. Obtížné odlišení je

způsobeno faktem, že primární hybridy a hybridogenní druhy mohou být morfologicky velmi podobné či zcela totožné (Kovanda 1961b). Určitou indicií může být zhodnocení stavu populace uvažovaného taxonu – vyskytuje-li se na lokalitě předpokládaný hybrid ve velkém počtu, jsou-li tyto exempláře morfologicky homogenní a tvoří-li plody s vyvinutými semeny, je možno považovat tento taxon za hybridogenní, ustálený (Kovanda 1961b). Na druhé straně pozorovatelná morfologická variabilita, izolovaný výskyt a sterilita indikuje primární hybridy. Rekonstrukce rodičovských kombinací je velmi složitá a absolutně nemožná bez pomoci genetiky.

Rozdělení na primární hybridní taxony a hybridogenní druhy je u rodu *Sorbus* následující (Kovanda 1999):

1. Primární kříženci ( $F_1$  hybridi) jsou většinou sterilní, výjimečně plodní. Rostou ojedinele mezi rodičovskými druhy. Jejich evoluční význam je malý, zvyšují však fenotypovou variabilitu populací. V potomstvu pak, pokud ho tvoří, dochází k segregaci.
2. Hybridogenní druhy jsou až na výjimky plodní, tvoří populace s malou variabilitou s ustálenými morfologickými znaky. Mají stabilizovaný areál, sami se šíří a jsou na rodičovských druzích zcela nezávislí díky apomiktickému rozmnožování. V jejich potomstvu nedochází k segregaci. U rodu *Sorbus* mají prvořadý mikroevoluční význam. Jsou to endemity malých, ostře ohraničených území. Oproti  $F_1$  křížencům, kteří se vyskytují pouze v přítomnosti rodičů, hybridogenní druhy mohou růst i mimo areál rodičovských druhů.

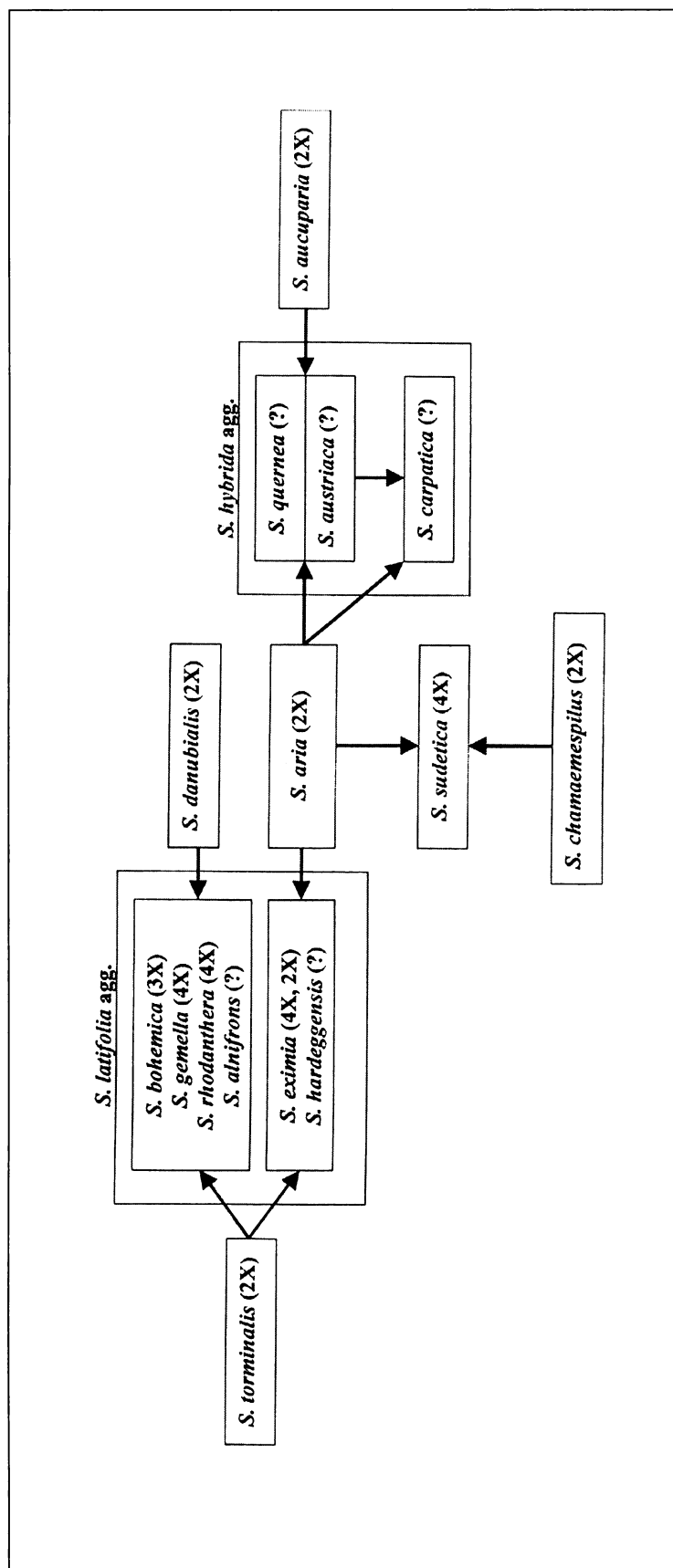
Hybridogenní druhy lze rozlišit podle rodičovské kombinace do tří odlišných agregátů (uvádění pouze zástupci z ČR):

1. *S. latifolia* agg. (*S. aria* s. l. × *S. torminalis*): Náleží sem *S. hardeggensis*, *S. bohemica*, *S. rhodantera*, *S. gemella*, *S. alnifrons*. Jde o nejčastější druhovou kombinaci nejen v ČR, ale i na Slovensku (Bernatová et Majovský 2003) a v Anglii (Nelson – Jones et al. 2002).
2. *S. hybrida* agg. (v pojetí Nelson – Jones et al. 2002 - *S. anglica* agg.) (*S. aria* s.l. × *S. aucuparia*): *S. querneae*, *S. austriaca* (Beck) Prain, *S. carpatica* Borbás. Tato kombinace je ve střední Evropě vzácnější (s výjimkou Bavorska), je bohatě zastoupena hybridogenními druhy ve Skandinávii a na Britských ostrovech.
3. *S. sudetica* agg. (*S. aria* s. l. × *S. chamaemespillus*): *S. sudetica*

První hybridogenní typy rozeznával již Linné (Kovanda 1961a), jenž popsal *Sorbus hybrida* jako křížence mezi *Crataegus aria* (= *Sorbus intermedia*) a *S. aucuparia* (Linnaeus 1753). Většina hybridogenních taxonů ČR byla popsána koncem 90. let (Kovanda 1996a, 1996b), ostatní byly odlišeny už dříve buď jako jiné taxony (*Pyrus sudetica* a *Sorbus aria* v případě *S. sudetica*, popř. *S. × franconica* v případě *S. bohemica*, Kovanda 1965, Boublík et al. 2002).

V osmdesátých letech byly publikovány tři zásadní studie zabývající se hybridogenními zástupci rodu *Sorbus* v tehdejším Československu. Šlo o karyologické a embryologické studie tří, v té době popsaných, hybridogenních druhů (Jankun et Kovanda 1986, 1987, 1988). Na sporné body těchto studií bude dále v textu upozorněno.

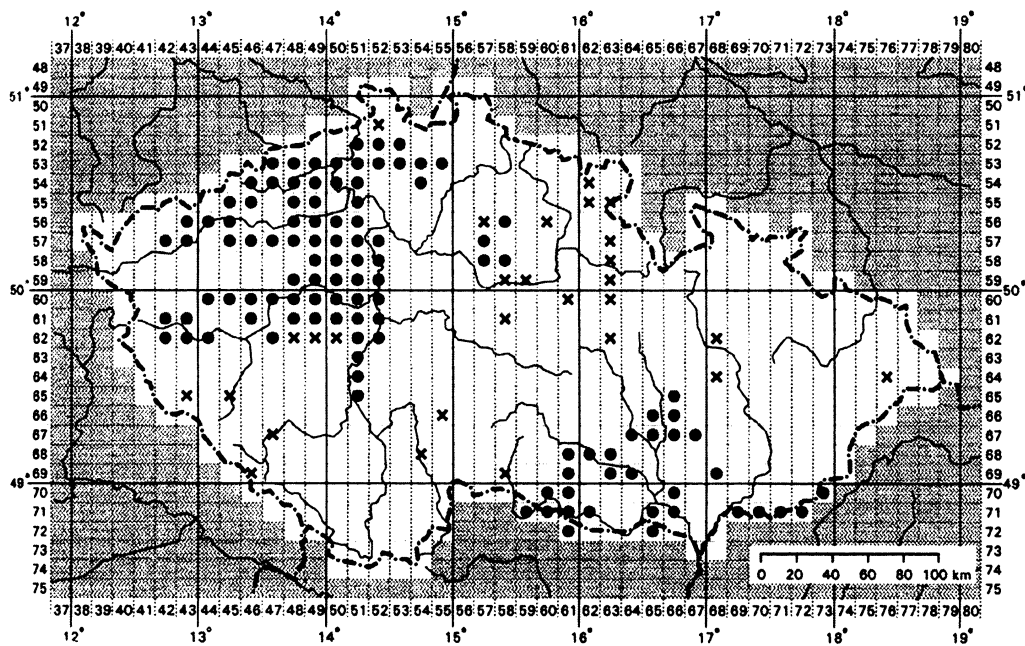
Předpokládané evoluční vztahy mezi jednotlivými hybridogenními a rodičovskými zástupci rodu *Sorbus* shrnuje obrázek 5 (s použitím informací z Kovanda 1996a, 1996b, 1999). V kontextu současných poznatků jsou však některé prezentované ploidní úrovně sporné.



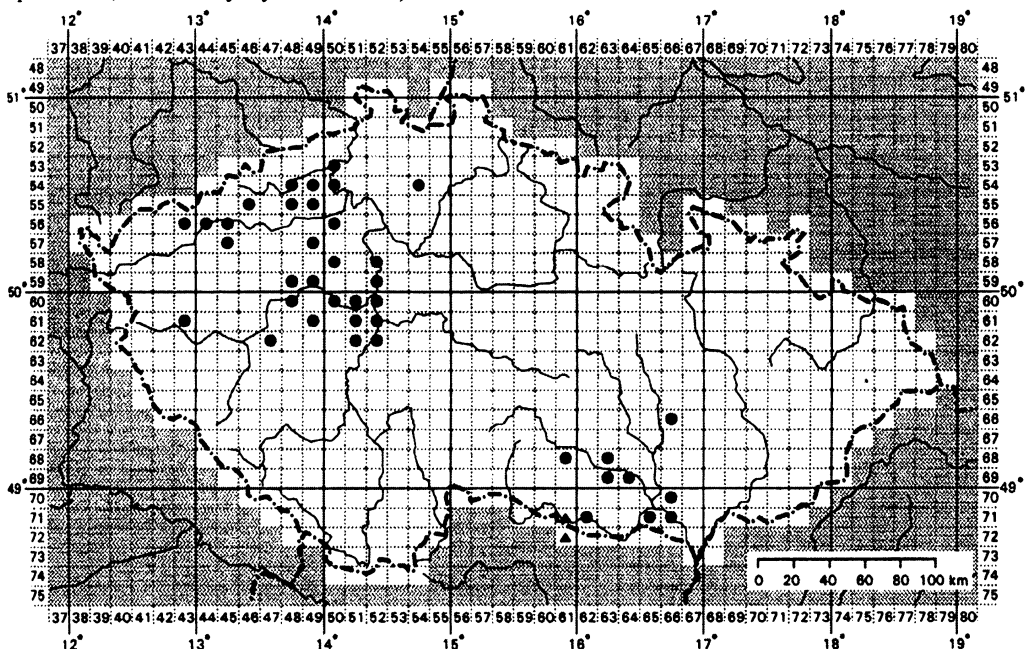
Obr. 5: Předpokládané evoluční vztahy mezi jednotlivými hybridogenními a rodičovskými zástupci rodu *Sorbus* včetně udávaných ploidních úrovní.

**Výskyt zástupců rodu *Sorbus* v ČR**

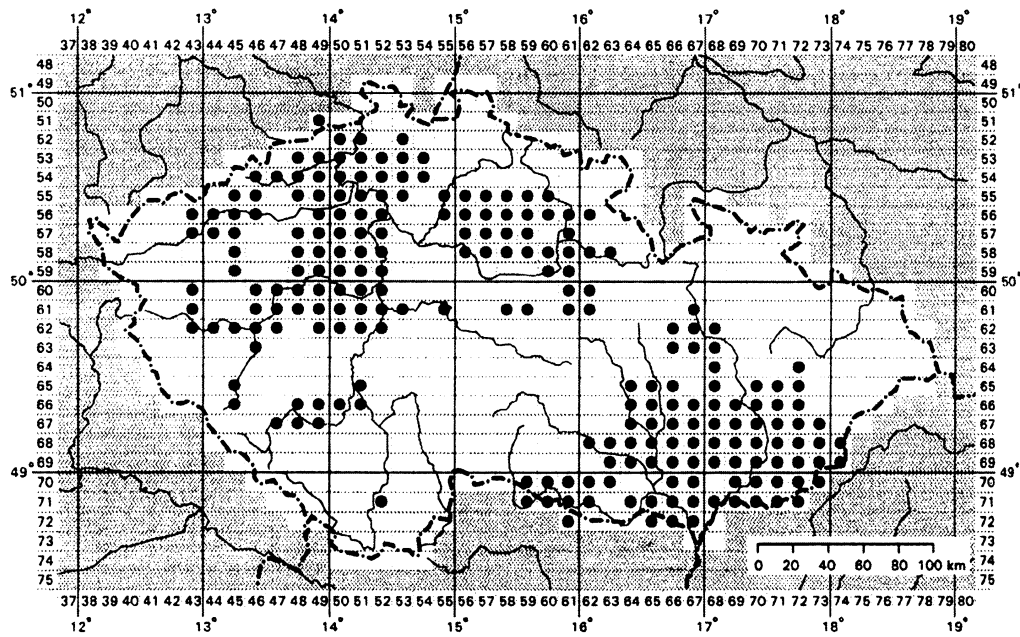
V České republice se vyskytuje celkem 17 popsanych taxonů rodu *Sorbus* (Kovanda 2002). Distribuci rodičovských druhů zachycují mapy na obrázku 6, 7 a 9 (Slavík 1998). *S. aucuparia* je běžný na celém území kromě nejteplejších částí, *S. aria*, *S. danubialis* a *S. torminalis* jsou naopak soustředěni do teplejších oblastí.



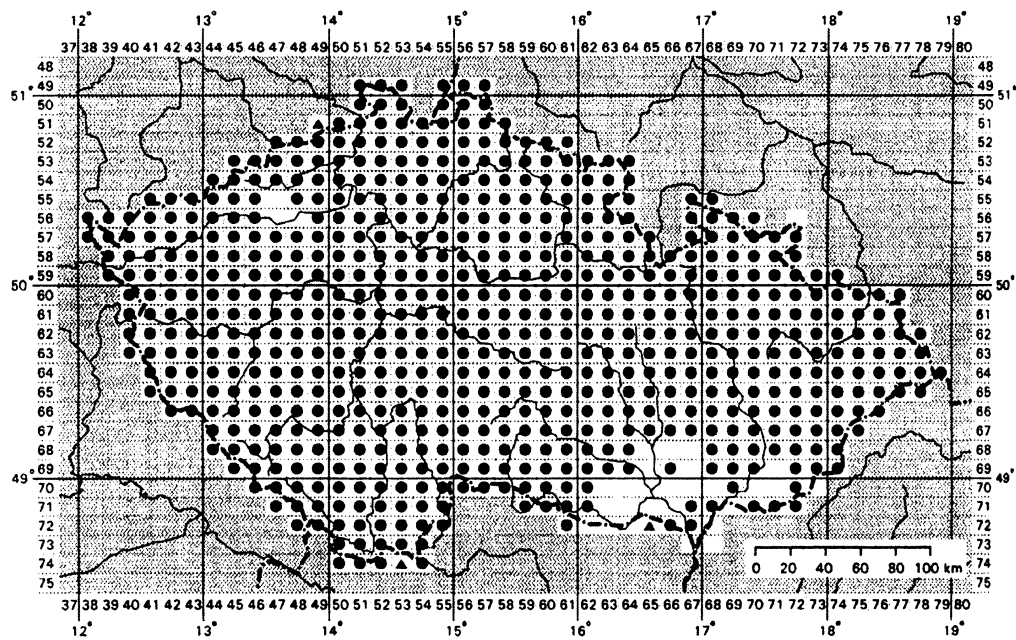
Obr. 6: Rozšíření *S. aria* v ČR. (plný bod – prezenze taxonu, výskyt dokumentován herbářovou položkou, křížek – výskyt sekundární).



Obr. 7: Rozšíření *S. danubialis* v ČR. (plný bod – prezenze taxonu, výskyt dokumentován herbářovou položkou, trojúhelník – výskyt na hranici rozšíření).



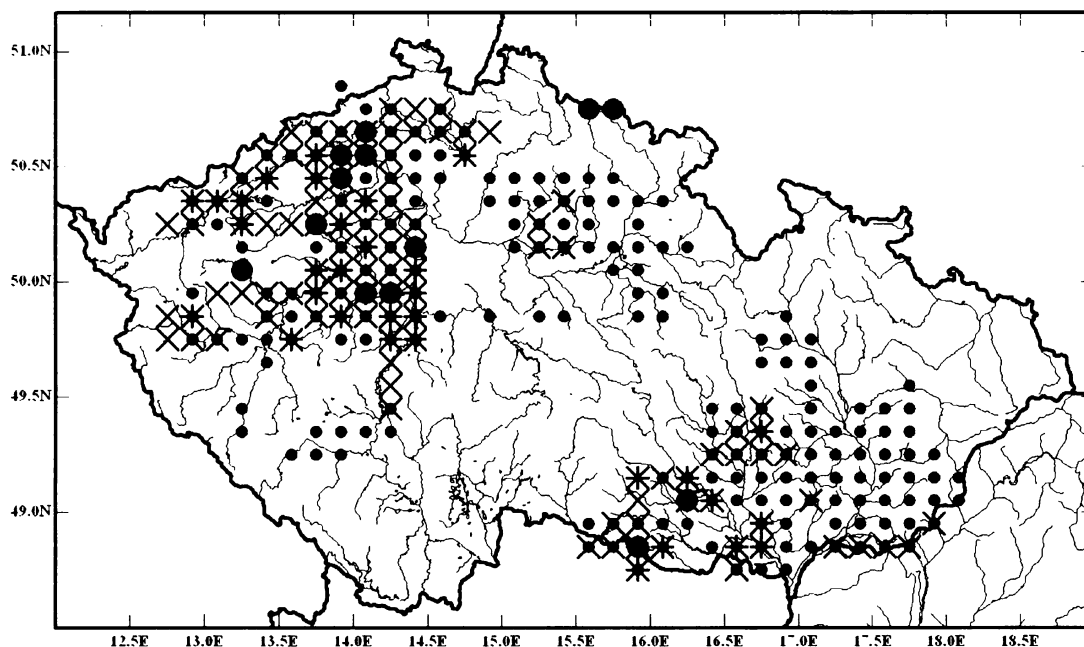
Obr. 8: Rozšíření *S. torminalis* v ČR.



Obr. 9: Rozšíření *S. aucuparia* v ČR. (plný bod – prezence taxonu, výskyt dokumentován herbářovou položkou, trojúhelník – výskyt na hranici rozšíření).

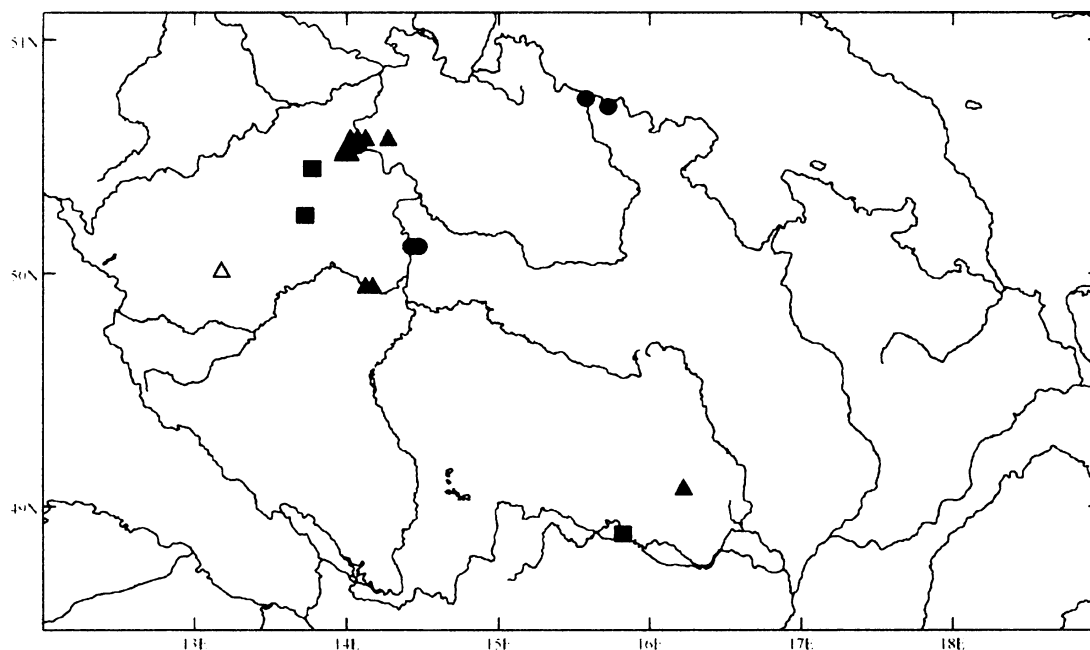


Vzhledem k výše uváděné teorii o nejčastějším výskytu hybridogenních jeřábů na hranici rozšíření rodičovských druhů byla sestavena překryvná mapa s vyznačením rodičovských a hybridogenních druhů. Její výsledek je na obrázku 10.



Obr. 10: Distribuční mapa rodu *Sorbus* v ČR: Bod plný - *S. torminalis*, křížek úhlopříčný - *S. aria*, křížek obyčejný - *S. danubialis*, kolečko velké červené – hybridogenní druhy. Převzato z Lepší et al. 2006.

Tato mapa byla vytvořena s cílem vytipování území s potenciálním výskytem hybridogenních druhů (Lepší et al. 2006), tj. území, kde je udáván sympatrický výskyt více rodičovských druhů (podkladem byly mapy Fytogeografických syntéz, Slavík 1998). Mapa rozšíření jednotlivých hybridogenních jeřábů je zachycena na obr. 11.



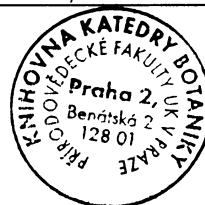
Obr. 11: Geografická distribuce hybridogenních druhů rodu *Sorbus* v ČR. Modrý bod – *S. sudetica*, modrý trojúhelník - *S. eximia*, zelený trojúhelník – *S. bohemica*, zelený bod – *S. quernea*, žlutý trojúhelník - *S. rhodanthera*, červený čtverec - *S. gemella*, zelený čtverec - *S. hardeggensis*, červený trojúhelník - *S. alnifrons*. Modrý čtverec – populace Milá, červený bod – populace Knobloška.

Seznam jednotlivých lokalit (udávaných a ověřovaných) je uveden v tabulce 3.

Tab. 3: Přehled jednotlivých lokalit endemických jeřábů v ČR. V případě Krkonoš jde o mikrolokalitu souborných lokalit Labský a Obří důl. U *S. eximia*, *S. quernea* a *S. hardeggensis* nejsou udávané počty na jednotlivých lokalitách známy. Hvězdičkou jsou označeny lokality, na kterých nebyl výskyt hybridogenních druhů ověřen. Literární zdroje: 1 = Kovanda 1999, 2 = Boulbík et al. 2002, 3 = Kociánová et Štursová 1986.

Druh	Počet uváděných jedinců	Počet nalezených jedinců	GPS souřadnice (souřadnicový systém WGS-84)
<i>Sorbus quernea</i>	Celkem 70 <sup>1</sup>		
Praha - Jabloňka		60	N 50 07 04,3 E 14 26 03,5
Praha - Bílá skála		10	N 50 06 56,6 E 14 27 23,7
<i>S. gemella</i>			
Hradiště u obce Konětopy u Loun	45 <sup>1</sup>	35	N 50 15 58,7 E 13 44 31,3
<i>S. alnifrons</i>			
Jamolice - Okolí hradu Templštyňa	45 <sup>1</sup>	35	N 49 05 23,2 E 16 14 48,5
<i>S. sudetica</i>			
Labský důl:			
Návorská jáma	15 <sup>3</sup>	10	N 50 45 52,2 E 15 32 48,7
Schustlerova zahrádka	35 <sup>3</sup>	6	N 50 45 47,9 E 15 32 56,1
Pod Ambrožovou vyhlídkou	6 <sup>3</sup>	5	N 50 45 45,4 E 15 32 42,4

Krkonoš	1 <sup>3</sup>	1	N 50 44 51,8 E 15 33 09,9
Obří důl:			
Rudná rokle	58 <sup>3</sup>	42	N 50 43 50,7 E 15 43 55,6
Čertova rokle	8 <sup>3</sup>	4	N 50 43 37,9 E 15 43 22,4
Čertova zahrádka	8 <sup>3</sup>	7	N 50 43 38,6 E 15 43 20,7
<i>S. eximia</i>	Celkem 110 <sup>1</sup>		
Plešivec		5	N 49 56 04,3 E 14 11 24,6
Koda – Ve skalách		58	N 49 56 03,3 E 14 07 16,1
Koda – les		5	N 49 56 12,4 E 14 07 01,9
Haknová		5	N 49 56 14,7 E 14 11 37,1
Doutnáč		3	N 49 57 21,9 E 14 09 12,1
Paví hora		8	N 49 57 39,8 E 14 09 45,6
Vysoká stráň		5	N 49 57 50,5 E 14 08 34,4
Boubová		3	N 49 57 13,1 E 14 08 40,2
*Králova studně		0	N 49 56 46,8 E 14 09 25,9
*Mramor u Litně		0	N 49 53 58,3 E 14 07 44,5
*Svatý Jan		0	N 49 58 13,4 E 14 08 14,1
<i>S. hardeggenensis</i>	Celkem 22, včetně Rakouska <sup>1</sup>		
Čížov - Ledové sluje		3	N 48 53 05,3 E 15 50 44,9
*Čížov - Pašerácká stezka		0	N 48 53 01,7 E 15 50 57,1
Čížov - Hardegská stráň		4	N 48 53 08,9 E 15 50 44,3
*Podmolí - Liščí skála		0	N 48 49 45,1 E 15 56 40,5
*Rakousko - Hardegg		0	N 48 51 17,6 E 15 52 39,9
<i>S. rhodanthera</i>			
Chlumská hora u Manětína	140 <sup>1</sup>	75	N 50 00 40,0 E 13 11 45,1
<i>S. bohemica</i>			
Lovoš včetně Kybičky	136 <sup>2</sup>	65	N 50 31 43,0 E 14 01 04,6
Boreč	123 <sup>2</sup>	74	N 50 30 49,8 E 13 59 14,4
Deblík	150 <sup>2</sup>	48	N 50 35 08,0 E 14 03 10,8
Debus a Kubačka	59 <sup>2</sup>	41	N 50 34 46,2 E 14 00 54,6
Opárenské údolí	145 <sup>2</sup>	48	N 50 32 27,1 E 14 01 18,3
Dubice - Výsluní	35 <sup>2</sup>	12	N 50 35 12,4 E 14 01 28,3
Porta Bohemica	15 <sup>2</sup>	2	N 50 32 55,9 E 14 02 23,9
Kubačka	3 <sup>2</sup>	1	N 50 34 18,2 E 14 00 55,1
Sebuzín –Havraní a Krkavčí skála	101 <sup>2</sup>	46	N 50 35 07,1 E 14 05 33,8
Hradiště u Hlinné	43 <sup>2</sup>	15	N 50 34 07,1 E 14 07 00,7



*Trabice – vrch Tlučeň	7 <sup>2</sup>	0	N 50 34 48,2 E 14 04 21,0
*Kamýk – Plešivec	37 <sup>2</sup>	0	N 50 33 57,3 E 14 05 27,1
*Vrch Stražiště (V. Žernoseky)	6 <sup>2</sup>	0	N 50 33 11,8 E 14 03 53,2
*Kalvárie (V. Žernoseky)	15 <sup>2</sup>	0	N 50 33 02,6 E 14 03 31,5
*Knobloška	4 <sup>2</sup>	0	N 50 33 04,2 E 14 05 33,8
Knobloška		28	N 50 33 04,2 E 14 05 33,8
Milá		14	N 50 26 03,5 E 13 45 29,8

## **Charakteristika jednotlivých druhů**

### ***S. latifolia* agg.**

#### ***Sorbus alnifrons* KOVANDA**

*S. alnifrons* obývá skalnaté a suťové svahy pod zříceninou hradu Templštiny nad řekou Jihlavou v blízkosti obce Jamolice (viz obr. 12). Vznikl hybridizací *S. danubialis* a *S. torminalis* (Kovanda 1996b), na lokalitě se tyto dva taxony vyskytují pospolu. Nejbližší výskyt dalšího potenciálního rodičovského taxonu *S. aria* je až v Podyjí (Kovanda 1999). Od dalších taxonů se stejnou rodičovskou kombinací se liší relativně menšími listy s laloky až v horní části listu, 9 - 10-ti žilkami na každé straně listu, krátkými kališními zuby, korunními lístky s nehtem a vytrvávajícím kalichem za plodu. Dle Kovandy (1996b) je tento taxon morfologicky značně uniformní. Jako jediný výrazně proměnlivý znak udává variabilitu ve srůstu čnělky, která je však běžná u všech jeřábů hybridogenního původu (Kovanda 1961b).

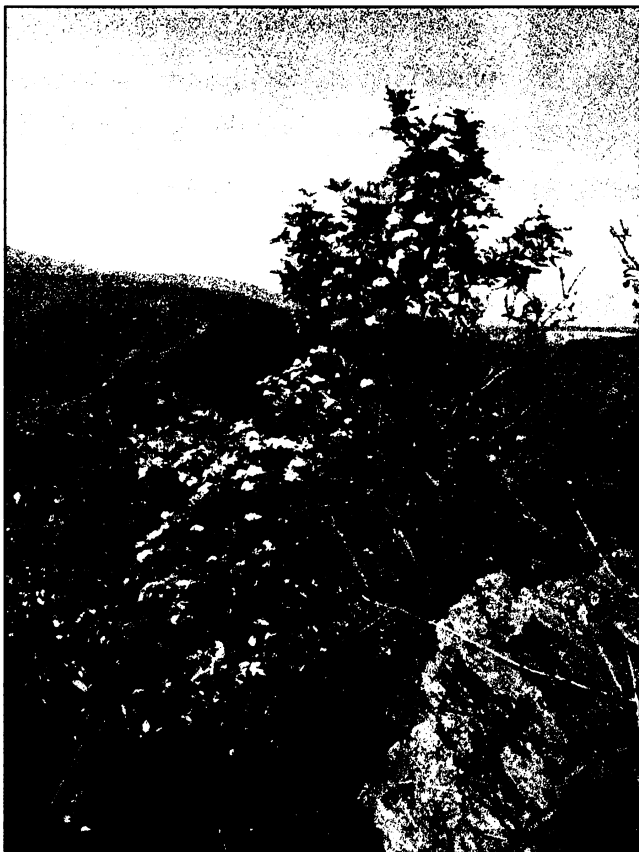


Obr. 12: *S. alnifrons* rostoucí nad kaňonem řeky Jihlavy. Jde o strmé svahy s řídkým porostem sv. *Melampyro – Carpinetum*.

Na lokalitě se vyskytuje v počtu cca 30 stromových a 5 keřových jedinců, všechny osidlují severní až severozápadní svahy - okraje suťových polí a řídký les sv. *Melampyro – Carpinetum* PASSARGE 1957.

#### ***Sorbus bohemica* KOVANDA**

*S. bohemica* je nejpočetnějším hybridogenním jeřábem v ČR. Recentně se vyskytuje na 18-ti lokalitách v oblasti Českého středohoří v celkovém počtu kolem 1000 jedinců (Boublík et al. 2002; podrobně viz tabulka 3). Kovanda (1961b) přičítá jeho vznik hybridizací *S. danubialis* a *S. torminalis*. Na základě studia flavonoidů (absence vitexinu) a



Obr. 13: Jedinci *S. bohemica* často rostou na skalních útesech, kde jim nehrozí konkurence rychleji rostoucích druhů rostlin (Lokalita Deblík).

embryogeneze, Challice a Kovanda (1978) zpřesňují vznik tohoto taxonu a přičítají ho zpětné hybridizaci  $F_1$  hybrida (*S. danubialis* × *S. torminalis*) se *S. danubialis* (Challice et Kovanda 1978, Jankun et Kovanda 1987). Morfologicky je od ostatních taxonů zřetelně odlišen menšími listy, které jsou laločnaté zvláště v horní části, navíc jsou laloky relativně mělčí než u ostatních druhů. Ekologicky je značně flexibilní, avšak optimální podmínky nachází v prosvětlených lesích (Boublík et al. 2002). Většinou ho lze nalézt na lesostepních stanovištích převážně SZ a JZ expozic (Boublík et al. 2002), oproti dříve udávané striktní fixaci na J a JZ pozice (Kovanda 1999). Roste jak v šipákových doubravách, na skalních

stepích, teplomilných keřových společenstvech, tak i v bohatých mezofilních dubohabrových a dubolipových lesích. Na některých lokalitách se může stát dokonce dominantní dřevinou, jako například na severozápadním svahu vrchu Lovoš, kde vytváří prakticky jednodruhové stejnověké porosty. Často osidluje přímo vrcholy kopců, kde netrpí konkurencí rychleji rostoucích dřevin. Jako u jediného z našich hybridogenních jeřábů skupiny *S. latifolia* byla správně udávána ploidní úroveň (triploidní; Jankun et Kovanda 1987).

### ***S. eximia* KOVANDA**

*S. eximia* je jedním z našich nejzajímavějších a nejprozkoumanějších hybridogenních jeřábů. Vyskytuje se v lesostepních společenstvech Českého krasu. Je udávaný z třinácti lokalit (Kovanda 1999; podrobnosti viz tabulka 3), recentně se však všechny nepodařilo potvrdit. Naproti tomu byly v létě 2006 nalezeny dvě nové populace v Císařské roklí u obce Srbsko, z nichž u jedné se jedná o výsadbu tohoto taxonu (J. Schlägellová, úst. sděl.). Vznikl opět pravděpodobně zpětnou hybridizací primárního hybrida *S. aria* a *S. torminalis* se *S. aria*

(zjištěno absencí vitexinu; Challice et Kovanda 1986). Jedním z nejzajímavějších fenoménů u tohoto taxonu je udávaný výskyt dvou ploidních úrovní v kontextu reprodukčních systémů (výskyt apomixie na diploidní úrovni; viz kapitola Karyologie). Populace Koda (xerothermní vápencová skalnatá stráň u obce Srbsko) se dle údajů Jankuna a Kovandy (1988) skládá pouze z diploidního cytotypu. Ostatní populace v Českém krasu udávají jako tetraploidní cytotyp. Jasně však je, že fenetické rozdělení hybridogenních jeřábů v Českém krasu na 2 typy existuje, již sám autor popisu (Kovanda 1984) uvádí v následující práci (Jankun et Kovanda 1987) minuciézní rozdíly v morfologii mezi „tetraploidním“ a „diploidním“ cytotypem, zvláště týkající se hloubky zářezu mezi laloky. Domnělá „diploidní“ populace vykazuje dle tvrzení Jankuna a Kovandy (1988) mírně menší hloubku zářezu laloků než ostatní populace v Českém krasu.

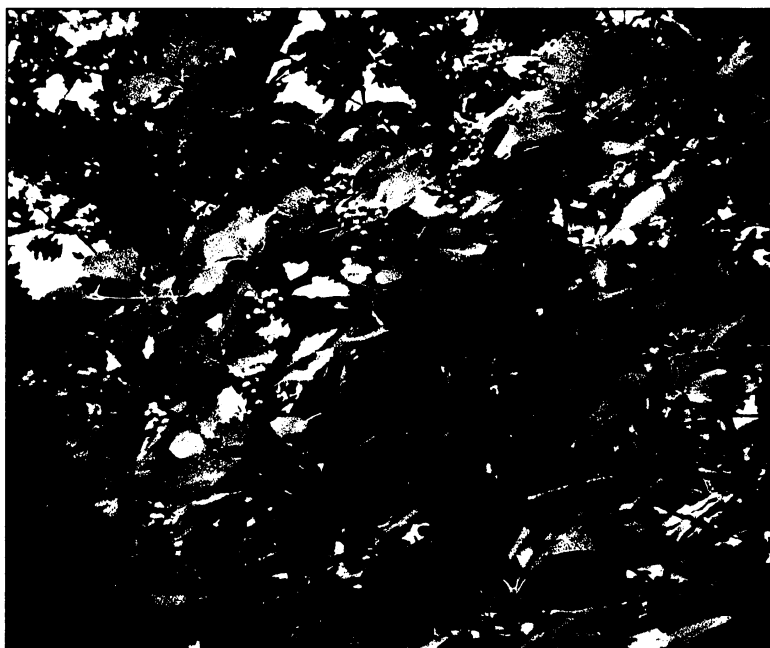


Obr. 14: Malvice endemita Českého krasu *S. eximia* v pozdním létě na lokalitě Paví hora

### ***Sorbus gemella* KOVANDA**

Také tento druh je znám pouze z jediné lokality, která se nachází u obce Konětopy v severní části Přírodního parku Džbán. Jeřáby zde rostou na jižním svahu plata se zbytky dřívějšího hradiště v ochuzených dubohabřinách s příměsí *Pinus sylvestris* L. Podkladem je opuka, která zde byla v minulosti těžena v tzv. selských lomech při okrajích hradiště. Dodnes po lomech zůstaly patrné stopy a povrch na horním okraji plata je tak výrazně rozbrázděný do několika menších roklí a proláclin. *S. gemella* bývá někdy udáván jako příklad speciace v uměle vytvořených podmínkách (Kovanda 1999), kdy vznik nového druhu měl být podmíněn narušením stanoviště v důsledku primitivní těžby. Otázkou však zůstává, nakolik je tato teorie oprávněná. Zatím se nepodařilo prokázat, zda k hybridizaci rodičovských typů

došlo až po vzniku lomů nebo již dávno před jejich vznikem. Mnoho exemplářů (vč. starších stromů) se totiž vyskytuje i na svazích, které jsou někdejší těžbou nedotčené. Nepopíratelným faktem ovšem je, že zdejší reliéf napodobuje v malém měřítku podmínky, ve kterých dochází k hybridizaci nejčastěji (Kovanda 1999), tj. např. v Podyjí nebo v Českém krasu. Morfologicky je *S. gemella* nejpodobnější *S. rhodantha*, zvláště co se tvaru listů týče, má však bledožluté prašníky a menší listy s kratšími řapíky.



Obr. 15: Plody *S. gemella* na největším jedinci lokality Konětopy u Loun.

### ***Sorbus hardeggensis* KOVANDA**

Tento druh je bezpochyby naším nejvzácnějším subendemickým jeřábem. Je udáván z tří lokalit v průlomovém údolí řeky Dyje a jejích přítoků v NP Podyjí (viz tabulka 3) a z dvou lokalitách v NP Thayatal na druhém břehu řeky Dyje v Rakousku. Vzhledem k výsledku ověřování lokalit je možné, že jedinců, případně i lokalit je v současné době méně (do deseti jedinců) než je udáván počet (20 jedinců; Kovanda 1999). Nejčastěji osidluje skalní výchozy, suťové svahy či výslunné stráně. Roste zde jak na vápenci tak na kyselých substrátech. Všechny známé populace čítají dohromady pouhých 20 jedinců (Kovanda 1996b), což může být počet nedostačující k dlouhodobému přežití druhu. Nejzávažnějším problémem jeho další existence je absence přirozeného zmlazování (Kovanda 1999) – semenáčky se na lokalitách vůbec nevyskytují. Důvodů může být několik, jako nejpravděpodobnější se jeví nedostatečná tvorba semen (malvice bývají často napadány hmyzem z čeledi stehnatkovitých (*Chalcididae*), jehož larvy vyžírají semena; Vít et Suda 2006) a jejich nízká klíčivost (Kovanda 1998). Morfologicky je *S. hardeggensis* charakterizovaný podle spodního semeníku (jako jediný z našich (sub)endemických jeřábů zdědil tento znak po *S. torminalis*), dále se vyznačuje relativně dlouhými řapíky listů a

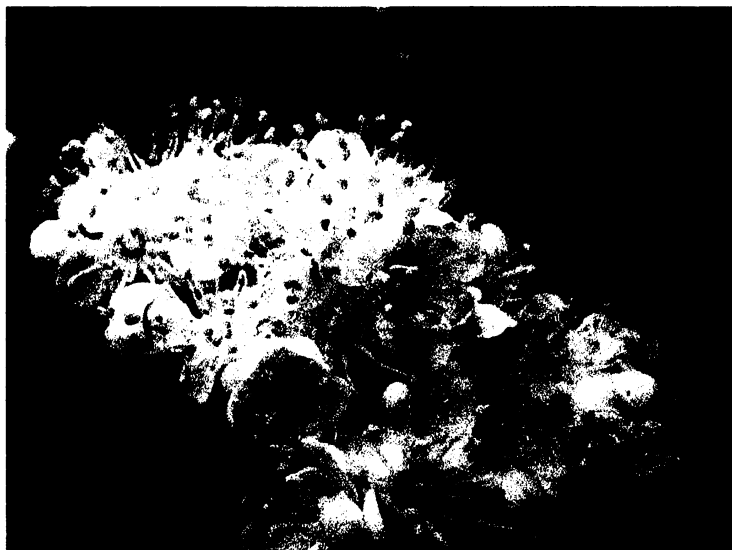


malvicemi okrově žluté až bronzové barvy. Celkově je druh morfologicky značně variabilní. Na jeho vzniku se podílely *S. torminalis* a *S. aria* (Kovanda 1996b). Vliv *S. torminalis* je u tohoto druhu zvláště nápadný vzhledem k morfologii plodů (spodní semeník, malvice žluté až oranžovo-bronzové barvy, výrazněji protažené do délky). Kovanda uvádí schopnost vegetativní reprodukce hřížením u jednoho vícekmenného



Obr. 16: Vícekmenný jedinec *S. hardeggensis*, charakterizovaný bronzově oranžovými malvicemi na platu Ledových slují.

exempláře na Ledových slujích (Kovanda 1999)



Obr. 17: Květy *S. rhodanthera*, výrazným znakem oproti ostatním hybridogenním druhům skupiny *S. hybrida* jsou růžové prašníky.

v jinak chladnější oblasti mezofytika). Celkové mikroklima lokality podtrhuje i výhřevný čedičový podklad, na kterém se tvoří zčásti zazemněné sutě (Kovanda 1999). V prosvětlených dubohabřinách (sv. *Carpinion*) zde můžeme najít více než stovku exemplářů. Na některých

### *Sorbus rhodanthera*

#### KOVANDA

*S. rhodanthera* se vyskytuje na jediné lokalitě, kterou jsou jihozápadní svahy Chlumské hory u Manětína v západních Čechách (asi 30 km severně od Plzně). Svah Chlumské hory je, na rozdíl od podobných stanovišť v okolí, výslunný a velice teplý (vytváří jakýsi teplý ostrov

místech druh dokonce dominuje (podobně jako již zmíněný *S. bohemica* na Lovoši) a tvoří stejnověký porost. Většina exemplářů je vyššího věku a je víckmenná. Za květu prakticky nelze *S. rhodanthera* zaměnit se žádným jiným naším druhem díky růžovým prašníkům. Tento znak se již vyskytuje jen u hybridogenních jeřábů s účastí *S. chamaemespilus* (v ČR např. výrazně odlišný *S. sudetica*) jako jednoho z rodičů. *S. rhodanthera* je potomek hybridizace *S. torminalis* a *S. danubialis*, druhý z nich se však na lokalitě recentně nevyskytuje.

### **Sorbus hybrida agg.**

#### ***Sorbus quernei* KOVANDA**

*S. quernei* je jediným popsáním českým hybridogenním taxonem skupiny *S. hybrida* rodičovské kombinace *S. aria* × *S. aucuparia*. Mezi ostatními endemickými jeřáby ČR je tak dobře poznatelný díky zaoblenému tvaru laloků listů (viz obrázek 18). Tento znak sdílí již jen s pěstovaným *S. intermedia* (EHRH.) PERS.

Druh přežívá na dvou lokalitách přímo v Praze – na SZ svahu vrchu Jabloňka



Obr. 18: Výrazně zaoblené laloky listů jsou hlavním znakem odlišujícím skupinu *S. hybrida* od *S. latifolia*. Na obrázku je jedinec *S. quernei* na lokalitě Bílá skála.

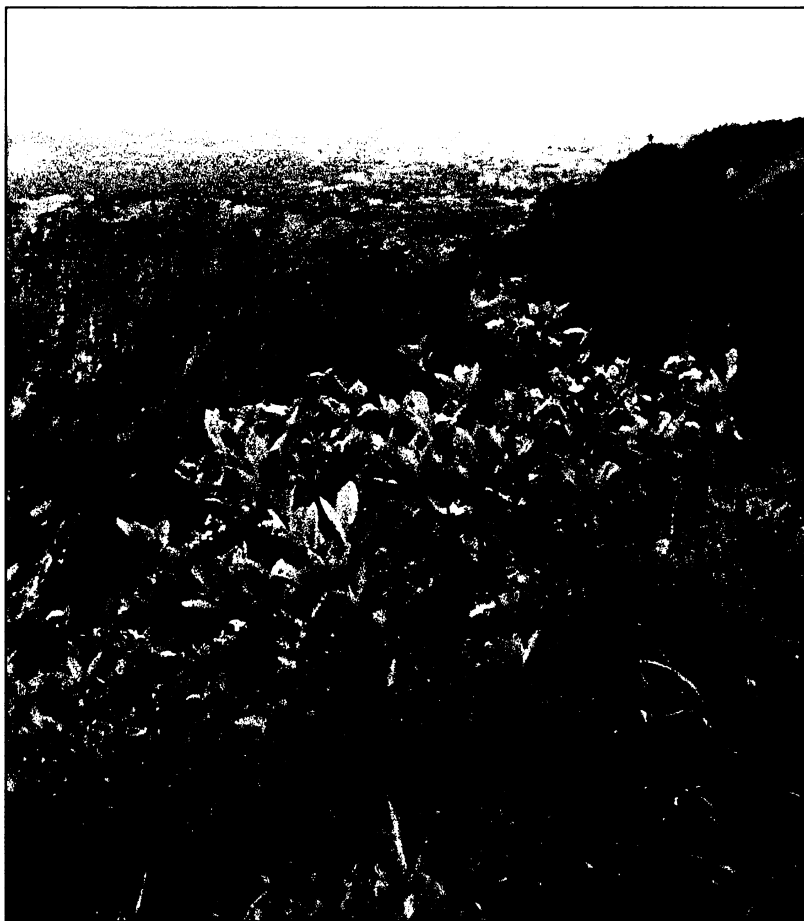
a na Bílé skále (podrobnosti viz tabulka 3). Populace *S. quernei* ohrožuje parazitický hmyz (zvláště z čeledí píďalkovitých – *Geometridae* a můrovitých – *Noctuidae*), který požírá listy i květy a nezřídka zimuje v plodech, čímž znemožňuje úspěšnou reprodukci druhu. Při sběru malvic v letech 2004 a 2005 se například ukázalo, že pouze 10 z celkového počtu cca 200 studovaných plodů obsahovalo relativně dobře vyvinuté semeno. I přes uvedený handicap se však na lokalitě Jabloňka nachází vitální populace s mnoha semenáči (Vít et Suda 2006). Lze tedy předpokládat, že existují výrazné sezónní výkyvy v napadení parazitickým hmyzem umožňující úspěšnou reprodukci druhu. Neshody panují ohledně původnosti *S. quernei* na

našem území. Kovanda považuje *S. querneva* za původní, naopak D. Turoňová (úst. sděl.) ho považuje za zplaněnou výsadbu prováděnou v minulosti na vrchu Jabloňka (v blízkosti bývala pomologická zahrada a klasicistní zámek). Na Bílou skálu se údajně dostal endozoochorií ptáky. Faktem je, že na Jabloňce se recentně vyskytuje pouze *S. aucuparia* (a to pouze ve formě mladých stromků a semenáčů!) a *S. aria* se vyskytuje nejbliže právě na Bílé skále.

**Sorbus sudetica agg.**

***Sorbus sudetica* (TAUSCH) BLUFF, NEES et SCHAUER**

*S. sudetica* je první popsáný endemický jeřáb české květeny, který byl odlišen již roku 1834 (pod jménem hrušeň sudetská – *Pyrus sudetica*) profesorem pražské Karlo-Ferdinandovy Univerzity J. F. Tauschem. Zprvu byl objeven jen jako sterilní keřík v krkonošských karech (Tausch 1834), teprve později byl nalezen i kvetoucí. Jeho vznik je odhadován na dobu před více než deseti tisíci lety, kdy došlo k hybridizaci rodičovských druhů – keře středních poloh *S. aria* a horského *S. chamaemespilus*. Předpokládá se, že kdysi izolované areály rodičovských typů se v té době v důsledku klimatických změn setkaly a mohlo tak dojít k hybridizaci.



Obr. 19: Kvetoucí keř *S. sudetica* na okraji Schustlerovy zahrádky v Labském dole.

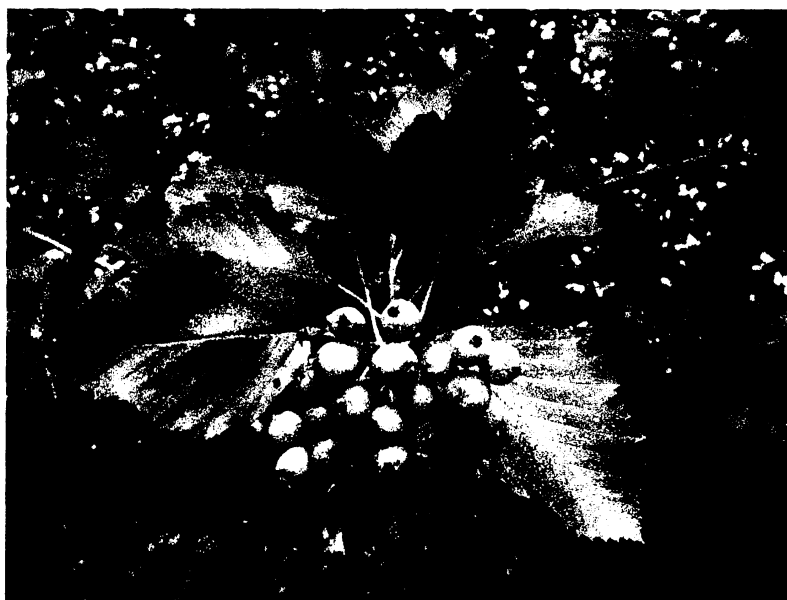
Později sice rodičovské druhy vlivem dalších změn z Krkonoš opět ustoupily, jejich někdejší výskyt však připomíná přibližně 150 exemplářů *S. sudetica*, které se dosud zachovaly na několika lokalitách (viz tabulka 3). Těžiště výskytu leží v karech Obřího a Labského dolu (kde roste celkem na 7 mikrolokalitách), druh často roste přímo na lavinových svazích, mnohdy ve floristicky

bohatých „zahrádkách“ – např. Schustlerově či Čertově. Jde o keře vysoké do 2 metrů, nejmenší exempláře však dosahují sotva 20 centimetrů. Základní determinační znaky jsou krátce řapíkaté, obvejčité, na okrajích mírně pilovité listy. V závislosti na prostředí, ve kterém roste, může nabývat různých růstových forem – vedle obvyklých vzpřímených keřových typů jsou známy například poléhavé formy (převažující na lavinových drahách) nebo zvláštní plazivé zástinové formy vyskytující se na lokalitách se zástínem smrku. Kociánová a Štursová (1986, 2005) dokládají schopnost vegetativního množení hřížením. Tento jev se vyskytuje na prudkých svazích krkonošských karů – lavinových drahách.

V posledních letech byly nalezeny dvě populace jeřábů neznámého původu (M. Lepší, P. Lepší et K. Boublík, úst. sděl.), které byly ve spolupráci s nálezci podrobeni dalšímu studiu. Obě populace se nacházejí v Lounsko - Labském středohoří.

### Knobloška

Populace se nachází na SZ stráni se společenstvy bílých strání v blízkosti obce Kamýk. Dříve byly jeřáby, vyskytující se na této lokalitě udávány jako *S. bohemica* (Boublík et al. 2002), avšak od tohoto taxonu se liší výrazně mělčími laloky listů a většími plody. Původ



tohoto druhu je přisuzován Obr. 20: Populace Knobloška se vyznačuje mělce laločnatými listy.

(M. Lepší et al., úst. sděl.) zpětné hybridizaci *S. bohemica* se *S. danubialis*.

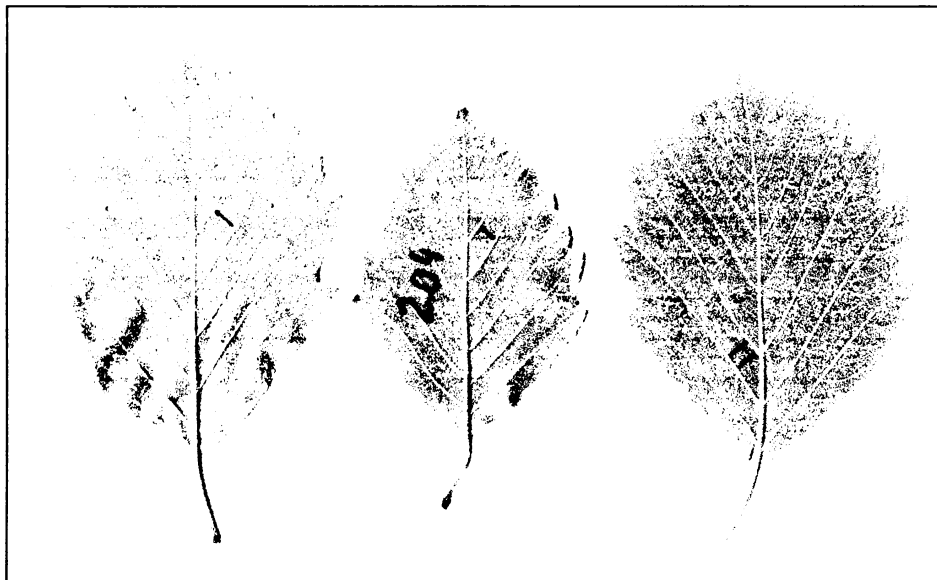


Obr. 21: Jedinci v populaci na vrchu Milá jsou velmi podobní *S. rhodanthera* a *S. gemella*.

### Milá

Populace se nachází na jižních a jihozápadních svazích čedičového vrchu Milá u stejnojmenné obce. Populace je celkově homogenní, fenotypově jsou jedinci velmi podobní *S. rhodanthera* nebo *S. gemella*. Se *S. rhodanthera* sdílí někteří jedinci barvu prašníků – jsou růžové, čili je možné uvažovat potenciální dálkový přenos diaspor z Chlumské hory u Manětína, popřípadě z vrchu

Hradiště u Konětop. Od *S. bohemica* lze tuto populaci odlišit tvarem laloků (vyskytují se zde laloky výrazně protažené v špičku) a většími malvicemi. Srovnání listů populací Milá, Knobloška a druhu *S. bohemica* ilustruje obrázek 22.



Obr. 22: Srovnání listů populací Milá (vlevo), Knobloška (uprostřed) a *S. bohemica* (vpravo). Populace Milá je oproti *S. bohemica* charakterizována laloky protaženými v špičku a populace Knobloška mělkými zářezy mezi laloky listů.

## **Cytometrie a karyologie**

### **Metodika**

Ke stanovení DNA ploidního stupně (Suda et al. 2006), velikosti genomu a reprodukčních způsobů byla použita metoda průtokové cytometrie, která využívá měření optických vlastností (v našem případě fluorescence) jader buněk. Fluorescenčně obarvená jádra, která jsou vyizolována z buněk, jsou unášena velkou rychlostí v kapalině přes optickou komůrku, ve které dojde k jejich osvětlení paprskem světla (UV lampa, laser) o určité vlnové délce. Signál emitovaný ozářenými jádry je veden přes soubor filtrů a snímán fotodetektorem. Fotodetektor převede optický signál na elektrický impuls, který je dále převeden z analogové do digitální podoby a počítačově zpracován. Oproti klasickým karyologickým metodám přináší cytometrie mnoho výhod, mezi něž patří zvláště (Doležel 1997): časová nenáročnost přípravy vzorků - možnost analyzovat velké množství vzorků během jediného dne, přesnost (detekce minuciózních rozdílů ve velikosti genomu), nedestruktivnost metody (odběrem se rostlina ani populace nezahubí, lze pracovat s velikostí pletiv v řádu cm<sup>2</sup>), metoda nevyžaduje mitoticky aktivní buňky, snadné odhalení směsných vzorků, nízké finanční náklady na analýzy. K hlavním nevýhodám průtokové cytometrie patří zvláště potřeba čerstvého materiálu (čím déle se materiál skladuje, tím horší analýzy poskytuje) a neuspokojivé výsledky analýz rostlin s vysokým obsahem sekundárních metabolitů (např. čeleď *Rosaceae*). Jako interní standard byly použity listy sedmikrásky obecné (*Bellis perennis* L.), která má cca 2,5 krát větší velikost genomu ( $2C = 3,405$  pg) než diploidní rodičovské druhy hybridogenních jeřábů, nedocházelo tedy k překryvům standardu s polyploidními taxony a zároveň byla zajištěna linearita měření (velikost standardu a analyzovaných vzorků nebyla výrazně odchylná). Výstupem analýz jsou histogramy, kde na ose x jsou zaznamenávány fluorescence jader na jednotlivých kanálech a na ose y počet těchto jader. Cytometrické studium rodu *Sorbus* je vzhledem k vysokému obsahu sekundárních metabolitů v pletivech (taninů) značně obtížné, souborem modifikací (viz dále) se však podařilo optimalizovat metodiku a získat kvalitní analýzy.

### **DNA ploidie**

Jako nejvhodnější pletiva poskytující po izolaci neporušená jádra se ukázaly být řapíky mladých listů a vnější buňky exokarpu mladých malvic. Ačkoliv jde o pletiva s vyšší pravděpodobností výskytu endopolyploidizace, nebyla u analyzovaných vzorků zaznamenána. Před vlastním zahájením výzkumu byla tato možnost testována na souboru různých pletiv

(exokarp plodů, řapíky, pletivo čepele listů, kališní lístky) a relativně velkém vzorku (cca 100 měření). Žádné odchylky ve stupni ploidie mezi různými pletivy téhož jedince však nebyly zaznamenány. Oproti běžně používanému pletivu čepele listů vykazovaly řapíky a exokarp plodů výrazně kvalitnější výstupy analýz (nižší CV – koeficient variance, nižší výskyt rušivého pozadí v analýze) a byly tedy vybrány jako pletiva vhodná k analýzám. Buněčná jádra byla izolována následovně dle standardní metodiky používané v laboratoři průtokové cytometrie (BÚ AVČR Průhonice; Suda 2004): 1-2 řapíky, popřípadě cca 1 cm<sup>2</sup> pletiva z vnější vrstvy buněk malvice (objem pletiva vzorku bylo nutno korigovat vzhledem k množství pletiva standardu s cílem dosáhnout přibližně stejné výšky píků), byly rozsekány žiletkou spolu s interním standardem v pufru Otto I (0,1 M monohydrát kyseliny citrónové, 0,5% Tween 20; Otto 1990). Vzorek byl po přefiltrování (přes 42 μm nylonový filtr) centrifugován ve stolní centrifuze (Hettich) při 150 g po dobu 5 minut. Po odstranění supernatantu bylo přidáno 100 μl čerstvého pufru Otto I. Barvicí roztok se skládal z 1 ml pufru Otto II (0,4M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ·12H<sub>2</sub>O; Otto 1990) doplněného fluorescenčním barvivem DAPI (4 μg/μl; Sigma) a antioxidantem β-mercaptoethanolem (2 μl/ml; Sigma). Analýzy vzorků probíhaly na průtokovém cytometru Partec PA II s rtuťovou UV výbojkou jako zdrojem excitace fluorochromů.

### **Absolutní velikost genomu**

Ke stanovení absolutní velikosti genomu (v pikogramech – pg) bylo použito stejných pletiv a analogického postupu s několika modifikacemi. Jako fluorescenční barvivo byl použit roztok propidium jodidu (1 ml Otto II pufr, propidium jodid (50μg/μl; Sigma), RNáza IIA (50μg/μl; Sigma) a β-mercaptoethanol (2 μl/ml; Sigma)), vzorky se po centrifugaci před analyzováním ponechaly inkubovat 5-15 minut při pokojové teplotě. Samotná analýza byla provedena na průtokovém cytometru Partec CyFlow se zeleným laserem jako excitačním zdrojem. K zajištění větší věrohodnosti byla všechna měření prováděna minimálně ve třech různých dnech na minimálně třech jedincích. Výsledky s rozdílem větším než 2% od průměru jedince byly vyřazeny a měření opakována v jiný den.

### **Stanovení reprodukčního způsobu**

Jedním z nejnovějších metodických přístupů v průtokové cytometrii je determinace reprodukčních způsobů. Principem této metody je sledování poměru ploidie embrya a endospermu v semenech (Matzk et al. 2000). Za sexuálně vzniklé semeno u diploidního



jedinice je považováno semeno s poměrem embryo : endosperm 2C : 3C, za apomiktické (s autonomně vzniklým endospermem) s poměrem 2C : 4C a za apomiktické (s pseudogamicky vzniklým endospermem) 2C : 5C. Modifikace vzhledem k účasti redukovaných / neredukovaných gamet jsou možné (Matzk et al. 2000).

Dobře vyvinutá semena (3 x 5 kusů z každého druhu) byla rozsekána žiletkou v 1 ml modifikovaného Tris.MgCl<sub>2</sub> pufru (Matzk 2001) s fluorochromem DAPI (4 µg/µl; Sigma). Po filtraci přes 42 µm nylonový filtr byl vzorek ihned změřen na průtokovém cytometru Partec PA II se rtuťovou UV výbojkou jako zdrojem excitace.

### **Karyologické analýzy**

Pro standardizaci cytometrických měření byla použita metoda počítání chromozómů pod světelným mikroskopem. Pro přípravu mikroskopických preparátů byly použity kořenové špičky naklíčené ze semen sebraných na podzim 2005 a mladé pupeny sebrané během dubna 2006. U roztlakových preparátů byla použita standardní metoda barvení meristému kořenových špiček a vzrostných vrcholů pupenů acetokarmínem (Krahulcová 1998) – předpůsobení 8-hydroxychinolinem (0,002 M roztok) po dobu 3 hodin při pokojové teplotě, fixace v roztoku ethanolu (96%) a ledové kyselině octové (3:1) přes noc 4 °C a macerace v roztoku HCl a ethanolu (96%) 1:1 po dobu 3 minut při pokojové teplotě. Preparáty byly počítány na mikroskopu Olympus BX-61 při 1000 násobném zvětšení s použitím imerze.

### **Zpracování cytometrických dat**

Výstupem z cytometrických analýz byly histogramy zachycující na ose x fluorescenci jader a na ose y jejich počet. Do následného zpracování dat týkajících se velikosti genomu byly zahrnuty pouze kvalitní analýzy, tj. analýzy se symetrickými píky, se srovnatelnou výškou vzorku a standardu a hlavně s nízkým CV (koeficientem variance).

Rozdíly ve velikosti genomu jednotlivých taxonů byly otestovány procedurou GLM (SAS 8e), jako hranice rozdílnosti byla zvolena  $\alpha = 5\%$ . Procedura GLM (General linear model) je modifikovaná analýza rozptylu (ANOVA), která je robustní k nestejným velikostem jednotlivých skupin, porovnává průměry a rozptyl.

Veškeré výstupy z analýz jsou k dispozici na příloženém CDROMu a na internetové stránce <http://botany.natur.cuni.cz/suda/sorbus/>.

## Výsledky cytometrie a karyologie

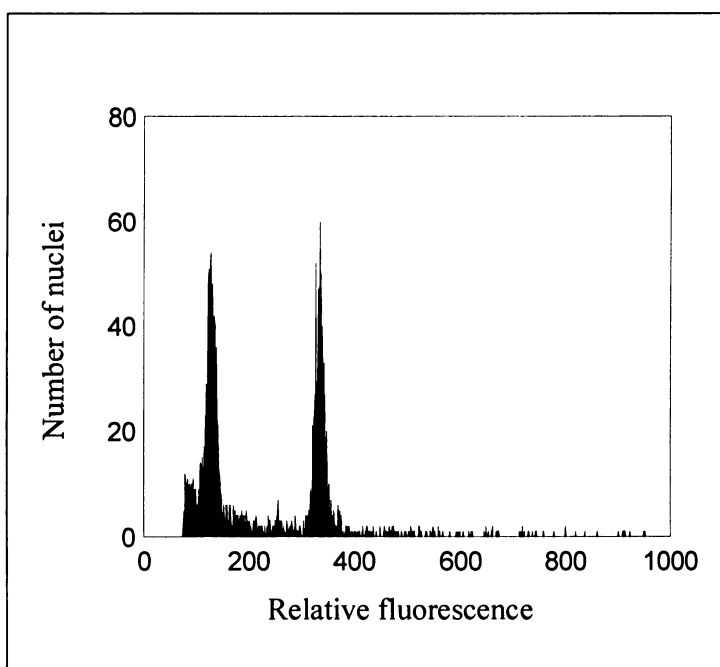
### DNA ploidie a ploidy

V roce 2004 a 2005 byl proveden základní screening všech populací hybridogenních jeřábů vyskytujících se na území ČR. Nebyla nalezena žádná vnitrodruhová variabilita na úrovni DNA ploidie. Výsledky shrnuje tabulka 4. Ilustrativní histogramy pro každou DNA ploidií udávají obrázky 23, 24 a 25.

Tab. 4: DNA ploidie zjištěná u druhů *Sorbus*. Relativní fluorescence jader izolovaných z listových pletiv je vztažena k internímu standardu *Bellis perennis* (2C = 3,405 pg), jehož fluorescence byla považována za jednotkovou.

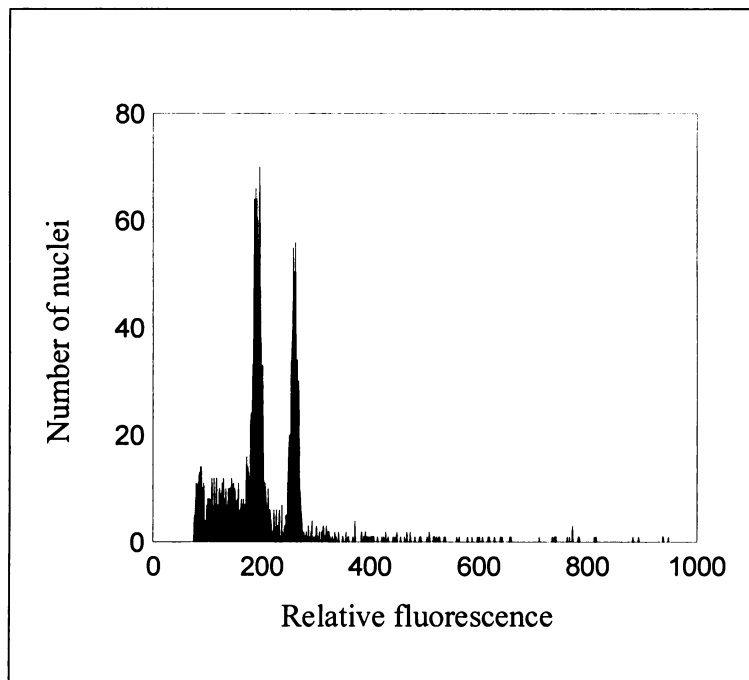
Druh	Počet analyzovaných jedinců	DNA ploidní úroveň naměřená	Ploidní úroveň udávaná	Poměr ke standardu (průměr)	S.D.	CV vzorku (rozsah)
<i>S. alnifrons</i>	31	3 x	?	0,575	0,006	3.34-5.91
<i>S. bohemica</i>	236	3 x	3 x	0,577	0,006	4.86-5.97
<i>S. eximia</i>	76	3 x	4 x, 2 x	0,563	0,008	4.84-5.93
<i>S. gemella</i>	32	3 x	4 x	0,576	0,002	4.87-5.73
<i>S. hardeggensis</i>	7	2 x	?	0,388	0,001	4.07-5.96
<i>S. querneae</i>	69	4 x	?	0,743	0,007	3.86-5.56
<i>S. rhodantha</i>	64	3 x	4 x	0,579	0,003	4.60-5.72
<i>S. sudetica</i>	54	4 x	4 x	0,749	0,006	4.53-5.22
<i>S. aria</i>	27	4 x	2 x	0,743	0,005	3.86-5.45
<i>S. aria</i>	2	2 x	2 x	0,395	0,004	3.72-4.97
<i>S. aucuparia</i>	12	2 x	2 x	0,380	0,003	5.02-5.98
<i>S. danubialis</i>	21	4 x	2 x	0,748	0,006	4.08-5.42
<i>S. torminalis</i>	23	2 x	2 x	0,402	0,009	4.49-5.24

Vzhledem k tomu, že naměřené údaje se u jednotlivých druhů značně lišily od údajů literárních (zvláště u hybridogenních druhů *S. eximia* a *S. gemella*; viz též tabulka 5), bylo od každého druhu několik jedinců podrobeno karyologické analýze s cílem zjistit skutečný počet chromozomů daného jedince. Metodou pozorování roztlakových preparátů pod optickým mikroskopem bylo dosaženo následujících

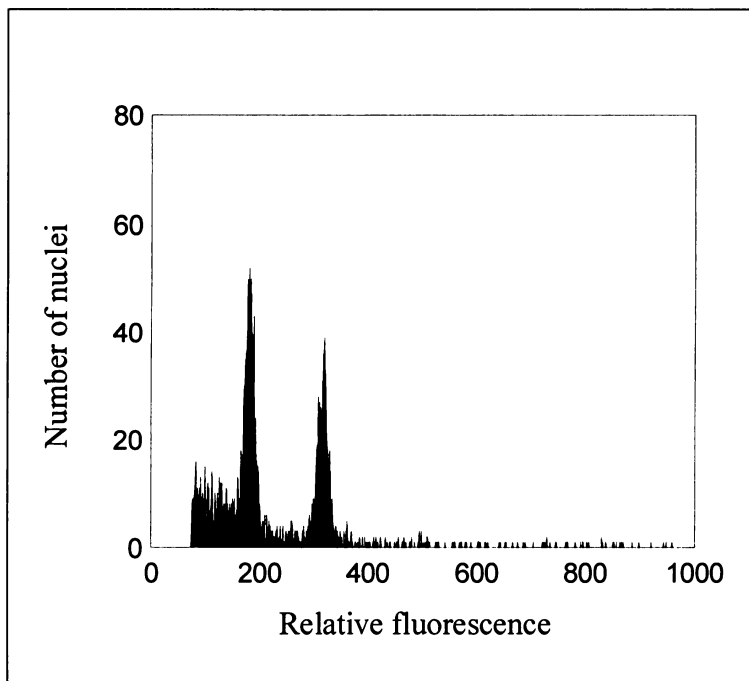


Obr. 23: Grafický výstup z průtokového cytometru diploidního *S. hardeggensis*. Pík vzorku je v 0,386 násobku standardu. CV *Bellis* (druhý pík) = 2,29, CV vzorku (první pík) = 4,89.

výsledků (viz tabulka 5). S ohledem na malou velikost chromozómů čeledi *Rosaceae* a jejich vysoké počty byla většina analýz provedena RNDr. V. Jarolímovou (BÚ Průhonice).



Obr. 24: Grafický výstup z průtokového cytometru tetraploidního *S. querna*. Pík vzorku je v 0,735 násobku standardu. CV *Bellis* (druhý pík) = 2,4, CV vzorku (první pík) = 4,01.



Obr. 25: Grafický výstup z průtokového cytometru triploidního *S. alnifrons*. Pík vzorku je v 0,571 násobku standardu. CV *Bellis* (druhý pík) = 2,2, CV vzorku (první pík) = 3,34.

Všechny hybridogenní druhy rodičovské kombinace *S. aria* s. lat × *S. torminalis* jsou triploidní (kromě *S. hardeggensis*), zbylé dva druhy (*S. querneae* a *S. sudetica*) jsou tetraploidní. DNA ploidie byla u *S. hardeggensis* detekována jako diploidní. Bohužel se prozatím nepodařilo tento zajímavý údaj ověřit karyologicky. Pozoruhodná je též DNA ploidie zjištěná u dvou rodičovských druhů – tetraploidi u *S. aria* a *S. danubialis*. Tyto cytotypy jsou v literatuře velmi vzácně udávány (tetraploidní *S. aria* ve Španělsku; Aldasoro et al. 1998) a zaslouží si podrobnější výzkum. Byly proto také zahrnuty do karyologických analýz (viz níže) a jejich ploidie ověřena i stanovením počtu chromozómů.

Tab. 5: Chromozómové počty u vybraných zástupců jeřábů (Zdroje literárních údajů: 1 = Jankun et Kovanda 1987, 2 = Jankun et Kovanda 1988, 3 = Kovanda 1996a, 4 = Kutzelnigg et Silbereisen 1994, 5 = Jankun et Kovanda 1986). Všechny vzorky mimo *S. sudetica* byly počítány RNDr. V. Jarolímovou (BÚ Průhonice) z vzrostných vrcholů pupenů. *S. sudetica* počítal P. Vít z kořenových špiček.

Druh	Spočtené 2n	Poznámka	Ploidie	Označ.	Lokalita	Předp. 2n	Autor
<i>S. bohemica</i>	ca 51	ploidie jistá	3x	B15	Lovoš	51	1
<i>S. bohemica</i>	51		3x	B84	Lovoš	51	1
<i>S. bohemica</i>	51	jednoznačný	3x	B17	Lovoš	51	1
<i>S. bohemica</i>	49-52		3x	B7	Boreč	51	1
<i>S. bohemica</i>	ca 51	ploidie jistá	3x	B56	Boreč	51	1
<i>S. bohemica</i>	51	jednoznačný	3x	B2	Boreč	51	1
<i>S. eximia</i>	51	jednoznačný	3x	E95	Koda	34	2
<i>S. eximia</i>	50		3x	E93	Koda	34	2
<i>S. eximia</i>	(49)-51	ploidie jistá	3x	E53	Koda	34	2
<i>S. eximia</i>	51	jednoznačný	3x	E77	Doutnáč	68	2
<i>S. eximia</i>	47-52	ploidie jistá	3x	E115	Haknová	68	2
<i>S. eximia</i>	51		3x	E116	Haknová	68	2
<i>S. gemella</i>	51	jednoznačný	3x	G41	Konětopy	68	3
<i>S. gemella</i>	51	jednoznačný	3x	G31	Konětopy	68	3
<i>S. gemella</i>	51	jednoznačný	3x	G311	Konětopy	68	3
<i>S. querneae</i>	68	jednoznačný	4x	Q7	Jabloňka	?	-
<i>S. querneae</i>	58+-2	ploidie jistá	4x	Q101	Jabloňka	?	-
<i>S. aria</i>	68	jednoznačný	4x	Ar6	Koda	34	4
<i>S. aria</i>	68	jednoznačný	4x	Ar E29	Haknová	34	4
<i>S. danubialis</i>	68	jednoznačný	4x	DLo1	Lovoš	34	4
<i>S. danubialis</i>	68	jednoznačný	4x	DBo1	Boreč	34	4
<i>S. torminalis</i>	34	jednoznačný	2x	TKo1	Konětopy	34	4
<i>S. sudetica</i>	ca 68	ploidie jistá	4x	S518	Rudná rokle	68	5

## Velikost genomu

Naměřené velikosti genomu (C a Cx hodnoty) udává tabulka 6. Z hodnot je zřejmé, že velikosti genomu přepočtené na haploidní genom (1Cx) se mezi druhy liší jen nevýrazně (< 6%), avšak vybrané dvojice taxonů vykazují statisticky významné rozdíly (viz tabulka 7). Všechny naměřené hodnoty jsou součástí elektronické přílohy I.

Nalezená vnitrodruhová

Tab. 6: Absolutní velikosti genomu v pikogramech. 2C = obsah DNA somatických buněk (ploidie se nebere v potaz), 1Cx = obsah DNA haploidního genomu (Greilhuber et al. 2005), S.D. = směrodatná odchylka.

Druh	Průměrné 2C (pg)	S. D.	Průměrné 1Cx	S. D.
<i>S. alnifrons</i>	2,15	0,01	0,72	0,01
<i>S. bohemica</i>	2,06	0,03	0,69	0,01
<i>S. eximia</i>	2,12	0,02	0,71	0,01
<i>S. gemella</i>	2,08	0,03	0,69	0,01
<i>S. hardeggensis</i>	1,42	0,02	0,71	0,01
<i>S. quernea</i>	2,76	0,03	0,69	0,01
<i>S. rhodanthera</i>	2,10	0,01	0,70	0,00
<i>S. sudetica</i>	2,79	0,03	0,70	0,01
<i>S. aucuparia</i>	1,37	0,00	0,69	0,00
<i>S. aria</i>	2,76	0,03	0,69	0,01
<i>S. aria</i> (diploid)	1,40	0,02	0,70	0,01
<i>S. danubialis</i>	2,73	0,01	0,68	0,00
<i>S. torminalis</i>	1,45	0,02	0,72	0,01

variabilita byla velmi nízká (do 1,5%). Absolutní mezidruhový rozdíl naměřených hodnot velikosti genomu (Cx) byl 5,8 % (nejnižší *S. danubialis* 0,68 pg, nejvyšší *S. torminalis* a *S. alnifrons* 0,72 pg). Jako statisticky průkazné byly vyhodnoceny rozdíly zobrazené tučně v tabulce 7.

Tab. 7: Statistická průkaznost rozdílů ve velikosti genomu mezi jednotlivými dvojicemi druhů (procedura GLM). Statisticky průkazné hodnoty jsou označeny tučně.

	<i>S. alnifrons</i>	<i>S. aucuparia</i>	<i>S. danubialis</i>	<i>S. torminalis</i>	<i>S. bohemica</i>	<i>S. eximia</i>	<i>S. gemella</i>	<i>S. hardeggensis</i>	<i>S. quernea</i>	<i>S. rhodanthera</i>	<i>S. sudetica</i>
<i>S. alnifrons</i>											
<i>S. aucuparia</i>	<b>&lt;.0001</b>										
<i>S. danubialis</i>	<b>&lt;.0001</b>	1.0000									
<i>S. torminalis</i>	0.7952	<b>&lt;.0001</b>	<b>&lt;.0001</b>								
<i>S. bohemica</i>	<b>&lt;.0001</b>	1.0000	0.9973	<b>&lt;.0001</b>							
<i>S. eximia</i>	0.3405	<b>0.0050</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>0.0037</b>	<b>&lt;.0001</b>						
<i>S. gemella</i>	<b>&lt;.0001</b>	0.9633	0.3547	<b>&lt;.0001</b>	0.9049	<b>0.0010</b>					
<i>S. hardeggensis</i>	0.8982	<b>0.0012</b>	<b>&lt;.0001</b>	0.0590	<b>&lt;.0001</b>	0.9997	<b>0.0002</b>				
<i>S. quernea</i>	<b>&lt;.0001</b>	1.0000	0.9491	<b>&lt;.0001</b>	1.0000	<b>0.0002</b>	0.9964	<b>&lt;.0001</b>			
<i>S. rhodanthera</i>	<b>0.0007</b>	0.2723	<b>0.0051</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>0.0421</b>	0.5113	0.6026	0.1637	0.1691		
<i>S. sudetica</i>	<b>&lt;.0001</b>	0.5194	<b>0.0219</b>	<b>&lt;.0001</b>	0.1595	0.0940	0.9405	<b>0.0182</b>	0.4633	0.9999	
<i>S. aria</i>	<b>&lt;.0001</b>	0.9978	0.7317	<b>&lt;.0001</b>	0.9977	<b>0.0001</b>	1.0000	<b>&lt;.0001</b>	1.0000	0.2509	0.6317

## Reprodukční systémy

Nalezené poměry embrya a endospermu udává tabulka 8. Překvapivé hodnoty DNA ploidie embrya se objevily u *S. gemella*, *S. eximia* a *S. alnifrons*. V přibližně polovině analýz bylo možné pozorovat jak očekávaná triploidní, tak pentaploidní embrya (viz obr. 28). Vznik pentaploidních embryí u triploidního taxonu lze vysvětlit sexuálním způsobem vývinu embrya.

Tab. 8: Zjištěné ploidie embryí a endospermu u hybridogenních a vybraných rodičovských druhů.

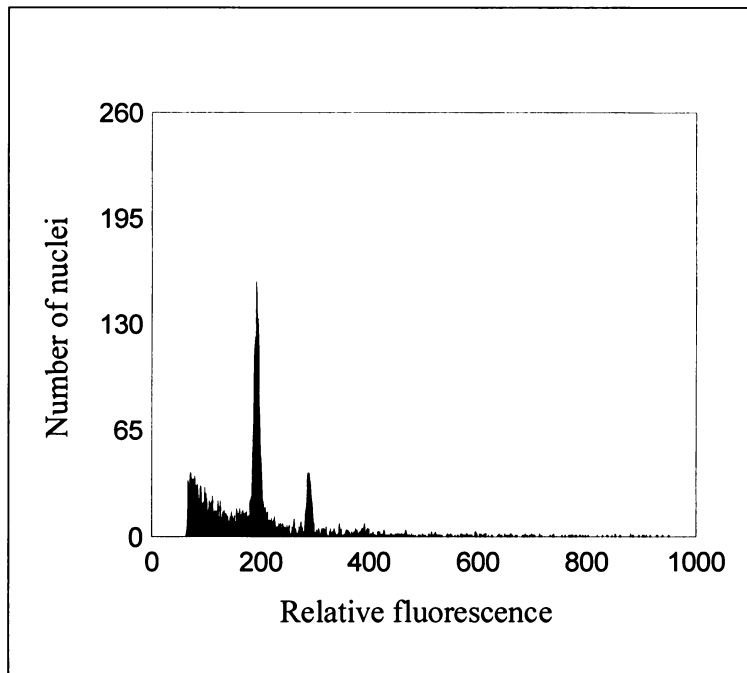
Druh	Ploidie embrya	Ploidie endospermu
<i>S. alnifrons</i>	3C, 5C	
<i>S. bohémica</i>	3C	8C
<i>S. eximia</i>	3C, 5C	
<i>S. gemella</i>	3C, 5C	
<i>S. hardeggensis</i>	2C	
<i>S. quemea</i>	4C	
<i>S. rhodanthera</i>	3C	
<i>S. sudetica</i>	4C	
<i>S. aucuparia</i>	2C	3C
<i>S. torminalis</i>	2C	3C

Reprodukčním způsobem u uvedených druhů je tedy pravděpodobně fakultativní apomixie. Zajímavá je také četnost výskytu sexuálně vzniklých semen, např. z 20 analyzovaných semen *S. gemella* byl tento způsob vzniku detekován u necelé poloviny (9 semen) a to i v rámci jednoho květenství!

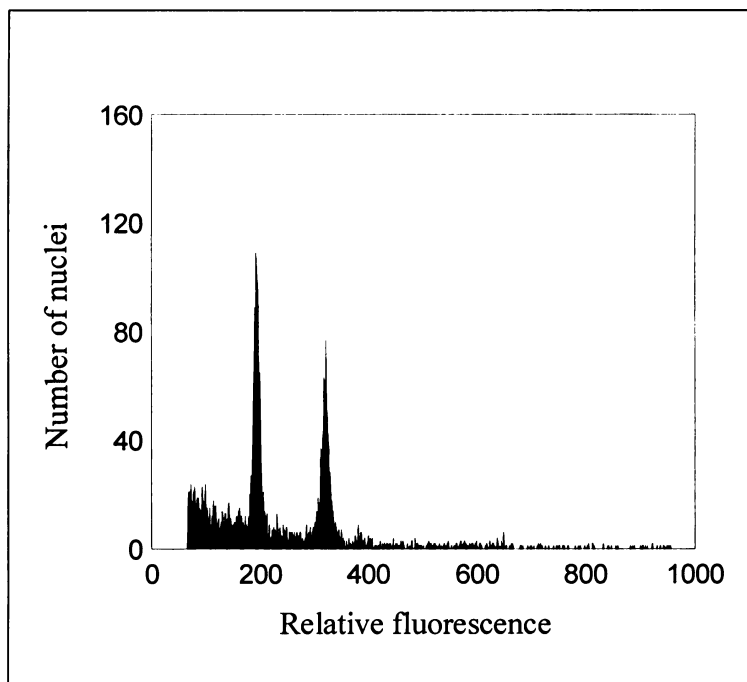
U *S. aucuparia* a *S. torminalis* byla zjištěna diploidní embrya a triploidní endosperm (obr. 26). Byl tak ověřen reprodukční způsob běžný u rodičovských taxonů, tj. sexuální.

Pseudogamie, která byla u hybridogenních druhů několikrát potvrzena embryologicky (Liljefors 1953, Jankun et Kovanda 1987) byla nalezena jen u několika vzorků *S. bohémica*. V analyzovaných semenech bylo zjištěno triploidní embryo a oktoploidní endosperm. Oktoploidní endosperm s největší pravděpodobností vznikl z hexaploidního zárodečného vaku splynutím s diploidní gametou pylu.

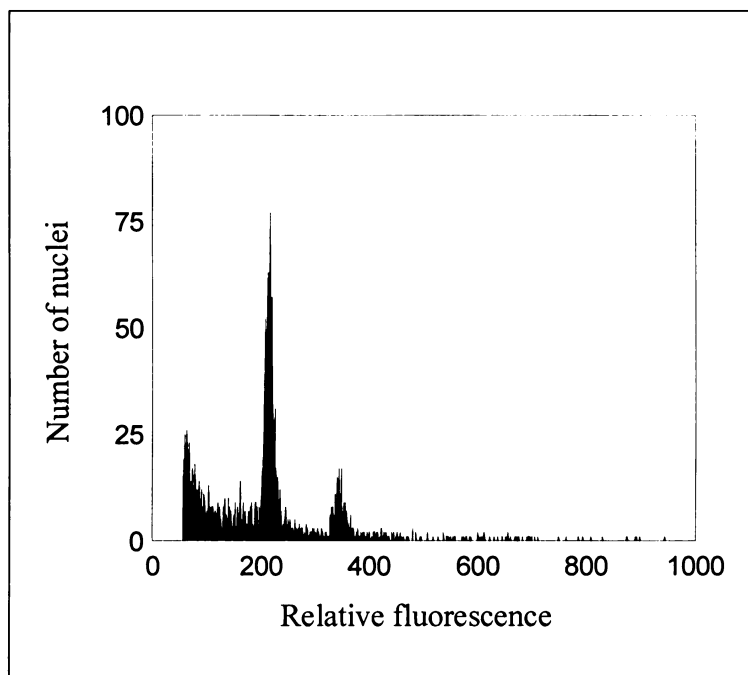
Celkově bylo stanovení reprodukčních způsobů problematické. Mnoho ze semen bylo napadeno parazitickým hmyzem, často bylo možné získat z cca 200 dobře vyvinutých malvic pouze 5-10 nepoškozených semen vhodných k analýzám. Dalším problémem byla častá absence endospermu. Ačkoliv byla testována různě stará semena (od cca června po listopad), endosperm se vyskytoval jen v minimu vzorků.



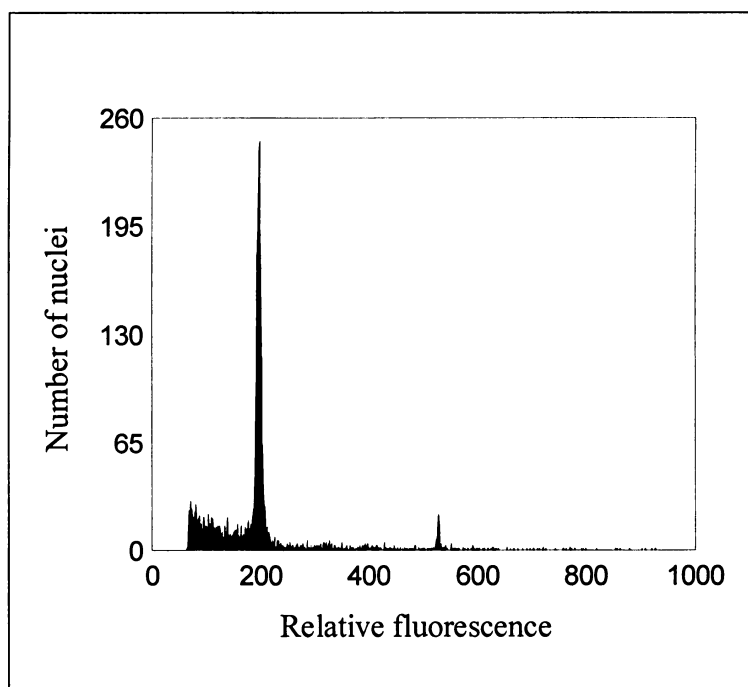
Obr. 26: Grafický výstup cytometrické analýzy 4 semen *S. aucuparia*. Poměr pík diploidního embrya (vlevo) a triploidního endospermu (vpravo) je 1,496, CV embrya – 3,09; CV endospermu – 2,98.



Obr. 27: Grafický výstup z průtokového cytometru triploidního *S. gemella*. Analýza dvou semen, triploidní embrya (vlevo), pentaploidní embrya (vpravo). Poměr pík je 1,655, CV 1 – 3,23; CV 2 - 2,77.



Obr. 28: Grafický výstup cytometrické analýzy 5ti semen triploidního *S. eximia*. Triploidní embryo (vlevo), pentaploidní embryo (vpravo). Poměr píků je 1,611, CV1 - 3,86; CV2 - 3,61.



Obr. 29: Grafický výstup cytometrické analýzy pěti semen *S. bohémica*. Vlevo je triploidní pik embrya, vpravo malý oktoploidní pik endospermu. Poměr píků 2,702, CV1-2,11; CV2-2,7.





## Morfometrické analýzy

### Metodika

### Materiál

Materiál byl sbírán v období května 2004 – června 2006 v oblastech výskytu jednotlivých druhů (celkem 29 populací; viz část Výskyt zástupců rodu *Sorbus* v ČR, v této části je též k dispozici kompletní seznam lokalit v tabulce 3). Populace byly navštěvovány opakovaně v různých vegetačních obdobích (každá lokalita minimálně třikrát k zachycení jarního, letního a časně podzimního aspektu) a byly zaměřeny pomocí systému GPS (eTrex Summit, Garmin). Každý studovaný exemplář byl označen plastovým štítkem s unikátním kódem, byla tak zajištěna totožnost sběru vzorků pro různé analýzy. Vzhledem ke vzácnosti některých druhů byl počet exemplářů začleněných do morfometrických analýz omezený. Například u *S. hardeggensis* bylo v roce 1996 (Kovanda 1996b) udáváno 20 jedinců na české i rakouské straně. Bohužel podrobná evidence jednotlivých exemplářů (včetně dnes již běžně dostupného GPS zaměření) ze strany Správy Národního parku Podyjí chybí a po konzultaci s pracovníky (J. Kučera, úst. sděl.) bylo nalezeno pouhých sedm exemplářů. Dalším problémem byl nedostatek některých dat (znaky na květech a plodech) způsobený herbivory, klimatickými vlivy, popř. sezónními výkyvy v plodnosti (Kovanda 1996a, 1996b, 1998). Z každého stromu byla sbírána část květenství a 4 plody do 70% ethanolu a herbářová položka s listy a květenstvím, případně s plody. Květy, plody i listy byly odebírány pouze ze zkrácených větví (tj. nikoliv z letorostů; Kovanda 1999) ze spodních partií jedinců (cca do 1 m výšky v rámci koruny). Sběr herbářových položek probíhal dle doporučení Meyera et al. (2005), tj. byly sbírány pouze celé zkrácené kvetoucí či plodící větévky včetně sterilního svazečku listů pod květenstvím. Celkem bylo analyzováno 386 jedinců z osmi dosud popsáných (sub)endemických druhů a dvou nově objevených hybridogenních populací nejasného původu (populace Knobloška a populace Milá). Tyto populace se nacházejí v Českém středohoří, od *S. bohemica* se dají celkem snadno odlišit (populace Knobloška má výrazně méně hluboké laloky listů, obě populace mají výrazně větší malvice než *S. bohemica*). Herbářové položky budou uloženy v herbáři Přírodovědecké fakulty UK (PRC).

## Měřené znaky

Na základě údajů uváděných v určovacích klíčích (Kovanda 1999, Kovanda 2002), článků zaměřených alespoň z části morfometricky (Kovanda 1959, Aas et al. 1994, Aldasoro et al. 1998, Meyer et al. 2005) a konzultací s kolegy, kteří se zabývají obdobnou tematikou

Tab. 9: Vybrané morfometrické znaky používané v literárních pramenech k determinaci zástupců rodu *Sorbus*.

Znak	citace
Délka řapíku	Aas et al. 1994
Délka čepele	Aas et al. 1994
Maximální šířka čepele	Aas et al. 1994
Počet párů postranních žilek	Aas et al. 1994
Hloubka zářezu mezi 2. a 3. lalokem	Meyer et al. 2005
Šířka třetího laloku (počítáno od báze čepele)	Lepší et al. úst. sděl.
Počet laloků nad 1cm šířky	Lepší et al. úst. sděl.
Délka od báze čepele ke špičce 1. laloku	Aldasoro et al. 1998
Průměr plodů	Kovanda 1959
Celková délka čnělky	Kovanda 1959
Délka srostlé části čnělky	Kovanda 2002
Velikost korunních lístků (délka a šířka)	Kovanda 1959
Velikost kališních lístků (délka a šířka)	Kovanda 1959

(M. Lepší et al., úst. sděl.), bylo pro morfometrické analýzy vybráno 18 primárních znaků.

Následně bylo pro analýzy vypočteno dalších 10 sekundárních poměrových znaků (viz tabulka 10). Jelikož se u *S. sudetica* nevyskytují laločnaté listy (jsou celistvé, obvejčité) byly znaky v7 a v8 (šířka 3. laloku od báze čepele a hloubka zářezu mezi 2. a 3. lalokem) nahrazeny hodnotou 1 (hodnota byla zvolena arbitrárně dle reálného předpokladu, že průměrný zub listu *S. sudetica* je milimetr dlouhý a milimetr široký). Špička potenciálního laloku u znaku v11 (délka od báze čepele ke špičce prvního laloku) byla u *S. sudetica* odhadnuta na základě směřování první postranní listové žilky od báze čepele. Z obdobného důvodu (absence laloků u většiny taxonů) nebyly do morfometrických analýz zahrnuty potenciální rodičovské druhy. Chybějící znaky u hybridogenních druhů byly nahrazeny druhovým průměrem daného znaku, počet jedinců se známými znaky byl vždy vyšší než počet jedinců, u kterých byl použit průměr (výsledky tedy nebyly výrazně negativně ovlivněné).

Na počátku studie byly měřeny další dva znaky (průměr lenticel na malvicích a počet lenticel na 1 cm<sup>2</sup>), tyto znaky se však ukázaly být velmi variabilní v rámci jednotlivých druhů, ale mezidruhové rozdíly nevykazovaly. Nebyly proto do statistického zpracování dat zahrnuty.

Kvůli zajištění větší věrohodnosti studie a odstranění vlivu odlehlých hodnot byl ze všech sběrů každý znak měřen třikrát, tj. k měření byl použit trojnásobný počet listů, květů a plodů. Z těchto tří hodnot byl pro každého jedince vypočten průměr, který byl poté použit ve statistických analýzách (viz elektronická příloha II). Znaky na listech byly měřeny pomocí plastového termostabilního pravítka (přesnost 1 mm), znaky na malvicích pomocí technické

šuplery (přesnost 0,1 mm) a znaky na květech pomocí binokulární lupy při zvětšení 6.3, 16 a 25 x (přesnost 0,1 mm).

Tab. 10: Morfologické znaky měřené na jednotlivých jedincích

Číslo znaku	Kód v SAS	Název znaku	Jednotka
1	v4	Délka čepele	mm
2	v5	Maximální šířka jedné strany čepele	mm
3	v6	Délka řapíku	mm
4	v7	Šířka třetího laloku od báze listu	mm
5	v8	Hloubka zářezu mezi 2. a 3. lalokem (počítáno od báze čepele)	mm
6	v9	Počet postranních žilek na 1 straně listu	počet
7	v10	Počet laloků širších než 1cm	počet
8	v11	Délka od báze čepele ke špičce 1. laloku	mm
9	v12	Průměr malvic	mm
10	v13	Délka malvic	mm
11	v14	Délka korunních lístků	mm
12	v15	Šířka korunních lístků	mm
13	v16	Délka kališních lístků	mm
14	v17	Šířka kališních lístků	mm
15	v18	Délka prašníků	mm
16	v19	Délka srostlé části čnělky	mm
17	v20	Celková délka čnělky	mm
18	v21	Šířka blizny	mm
19	v22	Poměr délka čepele / šířka 1 strany	poměr
20	v23	Poměr délka čepele / délka řapíku	poměr
21	v24	Poměr délka čepele / šířka 3. laloku	poměr
22	v25	Poměr délka od báze řapíku ke špičce 1. laloku / délka čepele	poměr
23	v26	Poměr průměr malvic / délka malvic	poměr
24	v27	Poměr délka / šířka korunních lístků	poměr
25	v28	Poměr délka / šířka kališních lístků	poměr
26	v29	Poměr délka srostlé části čnělky / celková délka čnělky	poměr
27	v30	Poměr délka korunních / kališních lístků	poměr
28	v31	Poměr šířka korunních / kališních lístků	poměr

Ověřené kvalitativní znaky vyskytující se u jednotlivých skupin (např. přítomnost laločnatých listů, barva malvic, růžové korunní lístky u *S. sudetica*) byly při sběru brány na zřetel, tyto znaky však nebyly potvrzeny u jiných druhů než u těch, které tyto skupiny definují.

### Statistické zpracování dat

Ke statistickému zpracování dat byly použity základní statistiky, korelační matice a ordinační metody získané programem SAS (verze 8e; SAS Institute 2004).

Základní statistiky (průměr, směrodatná odchylka, minimum, maximum, horní (75 %) a dolní (25 %) kvartil a medián) byly vypočítány procedurou UNIVARIATE (SAS 8e) pro všech 28 analyzovaných znaků v kompletním datovém souboru. Normální rozdělení hodnot jednotlivých znaků bylo testováno „Shapiro-Wilk“ testem, který je vhodný pro menší a středně velké soubory objektů (Marhold et Suda 2002). Ve výsledcích se vyskytovaly znaky, které neměly normální rozdělení, tj. nelze předpokládat mnohorozměrné normální rozdělení u celého souboru. Naměřené hodnoty u 15 z 28 znaků neměly normální rozdělení, hodnoty Shapirova-Wilkova testu byly nižší než 0,95 na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Kvůli možné korelaci znaků (citlivost ordinačních metod na vysoce korelované znaky, zvláště pak u diskriminačních analýz; Marhold et Suda 2002) byly všechny znaky datového souboru otestovány procedurou CORR (SAS 8e). Jako hodnota těsné korelace byla použita hranice běžně aplikovaná při zpracování botanických dat (0,95; Marhold et Suda 2002). Pro zjištění míry korelace byl vybrán Spearmanův korelační koeficient nevyžadující normální rozdělení vstupních dat (Marhold et Suda 2002). Shlukovací analýzy nebyly vzhledem k problematickému vyhodnocení provedeny. Některé studované populace obsahovaly malý počet jedinců a jejich začlenění by mohlo vést ke zkreslení populačních průměrů, navíc některé druhy jsou známy pouze z jediné populace.

### **Ordinační metody**

Všechny ordinační analýzy byly zpracovány v programu SAS 8e. Výstupy analýz jsou součástí elektronické přílohy.

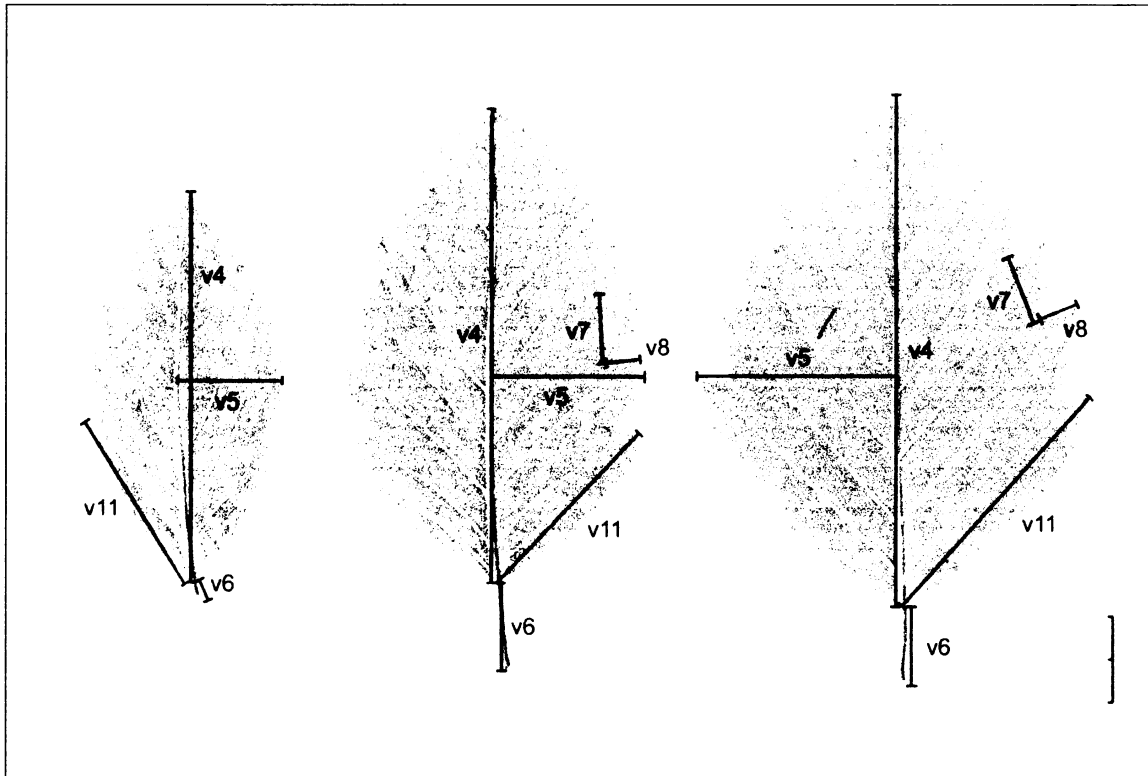
Pro odhalení základní struktury v datovém souboru a v jeho částech byla použita metoda analýzy hlavních komponent – trojrozměrná standardizovaná (vycházející z korelační matice dat) PCA pracující s předpokladem, že znaky se pohybují v euklidovském prostoru. Tato metoda se používá ke zjištění základní struktury v datech, jejím principem je nahrazení původního souboru pozorovaných znaků souborem nových, vzájemně nekorelovaných znaků tak, aby byla postihnuta maximální variabilita souboru. Výstupem jsou pak osy, hlavní komponenty, které jsou vedeny ve směru největší celkové variability datového souboru.

K určení nejdůležitějších znaků, které odlišují jednotlivé taxony, byly použity diskriminační analýzy – kanonická analýza (procedura CANDIS) a klasifikační analýza (procedura DISCRIM). U kanonické analýzy (oproti PCA) jsou data předem rozdělena do skupin, kanonické osy jsou tedy vedeny ve směru největší variability mezi skupinami (tj. největší podíl na kanonických osách mají znaky, které jsou málo variabilní uvnitř skupin a hodně variabilní mezi skupinami).

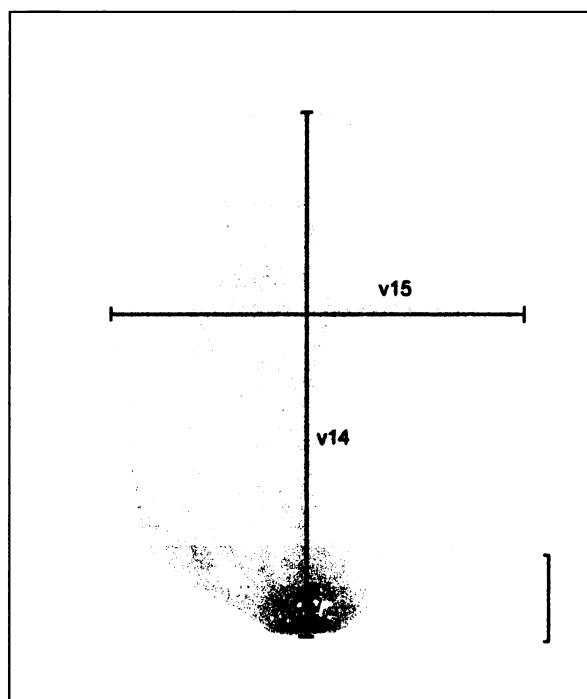
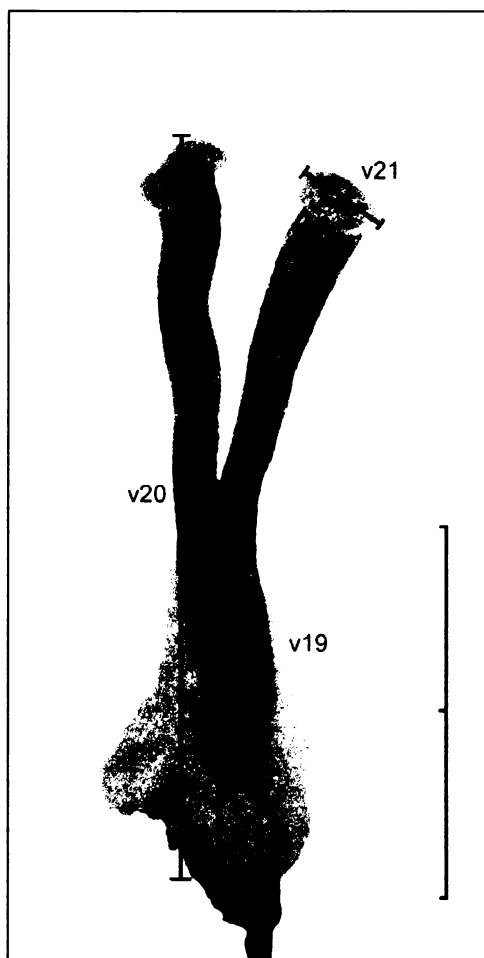
Při neparametrické klasifikační analýze bylo využito neparametrické metody *k*-nejbližších sousedů (*k-nearest neighbours*) a tzv. křížového ověření (*cross-validation*). Koeficient *k* určuje klasifikaci objektu do skupiny na základě informací získaných z *k*-nejbližších objektů známého zařazení. Nejvhodnější hodnota koeficientu byla stanovena experimentálně tak, aby analýza přinesla maximální počet (a podíl) správně determinovaných jedinců. Smyslem křížového ověření je aplikace klasifikačního kritéria odvozeného z *n-1* objektů na jeden vyřazený objekt (Marhold et Suda 2002). Celý postup se opakuje *n*-krát, výsledkem jsou procentuální úspěšnosti zařazení objektů do skupin.

Základní podmínky diskriminačních analýz jsou (Klecka 1980): 1. v datovém souboru musí být předem definované skupiny, 2. žádný ze znaků nesmí být lineární kombinací jiného znaku, 3. neměly by se používat dva nebo více velmi silně korelované znaky, 4. znaky charakterizující každou skupinu by měly splňovat požadavek mnohorozměrného normálního rozdělení, 5. počet znaků použitých v analýze musí být menší než počet objektů v analýze zmenšený o počet skupin. Ačkoliv získaná data ne všechny podmínky splňují (mnohorozměrné normální rozdělení, počet znaků vs. počet jedinců), diskriminační metody jsou celkově robustní k nedodržení podmínek (případné odchylky se týkají zejména úspěšnosti klasifikace). Pokud bylo podezření na nedodržení statistických požadavků, byly provedeny různé modifikace postupů tak, aby případné chyby byly minimalizovány (snížení počtu analyzovaných znaků, vypuštění konstantních znaků apod.).

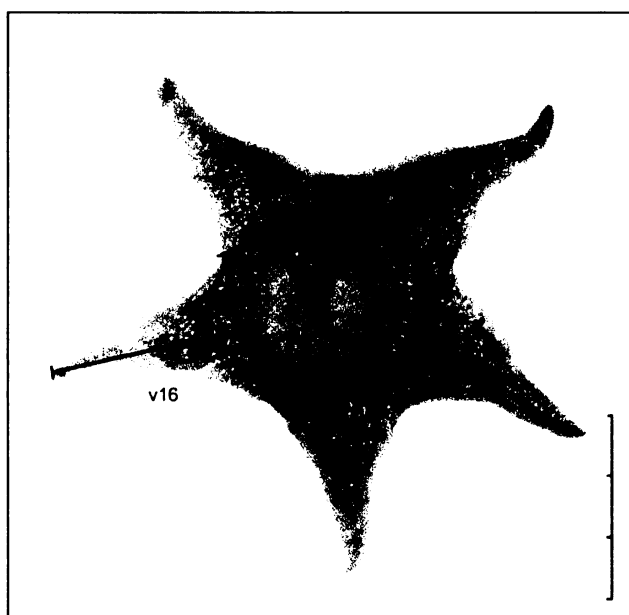
Veškeré výstupy z analýz jsou k dispozici na přiloženém CDROMu a na internetové stránce <http://botany.natur.cuni.cz/suda/sorbus/>.



Obr. 30: Vybrané znaky měřené na listech třech typů hybridogenních jeřábů; zleva *S. sudetica*, *S. quercea*, *S. alnifrons* (měřítko 20mm)



Obr. 31 a 32: Znaky měřené na čnělce (vlevo) a korunním lístku (vpravo) *S. eximia* (měřítko 2mm vlevo, 1mm vpravo)



Obr. 33: Znaky měřené na kališních lístcích (měřítko 3mm) *S. eximia*.

## Výsledky morfometrických analýz

Ve všech grafických výstupech byly použity následující symboly pro jednotlivé druhy:

<i>S. alnifrons</i>		<i>S. querneae</i>
<i>S. bohémica</i>	◻	<i>S. rhodanthera</i>
♥ <i>S. eximia</i>	○	<i>S. sudetica</i>
<i>S. gemella</i>	▷	Knobloška
◇ <i>S. hardeggensis</i>	✱	Milá

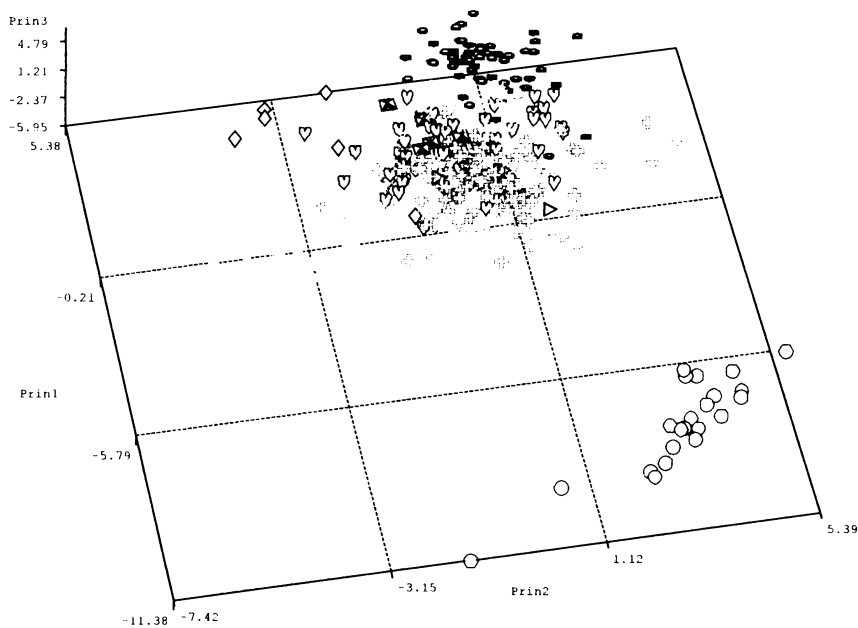
I přes malý počet měřených jedinců byly do analýz zahrnuty *S. hardeggensis* (7 jedinců), populace Knobloška (9 jedinců) a Milá (8 jedinců). Jelikož je počet měřených znaků u těchto tří skupin větší než počet jedinců, je nutné interpretaci výsledků brát s rezervou. Počty analyzovaných jedinců se u ostatních druhů pohybovaly od 22 (*S. sudetica*) do 101 (*S. bohémica*). Všechny diskriminační analýzy se zahrnutím taxonů s nižším počtem jedinců než znaků byly v rámci zachování objektivity ověřeny další analýzou s vypuštěním určitého počtu znaků nejméně korelovaných s diskriminačními osami. Výsledky těchto analýz byly obdobné jako se všemi znaky, rozdělení taxonů však nebylo tak jednoznačné.

Výsledky základních statistik celého souboru dat (procedura UNIVARIATE) se všemi znaky jsou k dispozici v elektronické příloze II.

Korelační matice znaků s použitím Spearmanova korelačního koeficientu je uvedena v elektronické příloze III. Hranice těsné korelace používaná běžně při zpracování botanických dat (0,95; Marhold et Suda 2002) nebyla dosažena u žádné dvojice znaků, a proto byly i v diskriminačních analýzách použity všechny měřené znaky.

Z výsledku PCA (obrázek 34) je zřejmé, že v datovém souboru existuje určitá struktura, resp. došlo k oddělení *S. sudetica* a *S. querneae* od všech ostatních druhů. Tento trend je vysvětlitelný celkovou odlišností těchto dvou taxonů (jiná předpokládaná rodičovská kombinace; u *S. sudetica* absence laloků listů, jiný poměr délky listů ku šířce a jiný tvar a velikost laloků u *S. querneae*).

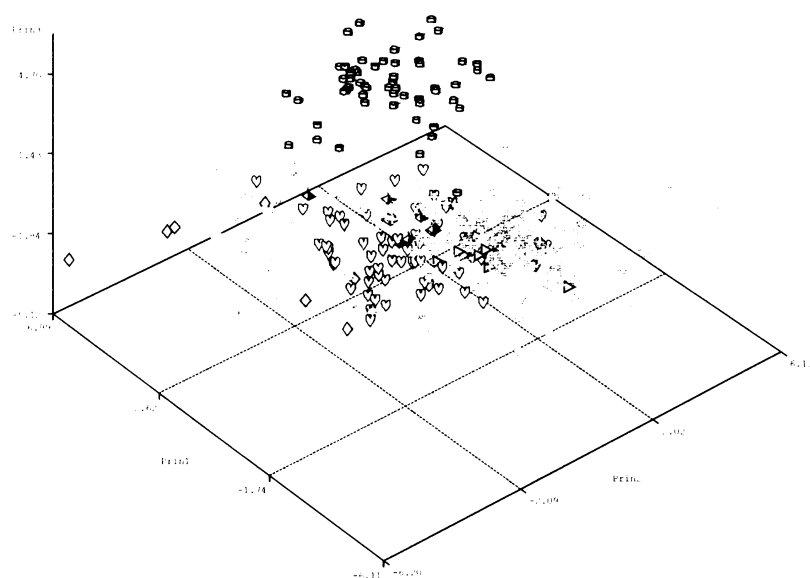




Obr. 34: Grafický výstup PCA pro všechny studované druhy s použitím všech 28 znaků. Jednotlivé osy vysvětlují 34,05%, 13,89% a 9,85% variability. Z obrázku je patrné oddělení *S. sudetica* ○ a *S. quernea* ◇ od zbytku souboru.

Po vyřazení jednoznačně oddělených *S. sudetica* a *S. quernea* z analýzy (viz obr. 35) se na první pohled jeví, že ostatní vstupní data postrádají jednoznačnou strukturu. Důvodem může být fakt, že jednotlivé druhy jsou si feneticky velice blízké. Tento jev také může být způsoben velkým počtem znaků použitých v PCA, kdy může docházet ke stírání významu potenciálně důležitých znaků (analýza neváží jednotlivé znaky a chápe všechny jako stejně důležité pro oddělení skupin).

Existují zde však určité trendy, ačkoliv jde o morfologicky si výrazně podobné druhy stejné rodičovské kombinace (*S. aria* s. lat × *S. torminalis*), některé se alespoň částečně oddělují od ostatních (např. výrazněji *S. rhodanthera*, do jisté míry i *S. alnifrons*, *S. bohémica* a *S. hardeggensis*).



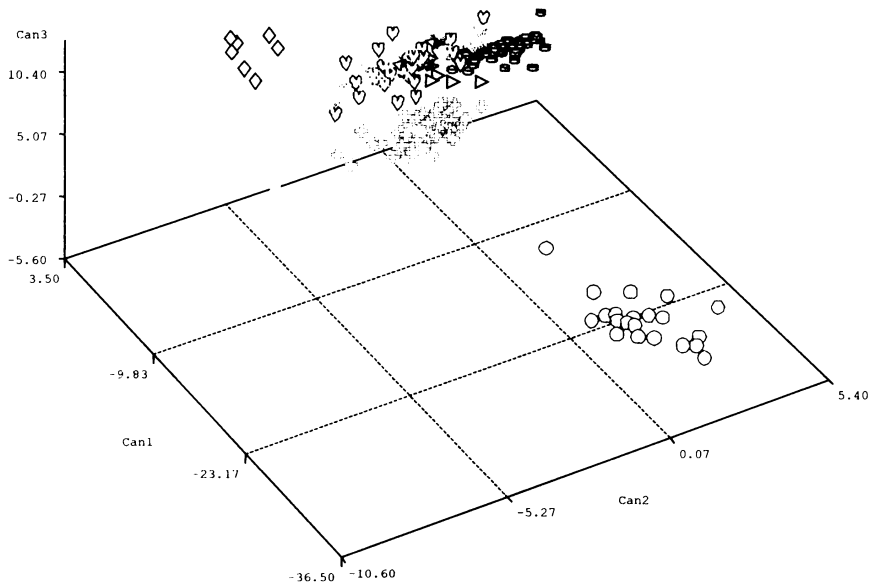
Obr. 35: Grafický výstup PCA pro všechny druhy (mimo *S. sudetica* a *S. querneae*) a všech 28 znaků. Jednotlivé osy vysvětlují 25,81%, 13,03% a 11,14% variability. Graf ilustruje určité trendy v oddělení *S. rhodanthera*  $\square$  a částečně i *S. alnifrons*  $\heartsuit$ , *S. bohémica*  $\diamond$  a *S. hardeggensis*  $\blacklozenge$  od zbytku souboru.

Pro odhalení znaků, které nejlépe charakterizují jednotlivé druhy byly použity diskriminační analýzy. Jako skupiny byly definovány jednotlivé druhy, které jsou od sebe dostatečně geograficky izolované. Do kanonické diskriminační analýzy (dále jen CDA) byli zahrnuti všichni jedinci a všechny znaky. Pro odhalení rozdílů mezi morfologicky velmi podobnými taxony, byly z analýz postupně vyjímány taxony dobře separované.

V CDA všech druhů (obrázek 36) se výrazně odlišil *S. sudetica* (již zřetelně oddělený v analýze PCA – viz obr. 34) podle osy Can1. Znak, který je s touto osou nejtěsněji korelovaný (viz tabulka 11), je v24 – poměr délka čepele / šířka 3. laloku (kanonický korelační koeficient -0,9918). Tento výsledek byl očekáván vzhledem k absenci laloků u *S. sudetica*, kde byla hodnota šířky laloku nahrazena hodnotou 1. Bylo tedy snahou nalézt další znaky, které by vedly k oddělení *S. sudetica* od zbývajících taxonů. Druhý znak, který je s touto osou nejtěsněji korelovaný je znak v23 – poměr délka čepele / délce řapíku (-0,9118).

Zároveň došlo k oddělení druhého, vzhledem k rodičovské kombinaci unikátního, druhu (*S. querneae*) od zbytku souboru a to díky ose Can2. Tato osa je nejtěsněji korelovaná s poměrem délky srostlé části čnělky / celkové délce čnělky – znak v29 (0,7910), *S. querneae* má oproti ostatním druhům (mimo *S. hardeggensis*) výrazně méně srostlé až volné čnělky.

Stejný znak oddělil také *S. hardeggensis*, který je však od *S. querneae* odlišen osou Can3, tj. nejtěsněji korelovaným znakem (v13) – délka malvic (0,7946). *S. hardeggensis* má oproti *S. querneae* delší malvice.

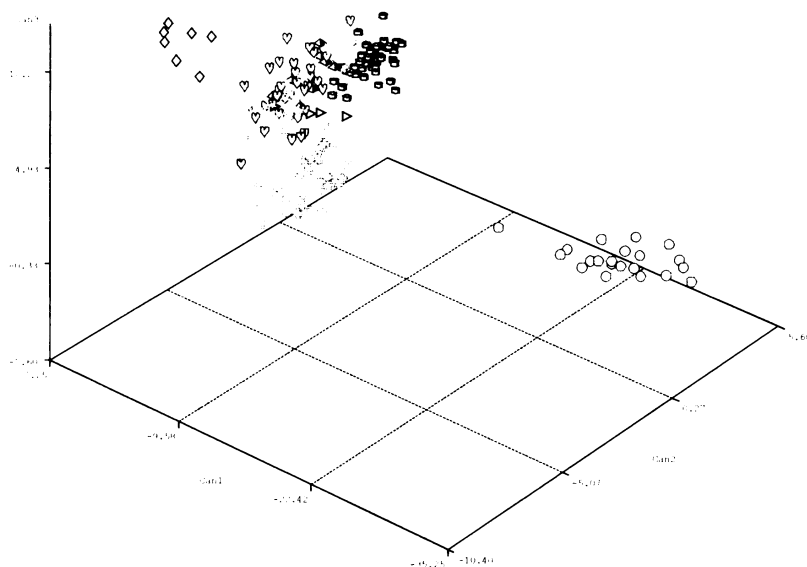


Obr. 36: Výstup z CDA pro všechny druhy a všech 28 znaků ilustrující výrazné oddělení *S. sudetica* ○, *S. querneae* △ a *S. hardeggensis* ◇ od zbytku taxonů. Jednotlivé osy vysvětlují 68,34%, 12,74% a 7,83% variability

Tab. 11: Kanonické diskriminační koeficienty pro analýzu všech druhů s použitím všech znaků. Tučně jsou označeny kódy znaků (spolu s odpovídajícími kanonickými koeficienty) použitých v klasifikační analýze.

Kód	Can1	Can2	Can3	Kód	Can1	Can2	Can3
<b>v4</b>	0.314597	0.140732	0.535454	v18	0.555779	-0.075342	-0.200293
<b>v5</b>	0.465528	0.312581	<b>0.586384</b>	<b>v19</b>	0.240229	<b>0.783676</b>	0.092986
<b>v6</b>	<b>0.699924</b>	0.241050	0.332732	v20	0.138848	0.442863	0.083378
<b>v7</b>	<b>0.735738</b>	0.001688	0.398485	v21	0.229654	-0.381967	-0.054657
v8	0.533595	0.104863	0.257141	v22	-0.679601	-0.339963	-0.352859
v9	0.434083	-0.013034	0.103399	<b>v23</b>	<b>-0.911801</b>	-0.082407	0.062729
<b>v10</b>	<b>0.738683</b>	-0.010278	0.402846	<b>v24</b>	<b>-0.991887</b>	0.056676	-0.007663
v11	0.386519	0.435563	0.536746	v25	0.289389	0.591414	0.184755
<b>v12</b>	0.377199	<b>0.786006</b>	0.227200	<b>v26</b>	0.213845	0.519078	<b>-0.788237</b>
<b>v13</b>	0.238757	0.417042	<b>0.794594</b>	v27	-0.467840	0.151225	-0.197767
v14	0.135477	0.501193	-0.219252	v28	0.086870	0.015450	-0.045214
v15	0.470237	0.417586	-0.062371	<b>v29</b>	0.227010	<b>0.791061</b>	0.088073
v16	0.070660	0.330661	0.046999	v30	-0.067515	-0.079409	-0.148671
v17	0.009044	0.517963	0.155029	v31	0.345412	-0.208183	-0.181729

Z výsledků CDA vyplývá morfologická odlišnost tří uvedených taxonů od zbytku souboru. Vzhledem k tomu, že analýza byla uskutečněna se všemi naměřenými znaky, byla provedena modifikace CDA s vypuštěním znaků v7 a v8 (kvůli problematice těchto znaků u značně odlišného *S. sudetica* – viz kapitola Metodika). Výsledek zachycuje obrázek 37, je prakticky totožný co se týče oddělení *S. sudetica*, *S. quernea* a *S. hardeggensis* od ostatních taxonů.



Obr. 37: CDA všech jedinců znázorňuje oddělení *S. sudetica* ○, *S. hardeggensis* ◇ a *S. quernea* □ od zbytku taxonů. Analyzováno se všemi znaky mimo znaků v7 a v8. Jednotlivé osy vysvětlují 68,57%, 13,51% a 8,33% variability.

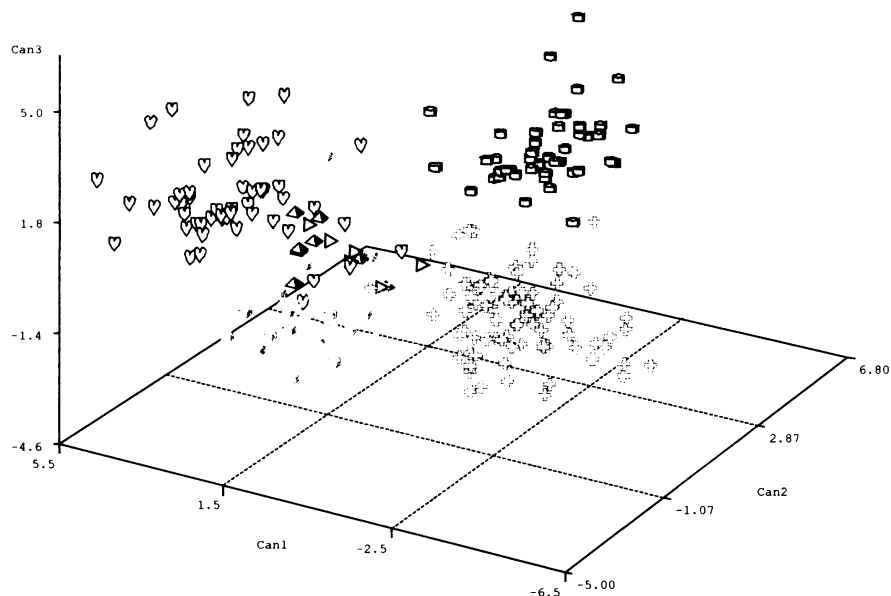
Při použití pouze primárních znaků (tj. bez poměrových znaků) se taxony *S. sudetica*, *S. hardeggensis* a *S. quernea* (data nezobrazena) od zbytku souboru oddělily jinými znaky (nejtěsněji korelovaný znak s osou Can1 byl v12 - délka malvic; 0,8462), *S. hardeggensis* byl oddělen od *S. quernea* osou Can2, se kterou je nejtěsněji korelovaný znak v10 – počet laloků širších než 1cm). Vliv poměrových znaků je tedy evidentní. Ve všech dalších analýzách dosahovaly kanonické korelační koeficienty u sekundárních znaků vysokých hodnot (srovnatelných s hodnotami pro znaky primární), z tohoto důvodu tedy byly vždy začleněny všechny znaky včetně poměrových. Oddělení trojice taxonů (*S. sudetica*, *S. quernea* a *S. hardeggensis*) od zbylé skupiny bylo potvrzeno klasifikační diskriminační analýzou všech jedinců se všemi znaky (data nezobrazena) a s vybranými devíti znaky, které byly nejtěsněji korelovány se třemi kanonickými osami (viz tučně zobrazené znaky v tabulce 11), uvažováno

bylo  $k = 7$  nejbližších sousedů. Výsledek ilustruje tabulka 12. Ze tří uvedených taxonů byly všichni jedinci zařazeni k příslušnému taxonu (100% úspěšnost).

Tab. 12: Klasifikační diskriminační analýza druhů *S. sudetica*, *S. querneae* a *S. hardeggensis*. Hodnota v prvním řádku u každého druhu je počet jedinců, na druhém řádku procentuální zastoupení z- celého druhu. Např. u *S. sudetica* je 22 jedinců zařazeno správně, což je 100% analyzovaných jedinců. V řádku „chybně zařazených“ je vyjádřeno procento chybně zařazených jedinců daného taxonu.

Z druhu	Zařazeno k druhu				Celkem
	<i>S. sudetica</i>	<i>S. querneae</i>	<i>S. hardeggensis</i>	Ostatní	
<i>S. sudetica</i>	22	0	0	0	22
	100	0	0	0	100
<i>S. querneae</i>	0	53	0	0	53
	0	100	0	0	100
<i>S. hardeggensis</i>	0	0	7	0	7
	0	0	100	0	100
Ostatní	0	0	0	304	304
	0	0	0	100	100
Chybně zařazených	0	0	0	0	0

Vzhledem k tomu, že druhy *S. sudetica*, *S. querneae* a *S. hardeggensis* byly v předchozích analýzách dostatečně odděleny od zbytku souboru, byly z dalších analýz vyřazeny. Výsledek CDA všech druhů mimo *S. sudetica*, *S. querneae* a *S. hardeggensis* ilustruje obrázek 38. Osa Can2 výrazně odděluje znakem v8 – hloubka zářezu mezi 2. a 3. lalokem (0,7436) - *S. rhodanthera* od ostatních druhů (*S. rhodanthera* má v průměru větší hloubku zářezu mezi druhým a třetím lalokem) a zároveň osa Can1 odděluje *S. bohémica* od ostatních druhů kromě *S. rhodanthera* nejtěsněji korelovaným znakem v26 – poměr průměr malvic / délka malvic (-0,9236; oproti ostatním taxonům má *S. bohémica* vzhledem k délce širší malvice). *S. bohémica* byl v samostatné analýze od *S. rhodanthera* spolehlivě oddělen (data nezobrazena) znakem v13 – délka malvic (0,9052).



Obr. 38: CDA všech druhů mimo *S. sudetica*, *S. querneana* a *S. hardeggensis* ukazující oddělení *S. bohémica* a *S. rhodanthera* od zbývajících taxonů. Jednotlivé osy vysvětlují 39,05%, 32,59% a 12,98% variability.

Kanonické korelační koeficienty všech znaků uvádí tabulka 13. Tučně je zobrazeno jedenáct znaků nejtěsněji korelovaných s jednotlivými kanonickými osami, které byly vybrány do klasifikační diskriminační analýzy.

Tab. 13: Kanonické korelační koeficienty všech druhů mimo *S. sudetica*, *S. querneana* a *S. hardeggensis*. Tučně jsou označeny znaky (spolu s odpovídajícími kanonickými korelačními koeficienty) použité v klasifikační analýze.

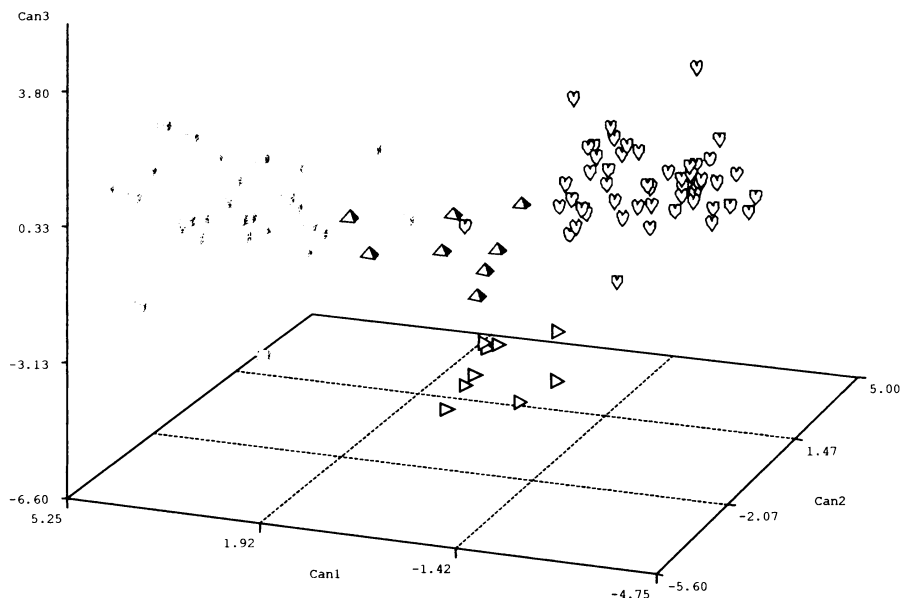
Kód	Can1	Can2	Can3	Kód	Can1	Can2	Can3
v4	0.468897	0.515045	0.079996	v18	-0.270315	0.217343	0.346536
<b>v5</b>	<b>0.530885</b>	<b>0.599067</b>	0.115062	v19	-0.013843	0.530584	0.080623
v6	0.300996	0.450374	0.362415	v20	0.101635	-0.002207	0.065160
v7	0.149588	0.345114	0.093075	<b>v21</b>	0.018315	<b>-0.795404</b>	0.108327
<b>v8</b>	0.096319	<b>0.743668</b>	-0.295935	v22	-0.421844	-0.404537	-0.125578
<b>v9</b>	-0.002808	<b>0.601396</b>	<b>-0.397852</b>	v23	0.269319	0.106203	-0.351034
<b>v10</b>	<b>0.521511</b>	0.448370	0.044279	v24	-0.147776	0.106734	0.041836
v11	0.499821	0.502851	0.150810	v25	0.206253	0.099874	0.159412
<b>v12</b>	0.399292	<b>0.581184</b>	0.011621	<b>v26</b>	<b>-0.923631</b>	0.021902	-0.070520
<b>v13</b>	<b>0.633317</b>	0.344682	0.050733	v27	-0.291996	-0.148421	0.053468
<b>v14</b>	-0.456453	0.376341	<b>0.497312</b>	v28	-0.057718	0.339861	-0.195755
<b>v15</b>	-0.274639	0.558612	<b>0.539953</b>	<b>v29</b>	-0.040648	<b>0.544617</b>	0.065945
v16	-0.029190	0.363254	-0.026475	v30	-0.214902	-0.204839	0.293397
v17	0.052953	0.188541	0.354703	v31	-0.282437	0.326631	0.235119

Ze dvou druhů (*S. bohémica* a *S. rhodanthera*) bylo při použití 11 nejtěsněji korelovaných znaků správně určeno 98,36% z nich (klasifikace na základě  $k = 7$  nejbližších sousedů). Pouze jeden exemplář *S. bohémica* byl nesprávně přiřazen do *S. rhodanthera*. Výsledek přináší tabulka 14.

Tab. 14: Klasifikační diskriminační analýza druhů *S. bohémica* a *S. rhodanthera*.

Z druhu	Zařazeno k druhu			Celkem
	<i>S. bohémica</i>	<i>S. rhodanthera</i>	Ostatní	
<i>S. bohémica</i>	108	1	2	111
	97,3	0,9	1,8	100
<i>S. rhodanthera</i>	0	57	0	57
	0	100	0	100
Ostatní	1	1	134	136
	0,74	0,74	98,53	100
Chybně zařazených (%)	2,7	0	1,48	1,64

Situace u zbylých tří druhů (*S. alnifrons*, *S. eximia* a *S. gemella*) a dvou populací nejasného taxonomického postavení (Knobloška a Milá) je podstatně složitější. CDA na základě všech měřených znaků zachycuje obr 39.



Obr. 39: CDA *S. alnifrons* (●), *S. eximia* (♥), *S. gemella* (▲) a dvou populací nejasného taxonomického postavení (Knobloška (▷) a Milá (◀)). Jednotlivé osy vysvětlují 48,23%, 30,37% a 19,87% variability.

Podél osy Can1 se oddělil *S. eximia* od zbývajících druhů. Tato osa je nejtěsněji korelovaná se znakem v9 – počet postranních žilek na jedné straně listu (0,7277). U *S. eximia* byly nalezeny nižší hodnoty počtu postranních žilek. Naopak osa Can2 rozděluje druh *S. alnifrons* od *S. gemella* a je těsně korelovaná se znakem v28 – poměr délka / šířka kališních lístků (0,7393). Lze tedy říci, že *S. alnifrons* má poměr délky / šířce kališních lístků nižší. Osa Can3 odděluje poslední tři skupiny (*S. gemella*, populace Knobloška a Milá) znakem v12 – průměr malvic (–0,7210; tento znak nejen že odděluje dvě populace nejasného postavení od *S. gemella*, ale odlišuje i obě populace navzájem). *S. gemella* má oproti populacím Knobloška a Milá menší malvice. Kanonické korelační koeficienty pro všechny tři osy jsou uvedeny v tabulce 15, tučně jsou označeny nejtěsněji korelované znaky s jednotlivými osami, které byly následně použity pro klasifikační analýzu.

Tab. 15: Kanonické korelační koeficienty analýzy druhů *S. alnifrons*, *S. eximia*, *S. gemella* a populací Knobloška a Milá. Tučně jsou označeny znaky (spolu s odpovídajícími kanonickými korelačními koeficienty) použité v klasifikační analýze.

Kód	Can1	Can2	Can3	Kód	Can1	Can2	Can3
v4	0.119414	-0.403561	0.353664	v18	-0.311565	0.338230	-0.086403
v5	0.084131	-0.061703	0.465752	<b>v19</b>	0.171489	<b>-0.649223</b>	0.029668
v6	-0.321135	0.119487	0.021461	v20	-0.088723	-0.069570	0.120262
<b>v7</b>	-0.025200	-0.054536	<b>0.481761</b>	<b>v21</b>	<b>-0.532535</b>	0.371117	0.003067
<b>v8</b>	<b>0.668653</b>	0.226958	0.462586	v22	0.073152	-0.513986	-0.354843
<b>v9</b>	<b>0.727706</b>	0.138265	-0.423144	v23	0.411600	-0.494060	0.330268
v10	0.120670	-0.292216	0.417937	v24	0.173816	-0.370303	-0.365771
v11	-0.020611	-0.152723	0.462529	v25	-0.215069	0.383069	0.292786
<b>v12</b>	0.297223	-0.033975	<b>-0.721014</b>	v26	0.358308	-0.338435	-0.325391
<b>v13</b>	0.065015	0.183390	<b>-0.512763</b>	v27	-0.144795	0.429627	0.019780
v14	-0.516014	0.496683	-0.062349	<b>v28</b>	0.294383	<b>0.739352</b>	0.195370
<b>v15</b>	<b>-0.572509</b>	0.214143	-0.100409	<b>v29</b>	0.199153	<b>-0.646674</b>	0.009324
<b>v16</b>	0.128506	<b>0.677664</b>	0.221982	v30	-0.385936	-0.434941	-0.190591
v17	-0.355863	0.045484	0.115683	v31	-0.133490	0.107759	-0.150837

Klasifikační diskriminační analýza ( $k = 2$ ) tří druhů (*S. alnifrons*, *S. eximia* a *S. gemella*) a populací Knobloška a Milá určila správně 90,45% jedinců, což je vzhledem k relativně vysokému počtu současně analyzovaných skupin taxonů (pět taxonů) i jejich značné fenotypové podobnosti poměrně vysoká úspěšnost. Výsledek ilustruje tabulka 16.

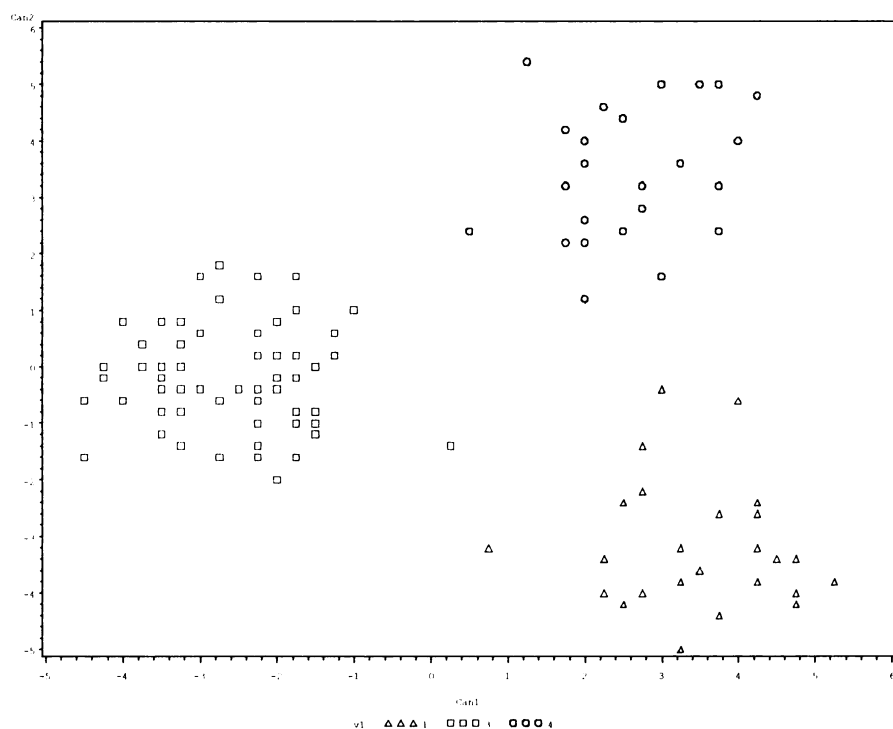


Tab. 16: Klasifikační diskriminační analýza *S. alnifrons*, *S. eximia*, *S. gemella* a populací Knobloška a Milá.

Z druhu	Zařazeno k druhu					Celkem
	<i>S. alnifrons</i>	<i>S. eximia</i>	<i>S. gemella</i>	Knobloška	Milá	
<i>S. alnifrons</i>	24	0	0	0	3	27
	88,89	0	0	0	11,11	100
<i>S. eximia</i>	2	58	4	0	0	64
	3,13	90,63	6,25	0	0	100
<i>S. gemella</i>	1	0	24	0	3	28
	3,57	0	85,71	0	10,71	100
Knobloška	0	0	0	9	0	9
	0	0	0	100	0	100
Milá	0	0	0	0	8	8
	0	0	0	0	100	100
Chybně zařazených (%)	11,11	9,38	14,28	0	0	<b>9,55</b>

Z hlediska správnosti určení jsou problematické druhy *S. eximia* a *S. alnifrons* a *S. gemella*. Z těchto taxonů nebylo správně určeno celkem 10,92% jedinců. U *S. eximia* může být chybně zařazení několika jedinců jak do *S. alnifrons*, tak do *S. gemella* vysvětleno relativně velkou vnitrodruhovou variabilitou, extrémní jedinci se pak morfologicky blíží jiným druhům.

Kvůli odfiltrování vlivu malého počtu jedinců u dvou nejasných populací byla skupina třech taxonů (*S. alnifrons*, *S. eximia*, *S. gemella*) analyzována samostatně. Výsledek dvourozměrné kanonické diskriminační analýzy uveden na obrázku 40, kanonické korelační koeficienty pro dvě osy udává tabulka 17.



Obr. 40: Dvourozměrná CDA oddělující *S. alnifrons* (modrý trojúhelník), *S. eximia* (červený čtverec) a *S. gemella* (zelený kruh). Jednotlivé osy vysvětlují 60,21% a 39,79% variability.

Tab. 17: kanonické korelační koeficienty dvourozměrné diskriminační analýzy *S. alnifrons*, *S. eximia* a *S. gemella*. Tučně jsou označeny znaky (spolu s odpovídajícími kanonickými korelačními koeficienty) použité v klasifikační analýze.

Kód	Can1	Can2	Kód	Can1	Can2
v4	0.179515	-0.356779	v18	-0.340860	0.293389
v5	0.127766	0.040392	<b>v19</b>	0.215192	<b>-0.614984</b>
v6	-0.364031	0.100819	v20	-0.071039	-0.041599
v7	0.013575	0.055476	<b>v21</b>	<b>-0.549447</b>	0.335808
<b>v8</b>	<b>0.728451</b>	0.362372	v22	0.092991	<b>-0.607481</b>
<b>v9</b>	<b>0.776936</b>	0.073207	v23	0.510734	-0.420494
v10	0.180392	-0.222441	v24	0.176356	-0.478764
v11	0.009182	-0.069427	v25	-0.245729	0.450285
v12	0.324382	-0.253943	v26	0.380696	-0.407686
v13	0.004302	0.071842	v27	-0.167761	0.411258
<b>v14</b>	<b>-0.551291</b>	0.443747	<b>v28</b>	0.267218	<b>0.765726</b>
<b>v15</b>	<b>-0.592333</b>	0.159700	<b>v29</b>	0.239739	<b>-0.614457</b>
<b>v16</b>	0.109826	<b>0.707083</b>	v30	-0.376144	-0.476881
v17	-0.345147	0.058116	v31	-0.156752	0.062691

Pět nejvyšších kanonických korelačních koeficientů pro každou osu je označeno tučně, tyto znaky byly vybrány do klasifikační diskriminační analýzy. Nejtěsněji korelovaný znak s osou Can1 je v9 – počet postranních žilek na jedné straně listu (0,7769), který výrazně odděluje *S. eximia* od zbytku souboru. S osou Can2 je nejtěsněji korelován znak v28 – poměr

délka / šířka kališních lístků (0,7657), který odlišuje *S. alnifrons* od *S. gemella*. Výsledek klasifikační analýzy je v tabulce 18, použitý koeficient  $k = 17$  nejbližších sousedů. Úspěšně se podařilo určit 98,32% jedinců.

Tab. 18: Klasifikační diskriminační analýza druhů *S. alnifrons*, *S. eximia* a *S. gemella*.

Druh:	Zařazeno k druhu			Celkem
	<i>S. alnifrons</i>	<i>S. eximia</i>	<i>S. gemella</i>	
<i>S. alnifrons</i>	26 96,3	0 0	1 3,7	27 100
<i>S. eximia</i>	1 1,56	63 98,44	0 0	64 100
<i>S. gemella</i>	0 0	0 0	28 100	28 100
Chybně zařazených (%)	3,7	1,56	0	<b>1,68</b>

Při zpětné kontrole dvou nesprávně zařazených jedinců (A4 u *S. alnifrons* a E115 u *S. eximia*) nebyly nalezeny výraznější odchylky od ostatních jedinců druhu, u vzorku A4 se vyskytly kratší kališní lístky (v16) a kratší malvice (v13), u vzorku E115 byl nalezen větší poměr mezi délkou čepele / délce řapíku (v23), nejde však o znaky těsně korelované s kanonickými osami.

Vzhledem k udávaným morfologickým rozdílům populací *S. eximia* v Českém krasu (resp. rozdílu populace Koda ostatních populací v Českém krasu) byla provedena další CDA a klasifikační diskriminační analýza. Byly použity pouze dvě skupiny (1. populace Koda, 2. ostatní populace v Českém krasu). Z obrázku 41 je jasně patrné, že populace na Kodě se výrazně oddělila od ostatních populací znakem v8 – hloubka zářezu mezi 2. a 3. lalokem, který je korelovaný s osou Can1 (0,7557). Pro ověření daného výstupu byla provedena další modifikace analýz, ve které jako skupiny vystupovaly jednotlivé populace *S. eximia* (viz obr. V10). Výsledek byl prakticky analogický, populace na Kodě se výrazně oddělila od všech ostatních populací znakem v8 – hloubka zářezu mezi 2. a 3. lalokem (0,7527), zbylé populace (Doutnáč a Paví hora vs. Haknová a Plešivec) se oddělily na základě nejtěsněji korelovaného znaku v23 – délka čepele / délka řapíku (-0,5015). Tato korelace není výrazně těsná v porovnání s korelacemi v tabulce 17, oddělení populací lze tedy chápat spíše jako trend nikoliv jako jasný znak.

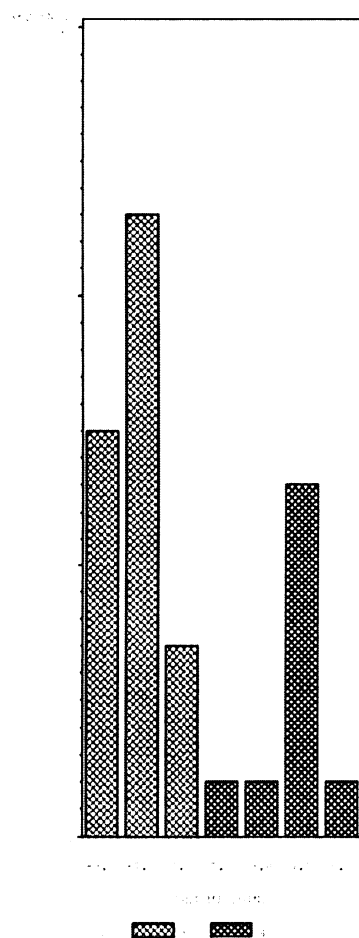
Tab. 19: Kanonické korelační koeficienty analýzy *S. eximia*. Tučně jsou označeny znaky (spolu s odpovídajícími kanonickými korelačními koeficienty) použité v klasifikační analýze.

Kód	Can1	Kód	Can1
v4	0.202985	v18	-0.074354
v5	0.054297	v19	-0.252032
v6	0.462207	v20	0.087242
v7	0.048120	v21	0.106079
<b>v8</b>	<b>0.755762</b>	v22	0.209341
v9	-0.098753	v23	-0.383647
v10	-0.019607	v24	0.143138
v11	0.277527	v25	0.216535
v12	0.131591	v26	-0.124797
v13	0.197034	<b>v27</b>	<b>0.523079</b>
<b>v14</b>	<b>0.619830</b>	<b>v28</b>	<b>0.585470</b>
v15	0.042914	v29	-0.311711
<b>v16</b>	<b>0.651426</b>	v30	-0.378593
v17	0.328333	v31	-0.255807

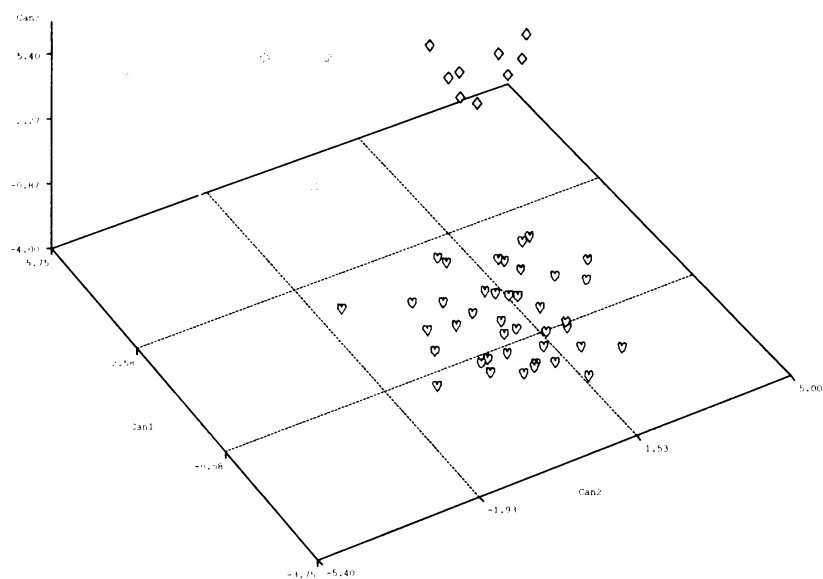
Provedená klasifikační analýza s vybranými znaky (viz tučně označené v tabulce 19; k = 17) určila možnost rozdělení *S. eximia* do dvou skupin s 96,87% pravděpodobností (viz tab. 20). Výsledky potvrzují dřívější domněnky (Jankun et Kovanda 1987), že populace Koda je od zbytku populací *S. eximia* odlišná právě menší hloubkou zářezu laloků listů.

Tab. 20: Klasifikační analýza populací *S. eximia*

Z populace	Zařazeno k populaci		
	Koda	Ostatní populace	Celkem
Koda	45	0	45
	100	0	100
Ostatní populace	2	17	19
	10,53	89,47	100
Chybně určených (%)	0	10,53	3,125

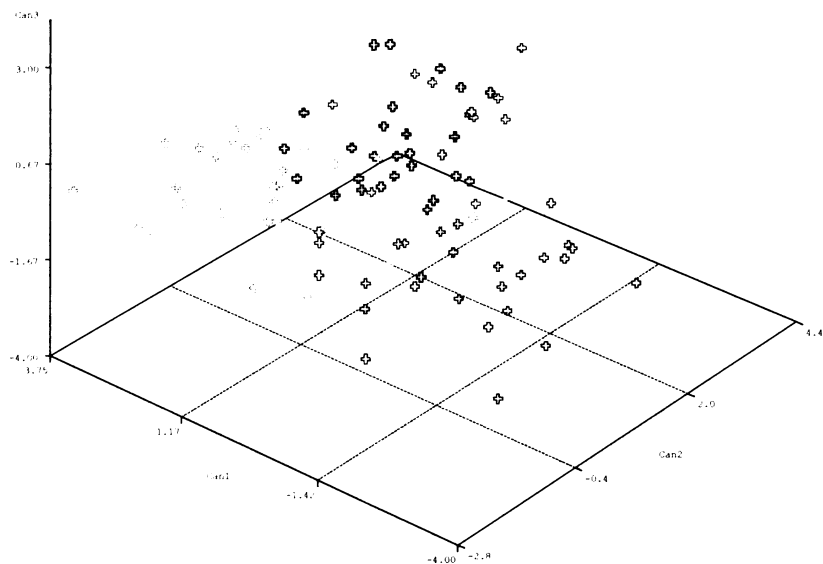


Obr. 41: Kanonická diskriminační analýza *S. eximia* (populace Koda vs. zbývající populace v Českém krasu).



Obr. 42: Grafický výstup z CDA jednotlivých populací *S. eximia* ilustrující oddělení populace Koda (modrá srdce) od ostatních populací (Paví hora a Doutnáč – hnědé kosočtverce, Haknová – žluté listy, Plešivec – fialové kříže).

Při CDA populací *S. bohémica* – další druh s větším počtem populací (obr. 43) – nebylo žádné oddělení určité populace pozorováno.



Obr. 43: Grafický výstup z CDA osmi populací *S. bohémica* – žádná z populací není jasně morfologicky oddělena od ostatních. Populace: Boreč – fialová, Lovoš – modrá, Opárenské údolí – žlutá, Dubice – Výslunní – hnědá, Debus – růžová, Hlinná – zelená, Sebusín – Deblík – červená, Sebusín – Krkavčí skála – černá.

### Vliv fenofází

Vzhledem k tomu, že v analýzách byla využita data z různých fenofází (znaky na květech i na plodech), byly provedeny všechny analýzy jak pro kvetoucí jedince (listy a květy) tak pro plodné rostliny (listy a plody). Cílem bylo nalézt nejvhodnější fenofázi ke sběru jeřábů.

K odlišení *S. sudetica*, *S. quernea*, *S. hardeggenensis* postačují pouze znaky na listech a plodech, jednoznačná determinace ostatních druhů již vyžaduje hodnocení jak kvetoucích, tak plodných exemplářů. Při klasifikační analýze oddělující *S. rhodanthera* a *S. bohémica* od zbytku souboru (viz obr. 38 a tabulka 13) byl zjištěn rapidní pokles správně určených jedinců při použití znaků z listů a plodů (91,45%), z listů a květů (89,81%) a pouze z listů (80,93%) oproti vybraným, s kanonickými osami nejtěsněji korelovaným, znakům z celého souboru (98,36%, viz tabulka 14). Tabulka 21 ukazuje výsledky jednotlivých klasifikačních analýz.

Tab. 21: Porovnání výsledků klasifikačních analýz vybraných znaků dle fenofází. Celkové procento chybně určených jedinců je zobrazeno tučně.

Znaky na listech	Zařazeno k druhu				
	Z druhu	<i>S. rhodanthera</i>	<i>S. bohémica</i>	Ostatní	Celkem
<i>S. rhodanthera</i>	51	2	4	57	89,47
<i>S. bohémica</i>	2	107	2	111	1,8
Ostatní	29	19	88	136	21,32
Chybně určených (%)	10,53	3,6	35,29	<b>19,07</b>	

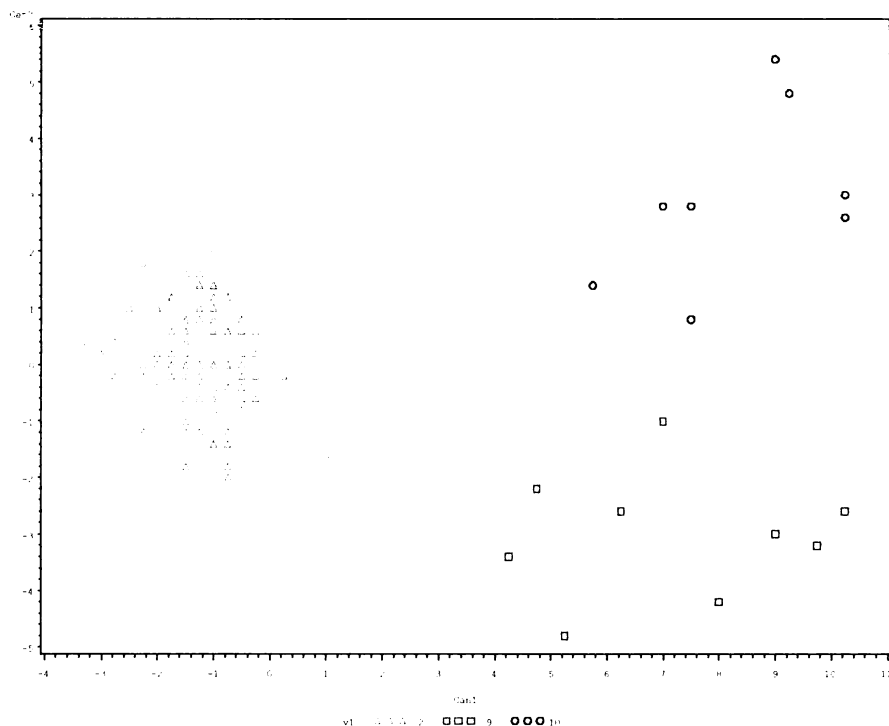
Znaky na listech a květech	Zařazeno k druhu				
	Z druhu	<i>S. rhodanthera</i>	<i>S. bohémica</i>	Ostatní	Celkem
<i>S. rhodanthera</i>	57	0	0	57	100
<i>S. bohémica</i>	1	108	2	111	0,9
Ostatní	1	27	108	136	0,74
Chybně určených (%)	0	2,7	20,59	<b>10,19</b>	

Znaky na listech a plodech	Zařazeno k druhu				
	Z druhu	<i>S. rhodanthera</i>	<i>S. bohémica</i>	Ostatní	Celkem
<i>S. rhodanthera</i>	55	0	2	57	96,49
<i>S. bohémica</i>	1	108	2	111	0,9
Ostatní	17	4	115	136	12,5
Chybně určených (%)	3,51	2,7	15,44	<b>8,55</b>	

### Taxonomicky nejasné populace

Do analýz byly zahrnuty i morfologicky vyhraněné populace Knobloška a Milá, které se vyskytují v Českém středohoří. CDA s geograficky nejbližším *S. bohemica* je zachycena na obr. 44.



Obr. 44: CDA *S. bohemica* (fialové trojúhelníky), a populací Knobloška (modré čtverce) a Milá (černé kruhy). Jednotlivé osy vysvětlují 88,53% a 11,47% variability.

*S. bohemica* je od obou populací oddělen osou Can1, se kterou je nejtěsněji korelovaný znak v13 – délka malvic (0,9279), *S. bohemica* má výrazně kratší malvice. Naopak původně uvažovaný znak v8 – hloubka zářezu mezi 2. a 3. lalokem se neukázal být vhodným znakem k diskriminaci *S. bohemica* od obou populací (-0,1013). Tento znak je ale nejtěsněji korelovaný s osou Can2 (0,7372) a odděluje od sebe vzájemně tyto dvě populace (populace Knobloška má mělčí zářezy laloků).

## **Molekulární analýzy**

### **Metodika**

Vzorky pro molekulární analýzy byly sbírány v roce 2004 a 2005 z předem označených a cytometricky ověřených jedinců. Předchozí výběr jedinců byl prováděn s důrazem na náhodnost sběru, u málo početných populací (pod 5 exemplářů) byli sebráni všichni jedinci. Do studie byly zahrnuty dvě nově objevené populace hybridogenních jeřábů (populace Knobloška a populace Milá). Potenciální rodičovské druhy (pokud se v populaci vyskytovaly) byly taktéž sbírány. *S. chamaemespilus* jako rodičovský druh *S. sudetica* se na území ČR nevyskytuje, byly proto použity sběry z Nízkých Tater (Salatín; Slovensko).

Celková DNA byla izolována z pletiva mladých listů (cca 2 cm<sup>2</sup>) dostatečně vysušených v silikagelu (Penta) za použití standardní metody CTAB dle Doyle et Doyle (1987) s mírnými modifikacemi (Pfosser et al. 2005). DNA byla rozpuštěna v 200 µl 1× TE bufferu, koncentrace byla fotometricky změřena (resp. odhadnuta jako poměr absorbance A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> pomocí Biophotometeru; Eppendorf) naředěna na cca 5 ng/µl pro další použití v PCR reakcích.

Samotná metoda zjišťování polymorfismu mikrosatelitů je analogická klasické PCR (Scribner et Pearce 2000), s tím rozdílem, že u mikrosatelitů se pracuje s kratšími časovými úseky v jednotlivých krocích PCR reakce (oproti klasickým PCR primerům jsou zde amplifikovány o řád kratší fragmenty (asi 100-350bp), takže doba elongace může být velmi krátká; viz dále) Jde o namnožení mikrosatelitového úseku DNA pomocí speciálně vyvinutých primerů. Primery je nutné, vzhledem k jejich značné variabilitě, vyvíjet speciálně pro určitý okruh taxonů. V této práci byly využity mikrosatelitové primery vyvinuté speciálně pro rod *Sorbus* (Oddou-Muratorio et al. 2001, Nelson-Jones et al. 2002) a *Malus* (Gianfranceschi et al. 1998). Seznam primerů a jejich parametry přináší tabulka 22.



Tab. 22: Přehled použitých SSR primerů a jejich základní charakteristiky (sekvence, fluorescenční označení, rozsah velikosti amplifikovaného fragmentu, typ repetitivní sekvence, teplota annealingu). \* - Typ repetitivní sekvence nebyl publikován.

Lokus	Sekvence	Fluor. barva	Rozsah velikosti bp / typ repetitivní sekvence	T annealingu (°C)	Citace
Mss1	ATGTTTCGGTAGTCATCCCCT	6FAM	132-188	55	Oddou-Muratorio et al. 2001
	GCTCAGATAGCCACTCCCC				
Mss5	CCCCAACAAACATTTTCTCC	HEX	112-136	48	Oddou-Muratorio et al. 2001
	CCTCTCGCTCTTTGCCTCT				
CH02D11	AGCGTCCAGAGCAACAGC	NED	102-186	56	Gianfranceschi et al. 1998
	AACAAAAGCAGATCCGTTGC				
CH01H10	TGCAAAGATAGGTAGATATGCCA	HEX	68-120	55	Gianfranceschi et al. 1998
	AGGAGGGATTGTTTGTGCAC				
Mss6	CGAAACTCAAAAACGAAATCAA	HEX	214-294	55	Oddou-Muratorio et al. 2001
	ACGGGAGAGAAACTCAAGACC				
Ms6g	CGGAGGGTGCTGCCGAA	HEX	116-164	49	Nelson-Jones et al. 2002
	GCCAGCCCATATCTGCT				
Ms14	CGCTCACCATCGTAGACGT	6FAM	84-286	48	Nelson-Jones et al. 2002
	ATGCAATGGCTAAGCATA				

Před vlastním zahájením PCR byla testována teoretická možnost použití jednotlivých primerů v multiplexech (více primerů v jedné PCR reakci, díky němuž dojde k úspoře financí i času) pomocí programu Fast PCR (ver. 3.6; Kalendar 2005), který pracuje se sekvencemi jednotlivých primerů a dokáže odhalit případný vznik primerových dimerů. V kombinaci s udávanými velikostmi fragmentů (Oddou-Muratorio et al. 2001, Robertson et al. 2004a, 2004b, Nelson-Jones et al. 2002, A. Robertson, úst. sděl.) a rozdílným fluorescenčním označením byly sestaveny tyto multiplexy: Multi I: Mss1 + Mss6 + CH01H10, případně pouze Mss1 + Mss6 a Multi II: Mss5 + Ms6g. Ostatní primery (Ms14, CH02D11, případně CH01H10) byly použity v samostatné PCR reakci. Úspěšnost amplifikace byla na počátku testována na devíti fluorescenčně neznačených primerech (Invitrogen). Šlo o primery uvedené v tabulce 22 a dále o Mss16 a 1204-05 (Oddou-Muratorio et al. 2001, Nelson-Jones et al. 2002). Následně bylo pro konečnou vizualizaci analýz 7 vybraných, dobře reprodukovatelných primerů při výrobě fluorescenčně označeno (Applied Biosystems).

Byla provedena standardní PCR, modifikovaná dle Robertson et al. (2004a). Jedna PCR mikrozkušavka obsahovala (příprava jako mastermix pro více vzorků):

8,6 µl dd H<sub>2</sub>O

2 µl 10x PCR Buffer Jumpstart (100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>; Sigma)

0,4 µl dNTP (po 0,1 µl dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 10 mmol/µl)

0,25  $\mu\text{l}$  primer FORWARD (25 pmol/ $\mu\text{l}$ )

0,25  $\mu\text{l}$  primer REVERSE (25 pmol/ $\mu\text{l}$ )

0,5  $\mu\text{l}$  (1 unit/ $\mu\text{l}$ ) Polymeráza (Red Taq Jumpstart; Sigma)

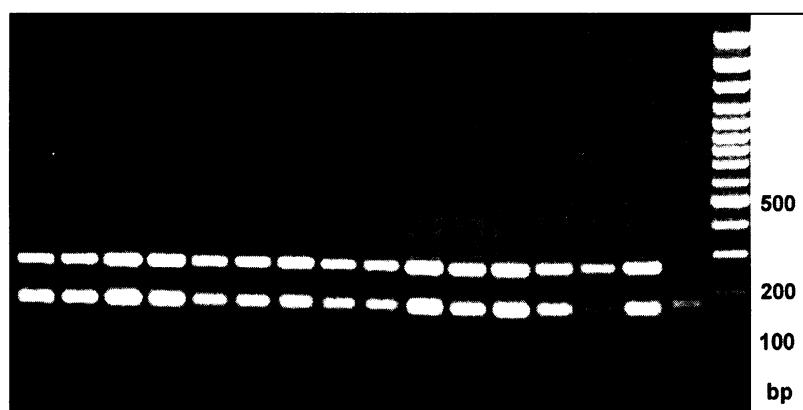
+ přidáno do každé zkumavky 40-50 ng zkoumané DNA (5 ng/ $\mu\text{l}$ )

Celkový objem reakce byl 20  $\mu\text{l}$ .

PCR zkumavky byly vloženy do termocykleru XP Cycler (Bioer) s následujícím programem (tabulka 23):

Počet cyklů	Krok	Teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	Čas
	Iniciální denaturace	94	60 s
35 - 55x	Denaturace	94	30 s
	Annealing	viz tab. 22	45 s
	Elongace	72	45 s
	Závěrečná elongace	72	15 min

Po amplifikaci byly produkty naneseny na 1 – 1,8 % agarosový gel (agarosa; Amresco, 1x TAE pufr) a provedena elektroforéza v 1x TAE pufru při 100 V. Gel byl po vyjmutí z pufru ihned vyfotografován pod UV světlem (systém Kodak Gel Logic 100). Dostatečně amplifikované vzorky (viz např. obr. 45) bylo nutné z produktů přesrážet (odstranění zbytku polymerázy, primerů a dalších nečistot; od každého primeru 1  $\mu\text{l}$  amplifikovaného produktu) pomocí octanu sodného ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) a ethanolu.



Obrázek 45: Zřetelně amplifikované fragmenty pomocí mikrosatelitových primerů Mss1 a Mss6.

Vzhledem k tomu, že délka dinukleotidových mikrosatelitů se může lišit už o pouhé 2 báze, byla závěrečná vizualizace provedena pomocí fluorescenčně značených primerů na sekvenátoru 3100 Avant Genetic Analyzer (Laboratoř sekvenace DNA PŘF UK).

Amplifikované fragmenty byly díky použití tří fluorescenčních barev (viz tabulka 22) sloučeny do dvou běhů fragmentační analýzy: Multi I: Mss1 + Mss6 + CH01H10 + CH02D11 a Multi II: Ms14 + Mss5 + Ms6g. Před nanesením na sekvenátor bylo přidáno 10  $\mu$ l HiDi formamidu a GeneScan-500 ROX size standard (20:1) (Applied Biosystems). Analýza proběhla s použitím polymeru POP-4 ve 36 cm kapiláře. Data získaná ze sekvenátoru byla zpracována v programu GeneMarker Demo (ver. 1.42; SoftGenetics), skórovány byly pouze histogramy se zřetelně „mikrosatelitovým“ pattern (viz obrázek 46). U většiny mikrosatelitových analýz se vyskytují tzv. „stutter bands“, což je žebříček fragmentů, který je oproti primární alele kratší a jehož intenzita směrem k primární alele vzrůstá (Scribner et Pearce 2000). Jsou považovány za následek sklouznutí řetězce nesprávným párováním nukleotidů během replikace DNA, od primární alely se nejčastěji liší mnohem menší intenzitou. Při přítomnosti stutter bands byl skórován jen fragment s nejvyšší intenzitou a největší velikostí. Dalším problematickým bodem při zpracování mikrosatelitového pattern je tzv. +A efekt. Jeho podstatou je přidávání jednoho nukleotidu (nejčastěji dADP) na 5' konec syntetizovaného řetězce během PCR. Vznikají tak fragmenty, které jsou o jednu bázi delší než primární alela, lze je odhalit díky velmi slabé intenzitě. Skórovány byly tedy jen nejintenzivnější fragmenty; málo intenzivní, o jednu bázi delší fragmenty nebyly brány v potaz.

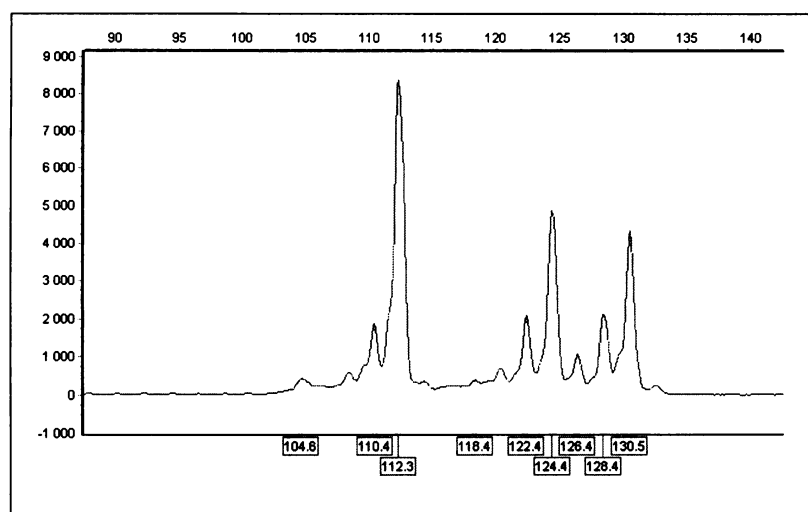
### Analýza dat

Klasická mikrosatelitová data získaná analýzou diploidních organismů lze vyhodnocovat jako kodominantní markery (např. jako allozomy). Většina hybridogenních druhů rodu *Sorbus* je však polyploidních. Zásadní úskalí při vyhodnocení mikrosatelitových markerů u polyploidních organismů nastává ve chvíli určení genotypu jedince, který nelze jednoznačně determinovat (Markwith et al. 2006). Skóruje-li se mikrosatelitový pattern např. u tetraploida, je možné nalézt jednu, dvě, tři nebo čtyři alely v lokusu. Chybějící alely (ty, které chybí do tetraploidního počtu) se překrývají s jinou zobrazovanou alelou. V současné době neexistuje spolehlivý software, který by tuto situaci řešil, např. udával chybějící alely jako chybějící data. Nově publikovaný program TETRASAT (Markwith et al. 2006), určený pro zpracování mikrosatelitových dat polyploidů tuto situaci také neřeší, neboť nedovoluje zadat větší množství dat (více než 10) s chybějícími alelami. Získaná data musela být tedy zpracována jako klasické dominantní markery (AFLP, RFLP). Kodominantní mikrosatelitový pattern byl proto kódován jako „alelické fenotypy“ (Becher et al. 2000), tj. z primární matice délky jednotlivých fragmentů byla vytvořena binární matice (presence/absence jednotlivého



fragmentu) a dále byla analyzována technikami vytvořenými pro dominantní markery. Tento přístup byl již vícekrát využit v obdobných pracích (Becher et al. 2000). Binární matice byla následně zpracována v programu Arlequin ver. 3.01 (Excoffier et al. 2005) procedurou AMOVA (Weir et Cockerham 1984), v programu SYNTAX 2000 (Podani 2001) procedurou PCoA s následnou vizualizací v programu SAS ver. 8e (SAS Institute Inc.) procedurou G3D.

Veškeré výstupy z analýz jsou k dispozici na příloženém CDROMu na internetové stránce <http://botany.natur.cuni.cz/suda/sorbus/>.



Obrázek 46: Skórovatelné mikrosatelitové pattern na histogramu (výstup z programu GeneMarker Demo).

### Identifikace shodných alelických fenotypů

Identifikace shodných fenotypů (= shodných, mnohdy neúplných genotypů, viz výše) byla realizována v programu Arlequin ver. 3.01 (Excoffier et al. 2005). Program prostým porovnáním hledá shodné fenotypy jak v rámci jednoho druhu, tak mezi jednotlivými druhy.

### AMOVA

Analýza molekulární variability (AMOVA) byla provedena pomocí programu Arlequin ver. 3.01 (Excoffier et al. 2005). Primární nastavení programu bylo modifikováno ve smyslu chápání rozdělení analyzovaného souboru na populace („samples“) a skupiny („groups“):

- 1) Pro odhalení mezidruhové a mezipopulační variability byly jako „skupiny“ (*groups*) nastaveny druhy, jako „populace“ (*samples*) byly nastaveny u hybridogenních druhů skutečné populace, u rodičovských druhů celé druhy (kvůli malému počtu vzorků rodičovských druhů z jednotlivých lokalit).

- 2) K odhalení variability mezi skupinami druhů byly jako populace nastaveny jednotlivé druhy a jako skupiny rozdělení na hybridogenní a rodičovské taxony.

Sledován byl fixační index  $F_{ST}$  a procentuální rozdělení variability v jednotlivých skupinách.

#### **Mezidruhové porovnání:**

K mezidruhovému porovnání byly využity hodnoty „*Population pairwise difference*“ kalkulované programem Arlequin ver. 3.01 (Excoffier et al. 2005), které odpovídají vážené  $F_{ST}$  statistice přes všechny lokusy (Weir et Cockerham 1984). Jde o porovnání indexů odlišností (hodnot  $F_{ST}$ ) mezi jednotlivými páry druhů. Jako metoda rozdílnosti je uvažována „*Pairwise difference*“. Statistická významnost genetických rozdílností byla testována permutacemi (3024 permutací) alel mezi druhy.

#### **Vnitropopulační, vnitrodruhová diverzita**

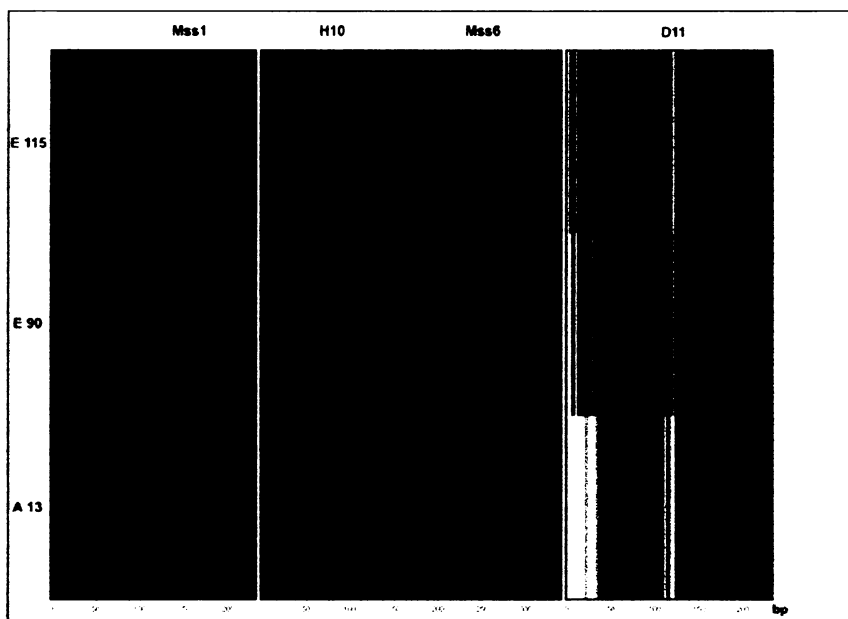
Sledovaným ukazatelem byl celkový počet alel a počet polymorfních mikrosatelitových lokusů. Tyto hodnoty byl odečteny přímo z výsledků fragmetační analýzy jednotlivých druhů, nikoliv z binární matice). Dále byl uvažován „*Average gene diversity over all loci*“ (AGD; Nei 1987), což je pravděpodobnost, že dvě náhodně vybrané homologní alely jsou rozdílné. Jako populace („*samples*“) byly při sledování vnitropopulační diverzity uvažovány jednotlivé populace hybridogenních druhů a celé druhy potenciálních rodičovských druhů. Při sledování vnitrodruhové diverzity byly jako populace („*samples*“) chápány celé druhy.

#### **Analýza hlavních koordinát**

Ze sekundární matice dat (binární data jednotlivých alel) byl vytvořen datový soubor pro program SYNTAX (Podani 2001). V tomto programu byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA) s využitím Jaccardova koeficientu podobnosti bez standardizace. Souřadnice získané z prvních tří os byly vizualizovány procedurou Gplot v programu SAS 8e.

## Výsledky molekulárních analýz

Výstupem z fragmentační analýzy na kapilárním sekvenátoru byly soubory s různými délkami fluorescenčně označených fragmentů (viz obrázek 47). Jednotlivé délky fragmentů však byly odečítány ze skóre fragmentů pomocí programu GeneMarker (ver. 1.42, SoftGenetics). Celková matice všech alel zjištěných fragmentační analýzou je v elektronické příloze IV. Tato matice byla převedena do binární matice, která je součástí elektronické přílohy V.



Obr. 47: Ukázka 4 lokusů u tří vybraných jedinců (výstup z programu GeneMarker). Z ukázky jsou jasně patrné rozdíly mezi druhy (*S. eximia* - stopa E115 a E90 vs. *S. alnifrons* - stopa A13), ale také mezi populacemi *S. eximia* (Haknová – stopa E115 vs. Koda – stopa E90).

### Analýza hlavních koordinát (PCoA)

Výsledek analýzy hlavních koordinát (PCoA) všech vzorků (programem SYNTAX 2000; Podani 2001) vizualizovaný do 3D podoby procedurou G3D a Gplot (v programu SAS, SAS Institute) přibližuje obr. 48. Další analýzy byly provedeny pouze s rodičovskými (obr. 51) a pouze s hybridogenními druhy (obr. 52). V následujících obrázcích jsou použity následující symboly pro jednotlivé druhy jeřábů:

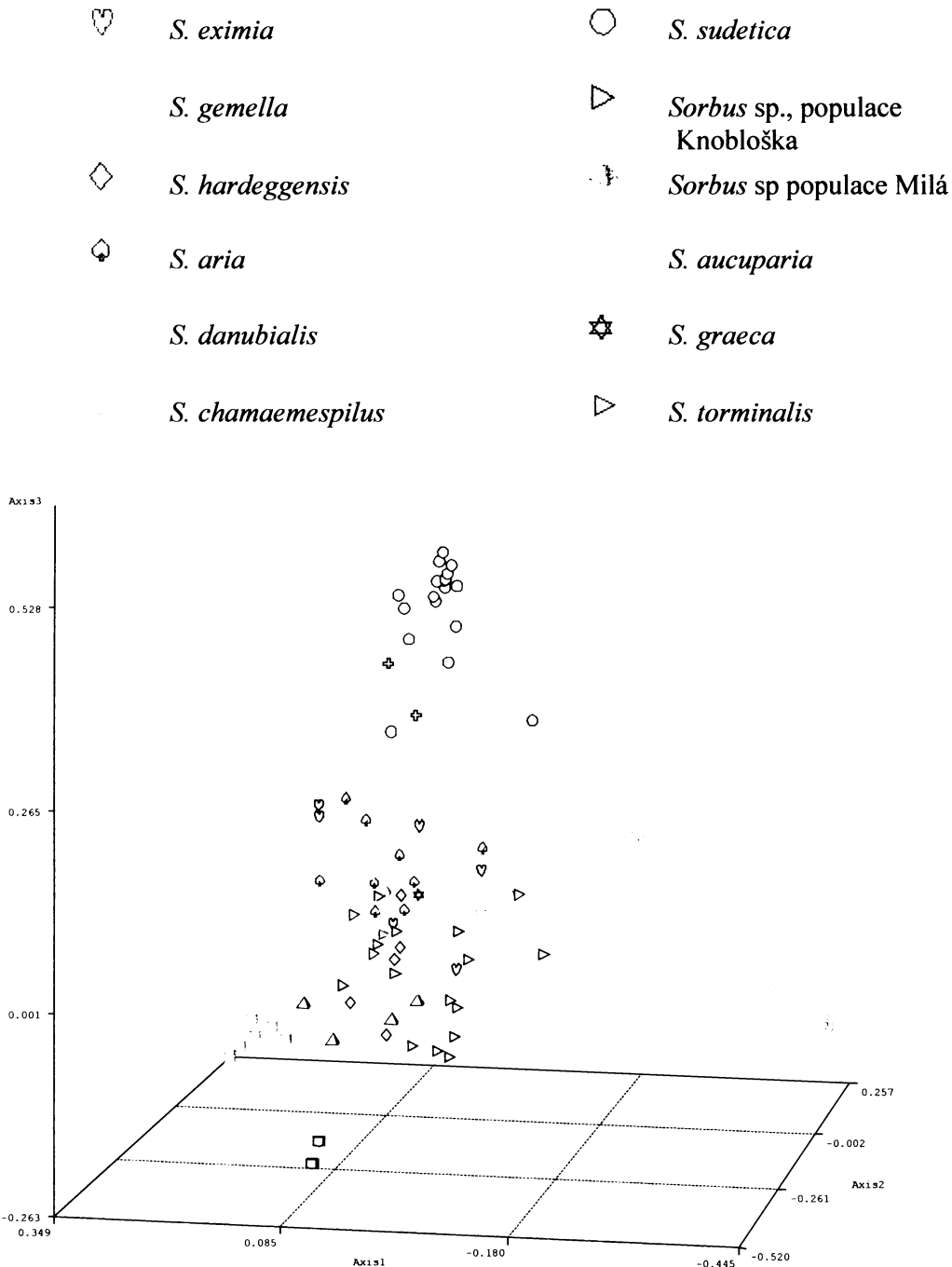
*S. alnifrons*

*S. quernea*

*S. bohemica*



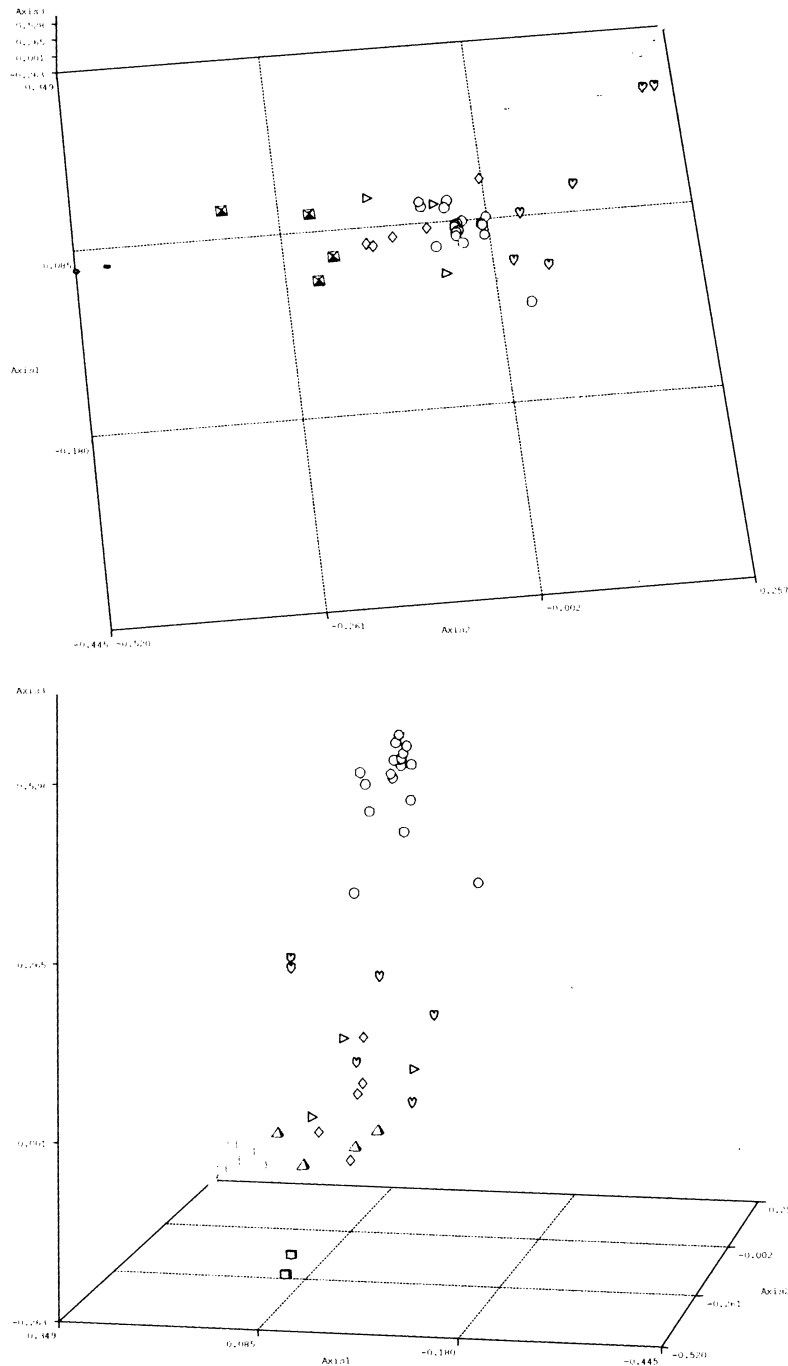
*S. rhodanthera*



Obr. 48: Grafický výstup z PCoA všech vzorků hybridogenních a rodičovských druhů. Jednotlivé osy vysvětlují 12,85%, 10,09% a 9,72% variability.

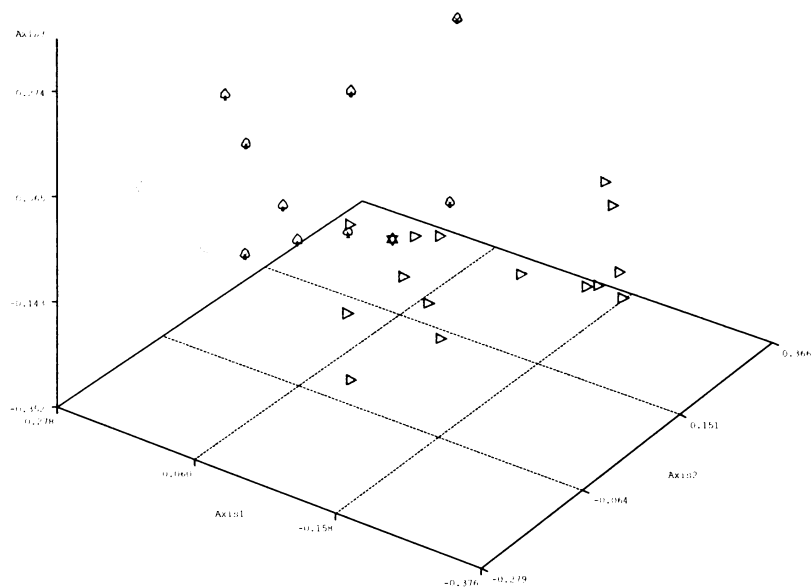
V této analýze se jasně vyzemily některé hybridogenní druhy (např. *S. rhodanthera*, *S. alnifrons*, *S. sudetica*, *S. quernea*) oproti předpokládaným rodičovským druhům (shluk uprostřed – *S. aria*, *S. aucuparia*, *S. danubialis*, *S. graeca*, *S. chamaemespilus*, *S. torminalis*). Poměr pozice rodičovských a hybridogenních druhů je však překvapující neboť bylo očekáváno, že rodičovské druhy budou rozmístěny v extrémních polohách grafu a mezi nimi, budou ležet hybridogenní druhy. Při vypuštění rodičovských druhů ze zobrazení v programu

SAS (obr. 49-52) je zřejmé, že jednotlivé hybridogenní druhy jsou od sebe odděleny a tvoří samostatné shluky, tj. mezidruhová variabilita převažuje nad variabilitou vnitrodruhovou. Výraznější vnitrodruhovou variabilitu vykazuje pouze *S. eximia*, *S. sudetica* a *S. bohémica* (viz dále).

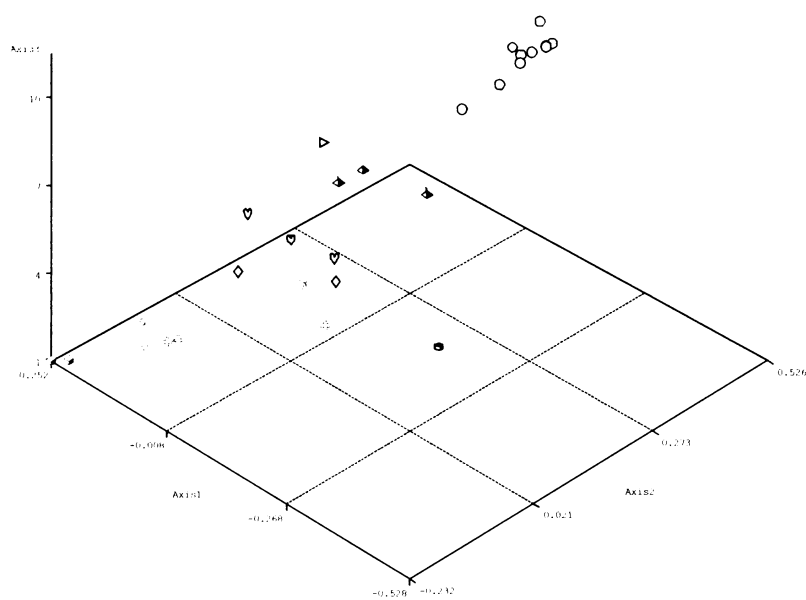


Obr. 49 a 50: Grafický výstup z PCoA hybridogenních a rodičovských druhů jeřábů (bez zobrazení rodičovských druhů). Jednotlivé osy vysvětlují 16,51%, 13% a 12,11% variability.





Obr. 51: Grafický výstup z PCoA potenciálních rodičovských druhů. Jednotlivé osy vysvětlují 8,44%, 7,47% a 5,52% variability.



Obr. 52: Grafický výstup z PCoA hybridogenních druhů. Jednotlivé osy vysvětlují 16,51%, 13% a 12,11% variability.

Dále byla provedena analýzy hlavních koordinát rodičovských druhů (obrázek 51) V porovnání s poslední analýzou pouze hybridogenních druhů (obrázek 52) lze ilustrovat vyšší vnitrodruhovou variabilitu nalezenou u rodičovských druhů. Oproti rodičovským druhům jsou shluky jednotlivých hybridogenních druhů výrazně kompaktnější, jedinci se nezřídka překrývají (sdílejí stejné alely, např. *S. alnifrons*, *S. rhodanthera*).

### Identické alelické fenotypy

Prvním výsledkem analýzy dat v programu Arlequin ver. 3.01 (Excoffier et al. 2005) byla analýza společných fenotypů (celkové sady alel jedince). Ve vstupním souboru dat byly nalezeny sdílené fenotypy pouze mezi jedinci téhož druhu, nikoliv mezi jedinci různých druhů ani mezi hybridogenní a sexuální skupinou (viz elektronická příloha VI). Bylo nalezeno velmi málo unikátních alel rodičovských druhů sdílených s hybridogenními. Nalezeny byly pouze u *S. querneae* (např. shodný fragment se *S. aucuparia* 116 u lokusu CH02D11; fragment 102 u lokusu CH01H10 shodný se *S. aria*) a *S. sudetica* (např. shodný fragment se *S. chamaemespilus* 218 a 284 u lokusu Ms14, 136 u lokusu Mss5, 156 a 162 u lokusu Ms6g). U *S. torminalis* byla nalezena jediná unikátní alela společná se *S. bohemica* a *S. rhodanthera* (fragment 118 u lokusu Ms6g).

### AMOVA

Výsledek analýzy molekulární variability populací jednotlivých druhů (AMOVA) uvádí tabulka 24:

Tab. 24: Výstup analýzy AMOVA z programu Arlequin pro porovnání populací jednotlivých druhů r. *Sorbus*.

Zdroj variability	d. f.	Suma čtverců	Varianční komponenty	Procento variability
Mezi druhy	15	481,734	2,32066 va	57,00
Mezi populacemi uvnitř druhů	18	56,987	0,43945 vb	10,79
Uvnitř populací	165	216,304	1,31093 vc	32,20
Celkem	198	755,025	4,07103	
F <sub>ST</sub> : 0,67799				

Jako „skupiny“ (*groups*) byly ve vstupním souboru nastaveny druhy jeřábů, jako „populace“ (*samples*) u hybridogenních druhů jejich skutečné populace, u rodičovských druhů byly všichni jedinci zahrnuti do jediné společné populace. Z hodnot můžeme odvozovat, že na celkové variabilitě se variabilita mezi jednotlivými druhy podílí nejvíce (57%), variabilita populací v rámci jednotlivých druhů je nízká (10,79%) a variabilita uvnitř jednotlivých populací je středně vysoká (32,20%). Podobnost mezi jedinci v rámci populací vzhledem

k ostatním jedincům v celém souboru ( $F_{ST}$ ) = 0,67799 ( $p = 0,0000$ ).  $F_{CT}$  (míra podobnosti mezi vzorky v rámci druhu vzhledem k vzorkům z celého souboru) je 0,56481 ( $p = 0,0000$ ).

O úroveň výše, tj. jako „populace“ budeme chápat druhy a jako „skupiny“ rozdělení na hybridogenní a rodičovské druhy. Výsledky zachycuje tabulka 25.

Tab. 25: Výstup analýzy AMOVA z programu Arlequin pro porovnání druhů

Zdroj variability	d. f.	Suma čtverců	Varianční componenty	Procento variability
Mezi skupinami	1	17,075	- 0,29871 va	-7,69
Mezi druhy v rámci skupin	14	464,659	2,69403 vb	69,28
Uvnitř druhů	183	273,291	1,49339 vc	38,40
Celkem	198	755,025	3,88871	
$F_{ST} : 0,61597$				

Nejvyšší variabilita byla nalezena mezi druhy (69,28%) v rámci definovaných skupin (hybridogenní vs. sexuální druhy), nižší uvnitř druhů (38,40%). Podobnost mezi druhy v rámci skupin relativně ke všem vzorkům ( $F_{ST} = 0,61597$ ,  $p = 0,0000$ ;  $F_{CT} = -0,07681$ ,  $p = 0,9888$ ) je mírně nižší než  $F_{ST}$  mezi populacemi (tj. je větší podobnost (korelace) mezi jedinci v rámci populací vzhledem k ostatním jedincům v celém souboru než podobnost jedinců všech v druhu vzhledem k ostatním jedincům v celém souboru.  $F_{CT}$  zde představuje podobnost v rámci skupin (hybridogenní vs. rodičovské) vzhledem k celému souboru, je však statisticky neprůkazné.

Zajímavé výsledky poskytuje mezidruhové porovnání (jako „populace“ jsou zde chápány jednotlivé druhy, jako dvě „skupiny“ jsou chápány hybridogenní a sexuální druhy) genetické rozdílnosti. Při „Porovnání párů populačních vzorků“ (*Comparisons of pairs of population samples*; jako populace jsou zde druhy!) dostáváme matici rozdílností mezi jednotlivými druhy (*Population Pairwise difference*; odpovídá vážené  $F_{ST}$  statistice přes všechny lokusy; Weir & Cockerham 1984). Tato data je možné použít k rekonstrukci potenciálních rodičovských druhů. Výsledek ukazuje tabulka 26, shrnutím nejpodobnějších druhů tabulka 27 a statistická průkaznost jednotlivých párových porovnání ( $\alpha = 0,05$ ; viz elektronická příloha VII). U většiny hybridogenních druhů ve vztahu k rodičovským vyšel výsledek průkazný (kromě *S. graeca*, kde byl k dispozici jen jeden exemplář). V porovnání s literárně uváděnými rodičovskými kombinacemi zde byly zjištěny mírné rozpory:

- 1) *S. aria* jako nejbližší rodičovský druh místo uváděného *S. danubialis* u *S. alnifrons*, *S. bohémica* a *S. gemella*.
- 2) *S. danubialis* jako rodičovský druh u *S. hardeggensis*, místo uváděného *S. aria*

- 3) Absence *S. aucuparia* mezi třemi nejbližšími rodičovskými druhy u *S. querneae* (*S. aucuparia* je až čtvrtý v pořadí).

Zjištěna byla značná blízkost *S. aria* a *S. danubialis*, což by mohlo vysvětlovat první a druhý rozpor uvedený výše (*S. danubialis* je u druhů, uváděných v bodě 1 a 2, třetí v pořadí podobnosti, rozdíl mezi blízkostí *S. aria* a *S. danubialis* je u těchto druhů velmi malý).

Tab. 26. Hodnoty vážené  $F_{ST}$  statistiky přes všechny lokusy mezi jednotlivými dvojicemi druhů rodu *Sorbus*, matice vypočítána jako *Number of pairwise difference* v programu Arlequin 3.01. Hodnoty označené hvězdičkou byly na hladině  $\alpha = 0.05$  statisticky nepřekážné.

	<i>S. alnifrons</i>	<i>S. bohemica</i>	<i>S. eximia</i>	<i>S. gemella</i>	<i>S. hardwegensis</i>	<i>S. querneae</i>	<i>S. rhodanthaera</i>	<i>S. sudetica</i>	pop. Knobloška	pop. Milá	<i>S. aria</i>	<i>S. aucuparia</i>	<i>S. danubialis</i>	<i>S. graeca</i>	<i>S. chamaemesp.</i>	<i>S. torminalis</i>
<i>S. alnifrons</i>	0															
<i>S. bohemica</i>	0.91446	0														
<i>S. eximia</i>	0.80736	0.80568	0													
<i>S. gemella</i>	0.81314	0.84303	0.69537	0												
<i>S. hardwegensis</i>	0.78943	0.78549	0.5702	0.57438	0											
<i>S. querneae</i>	0.7457	0.83119	0.7246	0.63602	0.55624	0										
<i>S. rhodanthaera</i>	0.95384	0.92097	0.8013	0.83513	0.7926	0.84131	0									
<i>S. sudetica</i>	0.87812	0.74578	0.69476	0.78189	0.68549	0.77138	0.87572	0								
pop. Knobloška	0.81128	0.76891	0.53525	0.45662	0.2429	0.59927	0.80143	0.66541	0							
pop. Milá	0.75479	0.82581	0.60982	0.54389	0.34407	0.6168	0.7111	0.6625	0.18149*	0						
<i>S. aria</i>	0.52201	0.64057	0.38618	0.38757	0.19401	0.37886	0.58196	0.44983	0.05957*	0.2459	0					
<i>S. aucuparia</i>	0.78657	0.79607	0.53313	0.52998	0.32075	0.51412	0.74927	0.63901	0.24635	0.40913	0.17887	0				
<i>S. danubialis</i>	0.60771	0.6579	0.48662	0.39468	0.14943	0.44779	0.57671	0.53398	0.00377*	0.22699	-0.0048	0.22096	0			
<i>S. gemella</i>	0.95070*	0.89923*	0.71720*	0.75887*	0.43182*	0.63456*	0.98675*	0.76518*	0.41935*	0.59048*	-0.07471*	0.25397*	0.14286*	0		
<i>S. chamaemespilus</i>	0.92033	0.84099	0.57814	0.70689	0.42918	0.69529	0.9336	0.42524	0.21918*	0.39735	0.09683*	0.29139	0.20715*	0.44000*	0	
<i>S. torminalis</i>	0.4968	0.55024	0.39181	0.31526	0.15026	0.41179	0.52536	0.5231	0.00594*	0.21722	0.11266	0.25956	0.09112	0.24898	0.28737*	0

Tab. 27: Vybrané hybridogenní druhy + *S. aria*, druhy k nim nejpodobnější a hodnota této rozdílnosti (*Number of pairwise difference*).

Label	Jméno druhu	1. nejvyšší podobnost	Rozdílnost	2. nejvyšší podobnost	Rozdílnost	3. nejvyšší podobnost	Rozdílnost	Udávaná rodičovská kombinace
1	<i>S. alnifrons</i>	<i>S. torminalis</i>	0.4968	<i>S. aria</i>	0.52201	<i>S. danubialis</i>	0.60771	<i>S. danubialis</i> × <i>S. torminalis</i>
2	<i>S. bohemica</i>	<i>S. torminalis</i>	0.5024	<i>S. aria</i>	0.64057	<i>S. danubialis</i>	0.6579	<i>S. danubialis</i> × <i>S. torminalis</i>
3	<i>S. eximia</i>	<i>S. aria</i>	0.38618	<i>S. torminalis</i>	0.39181	<i>S. danubialis</i>	0.48662	<i>S. aria</i> × <i>S. torminalis</i>
4	<i>S. gemella</i>	<i>S. torminalis</i>	0.31526	<i>S. aria</i>	0.38757	<i>S. danubialis</i>	0.39468	<i>S. danubialis</i> × <i>S. torminalis</i>
5	<i>S. hardwegensis</i>	<i>S. danubialis</i>	0.14943	<i>S. torminalis</i>	0.15026	<i>S. aria</i>	0.19401	<i>S. aria</i> × <i>S. torminalis</i>
6	<i>S. querneae</i>	<i>S. aria</i>	0.37886	<i>S. torminalis</i>	0.41179	<i>S. danubialis</i>	0.44779	<i>S. aria</i> × <i>S. aucuparia</i>
7	<i>S. rhodanthaera</i>	<i>S. torminalis</i>	0.52536	<i>S. danubialis</i>	0.57671	<i>S. aria</i>	0.58196	<i>S. danubialis</i> × <i>S. torminalis</i>
8	<i>S. sudetica</i>	<i>S. aria</i>	0.44983	<i>S. chamaemespilus</i>	0.5231	<i>S. torminalis</i>	0.5231	<i>S. aria</i> × <i>S. chamaemespilus</i>
9	„Knobloška“	<i>S. danubialis</i>	0.00377*	<i>S. torminalis</i>	0.00594*	<i>S. aria</i>	0.05957*	
10	„Milá“	<i>S. torminalis</i>	0.21722	<i>S. danubialis</i>	0.22699	<i>S. aria</i>	0.2459	
11	<i>S. aria</i>	<i>S. danubialis</i>	-0.0048					

Variabilita v rámci populací:

Sledovaným ukazatelem byl počet polymorfních lokusů (byly uvažovány skutečné mikrosatelitové lokusy a nikoliv polymorfie v binární matici) a „Average gene diversity“ (AGD; Nei 1987). U většiny hybridogenních populací (viz tabulka 28) tato hodnota vyšla velmi nízká (0,01), často tedy o řád nižší v porovnání s rodičovskými druhy. Zvýšená hodnota u některých populací hybridogenních druhů (např. u lokality Hlinná (*S. bohémica*) a Plešivec (*S. eximia*)) je způsobena malým počtem exemplářů z populací ve vztahu k počtu nalezených polymorfních míst. Problematickými jsou dvě populace *S. hardeggensis* a *S. sudetica*. Překvapivé jsou nízké hodnoty AGD u *S. torminalis*. Počet polymorfních lokusů je u většiny populací hybridogenních druhů velmi nízký, naopak u rodičovských druhů je vysoký (viz tabulka 28).

Tab. 28: Vnitropopulační variabilita hybridogenních druhů v porovnání s rodičovskými druhy. N – počet jedinců, Celkový počet alel – počet alel, které byly skórovány, AGD - pravděpodobnost, že dvě náhodně vybrané homologní alely jsou rozdílné, S.E. standardní chyba AGD.

Druh	Populace	N	Celkový počet alel	Počet polymorfních lokusů	Average gene diversity	S.E
<i>S. alnifrons</i>	Templštejn	20	13	3	0.005335	0.005828
<i>S. bohémica</i>	Boreč	11	15	2	0.005978	0.006519
	Lovoš	11	13	1	0.002491	0.003917
	Opárno	3	13	0	0.005291	0.006599
	Výsluní	3	13	0	0	0
	Debus	4	13	0	0	0
	Hlinná	2	7	1	0.027397	0.033555
	Deblík	6	13	1	0	0
	Krkavčí skála	5	13	1	0	0
<i>S. eximia</i>	Koda	12	11	1	0.002405	0.003011
	Plešivec	2	11	2	0.041096	0.047453
	Haknová	5	10	0	0	0
	Paví hora	3	10	0	0	0
<i>S. gemella</i>	Konětopy	10	16	3	0.017989	0.012184
<i>S. hardeggensis</i>	Ledové sluje	3	16	5	0.058201	0.046795
	Hardegská stráž	2	11	3	0.047619	0.051434
<i>S. quemea</i>	Jabloňka	7	16	4	0.031746	0.020654
	Bílá skála	5	16	3	0.031746	0.02226
<i>S. rhodanthera</i>	Manětín	15	12	1	0.001058	0.001867
<i>S. sudetica</i>	Vápenná	4	20	2	0.029101	0.022113
	Žulová	3	17	2	0.021164	0.018995
	Návorská jáma	5	21	2	0.010959	0.010913
	Schustlerova jáma	2	20	5	0.039683	0.04347
	Čertova zahrádka	3	21	5	0.042328	0.034919
	Čertova rokle	2	20	4	0.087302	0.091184
	Pec p. Sněžkou	1	16	0	0	0
	Zlaté návrší	1	14	0	0	0
Knobloška	Knobloška	3	16	3	0.047619	0.038881
Milá	Milá	7	14	3	0.032502	0.021081
<i>S. aria</i>		9	54	7	0.145503	0.080982
<i>S. aucuparia</i>		5	33	7	0.125397	0.07914
<i>S. danubialis</i>		8	34	7	0.105442	0.060561
<i>S. graeca</i>		1	15	0	0	0
<i>S. chamaemespilus</i>		2	20	5	0.079365	0.083239
<i>S. torminalis</i>		15	43	7	0.097657	0.052417

Variabilita v rámci druhů:

Při porovnání celých druhů jsou brány v potaz všechny populace daného druhu dohromady (jako „populace“ je zde brán druh). Opět zde nalézáme (viz tabulka 29) zvýšené hodnoty AGD u *S. hardeggensis* v porovnání s jednotlivými populacemi, u *S. sudetica* je AGD oproti jeho extrémním populacím snížena.

Tab. 29: Mezdruhová variabilita hybridogenních a rodičovských druhů. N – počet jedinců, Celkový počet alel – počet alel, které byly skórovány, AGD - pravděpodobnost, že dvě náhodně vybrané homologní alely jsou rozdílné.

Druh	N	Celkový počet alel	Počet polymorfních lokusů	Average gene diversity	S.E
<i>S. alnifrons</i>	20	13	3	0.005335	0.005828
<i>S. bohémica</i>	11	18	3	0.010184	0.008529
<i>S. eximia</i>	12	17	6	0.041469	0.023263
<i>S. gemella</i>	10	16	3	0.017989	0.012184
<i>S. hardeggensis</i>	3	19	5	0.063492	0.041594
<i>S. quemea</i>	7	18	6	0.033911	0.020343
<i>S. rhodanthera</i>	15	12	1	0.001058	0.001867
<i>S. sudetica</i>	4	35	6	0.040058	0.022673
„Knobloška“	3	16	3	0.047619	0.038881
„Milá“	7	14	3	0.032502	0.021081
<i>S. aria</i>	9	54	7	0.145503	0.080982
<i>S. aucuparia</i>	5	33	7	0.125397	0.07914
<i>S. danubialis</i>	8	34	7	0.105442	0.060561
<i>S. graeca</i>	1	15	0	0	0
<i>S. chamaemespilus</i>	2	20	5	0.079365	0.083239
<i>S. torminalis</i>	15	43	7	0.097657	0.052417

Populace jednotlivých hybridogenních druhů vykazovaly většinou nízký počet polymorfních lokusů, avšak vzhledem k mezipopulační variabilitě byl počet polymorfních lokusů pro celý druh vyšší (např. u *S. bohémica*, *S. eximia* a *S. quemea*). Naopak u *S. sudetica* a *S. hardeggensis* byl již počet polymorfních lokusů v populacích vysoký, v rámci celého druhu se tedy již nezvýšil. Výrazně vysoký počet polymorfních lokusů byl nalezen u rodičovských druhů, u kterých byl polymorfni každý z analyzovaných sedmi lokusů. Výjimkou byly *S. graeca* a *S. chamaemespilus*, u kterých byl k dispozici omezený počet exemplářů.

## Diskuse

Práce si kladla za cíl zhodnotit variabilitu endemických zástupců rodu *Sorbus* v České republice z různých hledisek (karyologická, morfologická, molekulární variabilita) pomocí metod, které současná biosystematika nabízí a které dříve nebyly k dispozici (průtoková cytometrie, molekulární markery, mnohorozměrné statistické přístupy). Na základě získaných údajů bylo snahou zjistit podrobnosti o evoluční historii, probíhajících mikroevolučních procesech. Výstupy ze studie mohou být použity k taxonomické revizi, případně k aplikaci v ochranářské praxi.

V předkládané práci byla využita perspektivní metoda průtokové cytometrie, která je vhodná k hodnocení karyologicky obtížně hodnotitelných taxonů a umožňuje zpracovat velké množství materiálu za relativně krátkou dobu (Doležel 1997). Součástí cytometrických analýz bylo i ověření vybraných jedinců karyologicky, což zvyšuje věrohodnost studie oproti studiím předchozím.

V porovnání s literárními údaji (Jankun et Kovanda 1988, Kovanda 1996a ) byly nalezeny výrazné rozpory ve stupni ploidie hybridogenních taxonů *S. eximia*, *S. gemella* a *S. rhodantha*. Důvodem nesrovnalostí může být fakt, že autoři prováděli stanovení ploidie v rámci embryologických pozorování (při stanovování chromozómových počtů zárodečných vaků a embryí). Zvláště embrya jsou co se týče ploidie velmi problematická část rostliny, což ilustrují výsledky studia reprodukčních systémů. Pozorovaná variabilita v ploidii embryí (i v rámci jednoho květenství nalezena jak triploidní, tak pentaploidní embrya) jasně ukazuje, že se nelze na takto získaná data úplně spolehnout a nelze je kriticky aplikovat na ploidii celé rostliny bez ověření počtů chromozómů z jiných pletiv, případně jinou metodou (např. srovnání výsledků z průtokové cytometrie a karyologických analýz). Provedené analýzy ploidie jsou v případě této práce věrohodnější, neboť postihují reálnou situaci u dospělých jedinců, byly zjištěny na reprezentativním vzorku jedinců a data byla vícestupňově prověřena (karyologicky, cytometrické analýzy). Tento metodický postup je v současné době již standardem (viz např. Šingliarová 2005). Poprvé byla determinována DNA ploidie u tří druhů – *S. alnifrons*, *S. hardeggensis* a *S. quernea*. U *S. hardeggensis* byla zjištěna diploidní DNA ploidie, což je v rámci hybridogenních jeřábů unikum, nepočítáme-li primární hybridy a pochybný údaj „diploidního“ *S. eximia*. Vystává tedy otázka, nakolik je *S. hardeggensis* hybridogenním taxonem (viz dále). Vnitropopulační variabilita ve stupni ploidie nebyla nalezena. Dříve udávané rozdíly v ploidii u *S. eximia* (diploidní populace Koda, ostatní populace v Českém krasu tetraploidní; Jankun et Kovanda 1988) nebyla potvrzena a všechny



populace byly shledány triploidními. Ačkoliv byli cytometricky prověřeni všichni nalezení jedinci jeřábů v populaci Koda (včetně potenciálních rodičovských druhů *S. aria* a *S. danubialis*), nebyl nalezen žádný diploidní exemplář. Třebaže výsledky morfometrické části jasně ukázaly, že populace Koda se liší od ostatních populací *S. eximia* výrazně menší hloubkou zářezů mezi laloky listů (fenotypově připomínající přechodný typ mezi *S. eximia* a *S. aria*), nelze vzhledem k výsledkům studia ploidie vysvětlovat sporné závěry studie Jankuna a Kovandy (1988) (záměnou materiálu mírně laločnatého *S. eximia* se *S. aria* s celokrajnými listy).

Hybridogenní zástupci rodu *Sorbus* jsou v zahraničí udáváni převážně jako tetraploidi, prokázaných triploidních druhů je jen několik (Aldasoro et al. 1998, Kutzelnigg et Silbereisen 1994). Je tedy velmi pozoruhodné, že u pěti z šesti hybridogenních jeřábů rodičovské kombinace *S. aria* s. lat.  $\times$  *S. torminalis* byla prokázána triploidní úroveň.

Zcela zásadní výsledky přineslo studium DNA ploidie u *S. aria* a *S. danubialis*. Tyto taxony jsou udávány jako diploidní (Warburg et Kárpáti 1968, Kutzelnigg et Silbereisen 1994), výjimečně je jako tetraploidní uváděn *S. aria* (ve Španělsku; Aldasoro et al. 1998). V rámci výzkumu však byli nalezeni pouze tetraploidní jedinci *S. danubialis* (ověřeno i karyologicky) a diploidní a tetraploidní jedinci *S. aria* (karyologicky ověřeny pouze tetraploidní cytotypy). Diploidní cytotyp *S. aria* byl nalezen pouze v Podyjí, je tedy možná existence určité geografické diferenciaci jednotlivých cytotypů v rámci České republiky. V Podyjí je však situace velice nepřehledná, komplex *S. aria* s. lat je zde velmi složitý (kvůli recentnímu výskytu *S. aria*, *S. graeca*, *S. danubialis*), těmto rodičovským druhům jsou dále morfologicky velmi podobné hybridogenní druhy (ze skupiny *S. hybrida*, které však nejsou morfologicky blízké *S. hardeggensis*) *S. austriaca* a *S. carpatica*. Nalezené ploidie druhů *S. aria* a *S. danubialis* nevyvracejí domněnku o vzniku triploidních a tetraploidních hybridogenních druhů zpětnou hybridizací s jedním z rodičovských druhů (Challice et Kovanda 1978, Jankun et Kovanda 1987, 1988). Vzniklý primární hybrid (*S. torminalis*  $\times$  *S. aria*, *S. danubialis*) teoreticky mohl být triploidní, přičemž (pokud si zachoval částečně sexualitu nebo alespoň fertilní pyl) mohl zpětně hybridizovat se *S. aria* / *S. danubialis* a mohl tak vzniknout triploidní ustálený hybrid.

Všechny studované druhy jeřábů je možné považovat za hybridogenní taxony (oproti hybridním jeřábům mají početně bohaté, morfologicky homogenní populace, které tvoří plody s vyvinutými semeny, jsou nezávislé na rodičovských druzích; Kovanda 1961a, 1999). *S. hardeggensis* je diploidní a vykazuje v rámci nalezených sedmi jedinců (dvě populace) výraznou vnitropopulační i mezipopulační variabilitu jak morfometrickou, tak molekulární.

Příslušnost jednotlivých exemplářů k *S. hardeggensis* byla ověřena na základě konzultace s pracovníky NP Podyjí a porovnáním s typovými položkami (WU). Vezme-li se v potaz nízká denzita jedinců, můžeme se domnívat, že *S. hardeggensis* bude bližší k hybridním než k hybridogenním taxonům. Vzhledem k výsledkům lze uvažovat tři možnosti vzniku *S. hardeggensis*: 1. - taxon je velmi mladý, k hybridizaci rodičovských druhů došlo v nedávné době, 2. - jde o pozůstatky dříve hojněji rozšířeného, polytopně vzniklého taxonu, 3 – jde o hybridogenní taxon, který si zachoval schopnost sexuální reprodukce. Pro první z možností hovoří zvláště ploidní úroveň, vysoká vnitrodruhová a vnitropopulační genetická variabilita, avšak tuto teorii narušuje tvorba semen (experimentálním výsevem bylo získáno životaschopné potomstvo; J. Kučera, úst. sděl.). Druhou možnost podporuje vysoká mezipopulační genetická variabilita (vyšší než jednotlivé vnitropopulační variability) a nízká denzita jedinců. Je možné, že dříve byl *S. hardeggensis* v Podyjí mnohem hojnější, v tomto případě si lze nalezenou genetickou variabilitu vysvětlit buď jako polytopní vznik nebo mohla vzniknout mutace u více jedinců, kteří se zachovali. Ke třetí variantě přispívá diploidní úroveň a tudíž predispozice k sexuální reprodukci, vysoká vnitrodruhová a vnitropopulační genetická variabilita, navíc jedinci vzniklí z experimentálního výsevu štěpí (J. Kučera, úst. sděl.).

Analýza reprodukčních způsobů je jedna z nejnovějších metod používaných v průtokové cytometrii (Matzk et al. 2000). Dovoluje porovnat poměr ploidní úrovně embrya a endospermu a odhalit tak možnou variabilitu ve vznikajícím potomstvu. Tato metoda vnáší nový pohled do studia reprodukčních mechanismů rostlin – umožňuje studovat potenciálně vznikající potomstvo, tj. potomstvo které reálně vzniká v semenech, přičemž ne všechny typy takto vzniklých potomků lze nalézt v podobě semenáčů či vzrostlých jedinců (dovoluje odhalit například potenciální selekci). Cytometrické studium reprodukčních způsobů přineslo pozoruhodné výsledky.

U *S. eximia*, *S. alnifrons* a *S. gemella* byla nalezena nejen očekávaná triploidní embrya, ale také embrya pentaploidní. Možností vzniku pentaploidního embrya je více – triploidní hybridogenní jedinec může teoreticky tvořit haploidní, diploidní i triploidní gamety. S ohledem na pentaploidní úroveň embrya přichází v úvahu několik forem zbytkové sexuality – 1. - oplození haploidní samičí gamety neredukovaným tetraploidním pylem (pyl tetraploidních *S. danubialis* / *S. aria*), 2. - oplození diploidní samičí gamety triploidním pylem (zřejmě neredukovaný pyl hybridogenního taxonu), 3. - oplození triploidní samičí gamety diploidním pylem (buď z hybridogenního taxonu nebo pravděpodobněji z tetraploidních *S. danubialis* / *S. aria*). Vzhledem k současné přítomnosti 3x a 5x embryí se tato varianta jeví

jako nejvíce realistická (3x embrya – autonomní vznik bez účasti otcovské rostliny, 5x embrya – za účasti 2x pylu). Pravděpodobnosti vzniku funkčního redukovaného / neredukovaného pylu jsou u agamospermických druhů velmi malé (avšak z evolučního hlediska mohou být dostatečné). U rodu *Sorbus* odhadoval životaschopnost pylu hybridogenních taxonů Liljefors (1953), z jeho výsledků vyplývá značná sterilita pylu u vyšších ploidních úrovní hybridogenních druhů (konkrétně u triploidních druhů udává 0 - 25% dobře vyvinutého pylu, který ale většinou vůbec neklíčí).

Na lokalitách druhů s výskytem pentaploidních embryí rostou sympatricky hybridogenní druhy a zástupci potenciálních rodičovských druhů – *S. aria* a *S. danubialis*. U ostatních hybridogenních druhů nebyla pentaploidní embrya odhalena, což ovšem nevylučuje možnost jejich vzniku (ve vybraných analyzovaných semenech se nevyskytovala, popř. semena byla poškozena herbivory).

U *S. gemella* byla dokonce nalezena pentaploidní embrya v necelé polovině analyzovaných semen. Obdobná situace nastává například u druhů z podrodu *Hieracium pilosella* L., kde i v rámci jednoho úboru mohou vznikat semena s embryi o více ploidních úrovních (např. u tetraploidního *H. pilosella* vznikají tetraploidní a pentaploidní embrya; Krahulcová et Krahulec 2000). Možnost nesprávné interpretace histogramů v důsledku záměny s pentaploidním endospermem byla vyloučena následnými cytometrickými analýzami jednotlivých semen. Některá vykazovala pouze triploidní, jiná pouze pentaploidní píky, další píky odpovídající endospermu nebyly pozorovány. Vzhledem k tomu, že jedinci všech studovaných populací jsou karyologicky jednotní, tj. vyskytují se pouze jako triploidi, pentaploidní embrya buď zanikají, neklíčí, nebo nepřežijí stádium semenáčku. Lze jen spekulovat, zda tedy nedochází v populacích k nějaké formě selekce proti vyšším ploidním úrovním. Pentaploidní semenáčky by tak byly pravděpodobně méně životaschopné, případně méně konkurenceschopné. Nepřímo lze odvodit reprodukční způsob na základě studia molekulární variability populací (Robertson et al. 2004b); výchozí předpoklad je: nízká (žádná) variabilita v rámci populace = agamospermický způsob reprodukce (viz dále).

U hybridogenních druhů dříve uváděný reprodukční způsob – pseudogamie – byl potvrzen pouze u *S. bohemica*, kde vzniká triploidní embryo a oktoploidní endosperm. Endosperm v tomto případě mohl vzniknout z neredukovaného zárodečného vaku po oplození diploidním pylem.

Situace v ploidních embryích a endospermu je velmi složitá, zvláště co se týče možnosti vzniku jednotlivých ploidních úrovní embryí. Je proto třeba se této otázce dále věnovat.

Morfologické znaky s následným mnohorozměrným statistickým zpracováním dat byly již několikrát použity při studiu morfologické diferenciaci jednotlivých druhů rodu *Sorbus* (Aas et al. 1994, Aldasoro et al. 1998) a dalších, obdobně složitých agamospermických taxonů (např. *Alchemilla* L., *Hieracium pilosella*; Trávníček 2005, Urfus 2006). Avšak na tak malé geografické škále (pouze Česká republika) a na tak výrazně morfologicky blízké taxony nebyl nikdy tento postup aplikován - Aldasoro (Aldasoro et al. 1998) dokonce tvrdí, že na základě morfologických znaků nelze spolehlivě odlišit mikrospecie zvláště v jižní a střední Evropě. Morfometrické analýzy tak přinesly nový pohled na fenotypovou variabilitu endemických zástupců rodu *Sorbus*. Díky nim lze snadno odhalit i znaky, které nejsou na první pohled zřetelné a umožňují eliminovat subjektivní pohled taxonoma. Výpovědní hodnotu této a podobných studií zvyšuje její snadná reprodukovatelnost a snadná aplikace postupů na jiné taxony.

Již první analýzy ke zjištění struktury v datovém souboru (PCA) jasně oddělily některé výrazně odlišné druhy – např. *S. sudetica*, *S. querneae*, *S. rhodantha*. Lze tedy říci, že v analýze všech jedinců lze odlišit tři jasně vymezené skupiny taxonů – dle rozdílné rodičovské kombinace (*S. sudetica*, *S. querneae* a ostatní taxony). Následné kanonické diskriminační analýzy odlišnost těchto druhů potvrzují, jejich jasná diferenciaci pomocí redukované sady znaků byla u každé kanonické diskriminační analýzy verifikována klasifikační diskriminační analýzou. Diskriminační analýzy jasně ukázaly, že k odlišení jednotlivých druhů ze skupiny *S. latifolia* (rodičovská kombinace *S. aria* × *S. aucuparia*) je třeba 10 - 11 znaků. Díky tomuto počtu znaků je pak možné zpětně určit do druhů (pomocí klasifikační analýzy) 90,45% - 98,32% jedinců. Skupina *S. latifolia* vznikla kombinací stejných rodičovských druhů, které jsou si morfologicky podobné, avšak geneticky díky geografické izolovanosti značně vzdálené. K rozeznání jednotlivých, morfologicky blízkých hybridogenních druhů je tedy zapotřebí relativně rozsáhlejší sada znaků. Podobná situace nastává i u jiných taxonů s retikulární variabilitou znaků (např. rod *Alchemilla*, *Rubus*).

Vzhledem k tomu, že v analýzách byla použita data z různých fenofází (znaky na květech i plodech), byly provedeny klasifikační analýzy s různými sadami znaků (které odpovídají různým fenofázím) porovnávající úspěšnosti zařazení k jednotlivým druhům. Bylo tím potvrzeno doporučení Kovandy (1999), že k určení jedinců do druhů je třeba použít znaků jak z listů a květů, tak i z plodů. S použitím znaků (včetně poměrových) jen na listech bylo u *S. rhodantha* a *S. bohemica* správně určeno jen 80,93% jedinců, s použitím znaků na listech a květech 89,81% jedinců, s použitím znaků na listech a plodech 91,45% jedinců a s použitím vybraných znaků z listů, květů a plodů dohromady dokonce 98,36% jedinců.

V diskriminačních analýzách došlo také k dostatečnému odlišení dvou populací (Knobloška a Milá) od ostatních již popsanych druhů, které bylo potvrzeno molekulárními analýzami. Tyto populace si zaslouží další studium a celkové zhodnocení procesů probíhajících v těchto populacích (zpětná hybridizace apod.). Vzhledem k (v současné době akceptovanému) trendu v popisování nových hybridogenních typů jeřábů jako mikrospecií (viz například nedávný popis zpětných hybridů hybridogenních druhů s rodičovskými druhy v Anglii zjištěný na základě studia molekulární a morfologické variability – *S. pseudomeinchii* ASHLEY ROBERTSON; Robertson et Sydes 2006) není možno vyloučit ani popsání těchto populací v budoucnu jako nové druhy. Tuto otázku je však vzhledem ke stále nedostatečné prozkoumanosti populací nutné ponechat otevřenou, studium těchto populací bude pokračovat. Pro popsání populací jako nových druhů je však nutné znát zvláště ploidní úroveň všech jedinců, genotypovou variabilitu, reprodukční systém a do jaké míry dochází v potomstvu k segregaci. U rodu *Sorbus* je standardem popisovat jednotlivé geograficky a geneticky vymezené hybridogenní typy jako mikrospecie (Kovanda 1996a). Je nutné si uvědomit, že každý z těchto taxonů vznikl unikátní hybridizací, která se v téže podobě nebude již nikdy opakovat a pokud je stabilizována pomocí reprodukčního systému (agamospermie), případně geografickou izolací, lze popisování těchto typů jako mikrospecie považovat za oprávněné (Kraft et al. 1996). Obdobná situace nastává u *S. eximia*. Vzhledem k jasné morfologické a molekulární diferenciaci populace Koda od ostatních populací v Českém krasu je nutné uvažovat o celkovém taxonomickém zhodnocení tohoto taxonu. Kovanda (1984) popsal tento druh z vrchu Doutnáč, populace Koda by tedy mohla být považována za samostatný druh. Pozoruhodné výsledky přinesly analýzy populace Milá. Tato populace je od ostatních taxonů jasně morfometricky a molekulárně oddělená. V minulosti uvažovaný původ populace (dálkový přenos *S. rhodantha* na lokalitu, vzhledem ke shodnému znaku – růžovým prašníkům; M. Lepší, úst. sděl.) byl vyvrácen, ostatní druhy nesdílí s populací Milá alely. Růžová barva prašníků tedy mohla vzniknout nezávisle, vícenásobně, populace Milá pravděpodobně vznikla *in situ*.

Celkově úspěšné oddělení jednotlivých taxonů pomocí sady naměřených znaků lze přičíst hlavně nízké vnitrodruhové genetické variabilitě taxonů, která bude nejspíše způsobena předpokládaným způsobem reprodukce (agamospermie), případně geografickou izolovaností jednotlivých hybridogenních taxonů (zamezení genovému toku).

Molekulární markery dávají možnost detailně nahlédnout do procesů, které probíhají v populacích jednotlivých druhů a účelně tak zhodnotit všechny stupně variability (od

vnitropopulační po mezidruhovou) s přihlédnutím k možným evolučním důsledkům. Byly využity postupy osvědčené v zahraničních studiích, které zkoumaly molekulární variabilitu a vztahy mezi jednotlivými druhy rodu *Sorbus* (Nelson-Jones et al. 2002) a v rámci jedné ze skupin – *S. hybrida* (Robertson et al. 2004a, 2004b). Mikrosatelity (simple sequence repeats - SSRs) jsou v současné době jednou z nejpoužívanějších metod k hodnocení genetické variability. Lze ji vhodně aplikovat například k hodnocení mezidruhové variability (Gaspero et al. 2000).

Analýzou základního souboru (analýza hlavních koordinát – PCoA) molekulárních dat (mikrosatelity – SSR) byla zjištěna nízká vnitrodruhová variabilita hybridogenních druhů oproti rodičovským. Narozdíl od rodičovských druhů byly shluky jednotlivých hybridogenních druhů výrazně kompaktnější (sdílely část stejných alel) nebo se úplně překrývaly (jedinci sdíleli totožný mikrosatelitový fenotyp). Neočekávané proporcionální rozdělení jednotlivých skupin v grafu (uprostřed rodičovské druhy, krajních polohách druhy hybridogenní) lze vysvětlit charakterem vstupních dat (binární matice – absence/prezence alely; statistická procedura neuvažující „příbuznost“ málo se lišících délek fragmentů).

Analýzou molekulární variability bylo zjištěno nejvyšší procento variability mezi druhy, jak při porovnání populací jednotlivých druhů (57%), tak při porovnání skupiny hybridogenních vs. rodičovských druhů (69,28%). Avšak u poslední analýzy míra meziskupinové úrovně variability vyšla jako záporné číslo (-7,69%), což by znamenalo nižší než nulovou variabilitu! Mírně zápornou hodnotu variability autor programu připouští (Excoffier 2006), avšak nikde nedefinuje jak „mírná“ může tato záporná odchylka být. Doporučuje proto tyto výsledky brát s rezervou a považovat hodnoty za nulu. Záporné hodnoty vysvětluje jako možnou absenci genetické struktury v datech; matematicky - asociované hodnoty F statistik mohou nabývat záporných hodnot a tato zápornost se pak projeví i ve vyhodnocení variability. Možným vysvětlením u našeho souboru dat může být špatné „nedefinování“ skupin (ovšem jakékoliv jiné varianty skupinového rozdělení poskytovaly výrazně horší - zápornější výsledky). Jiným možným vysvětlením může být fakt, že variabilita hybridogenní skupiny je vlastně výsekem variability skupiny rodičovských druhů, což lze předpokládat z konceptu rodičovských / hybridogenních taxonů (geneticky variabilní rodičovské druhy rozmnožující se sexuálně a schopny hybridizace vs. ustálené, apomikticky se rozmnožující hybridogenní taxony) a odvodit z prostého porovnání AGD (*Average gene diversity over all loci*) druhů ve skupině hybridogenních taxonů (rozsah 0,0053-0,0634) a ve skupině rodičovských taxonů (0,0793-0,1455).

Z výsledné matice  $F_{ST}$  párových vzdáleností mezi jednotlivými druhy lze zjistit, že hybridogenní druhy jsou nejbližší rodičovským druhům, převážně očekávané (vlastní) rodičovské kombinaci. V žádném případě hybridogenního druhu nebyl mezi třemi nejbližšími druhy uveden jiný hybridogenní druh! Avšak mezi rodičovskými kombinacemi jednotlivých hybridogenních druhů byly nalezeny určité rozpory (zvláště u *S. aria* a *S. danubialis*, které byly uváděny jako jeden z rodičů; a absence *S. aucuparia* mezi třemi nejbližšími rodičovskými druhy u *S. querneae*). Záměnu *S. aria* se *S. danubialis* je možné snadno vysvětlit velmi malou genetickou rozdílností těchto dvou druhů, která se potvrdila i v analýze mezidruhového porovnání (rozdílnost -0,00480). Absence *S. aucuparia* mezi třemi nejbližšími rodičovskými druhy u *S. querneae* by mohla být vysvětlena nejasnými procesy, které mohly během evoluce v taxonu probíhat (např. zpětná hybridizace; v některých charakteristikách se tento taxon podobá *S. intermedia*, u kterého se uvažují jako rodiče všechny tři druhy – *S. aria*, *S. aucuparia* a *S. torminalis*).

Hybridogenní druhy obsahují velmi málo unikátních rodičovských alel. Jedním z vysvětlení může být fakt, že se nejedná o přímé potomky hybridů vzniklých po křížení rodičovských druhů. Tito hybridi zřejmě dále zpětně hybridizovali s rodičovskými druhy a malá část z nich se ustálila poté, co se u nich vyvinula agamospermie. Podobný způsob vzniku taxonů byl dokázán na základě studia jeřábů ve Velké Británii (Robertson et al. 2004a) na základě molekulárních dat a také v ČR na základě studia obsahových látek (Challice et Kovanda 1978). Potenciál pro částečnou sexuální reprodukci zřejmě za účasti rodičovských druhů byl prokázán u *S. eximia*, *S. alnifrons* a *S. gemella* (viz výše). Dalším z vysvětlení absence unikátních rodičovských alel může být nepodchycení molekulární variability rodičů v oblasti výskytu hybridogenních taxonů. Rodičovské druhy mají mnoho různých alel, avšak minimum jich je druhově specifických. Sdílí tak mezidruhově (v rámci rodičovských druhů) podobný rozsah alel. U rodičovských druhů byl zpravidla k dispozici jen omezený počet jedinců, zejména z důvodu jejich řídkého výskytu v oblastech růstu hybridogenních druhů. Častá byla situace, kdy v populaci hybridogenních druhů bylo zaznamenáno jen několik jedinců rodičovských druhů (často v podobě semenáčů), mnohdy však chyběl jeden z rodičovských druhů zcela (např. u *S. rhodanthera*), nebo oba rodičovské druhy (u *S. sudetica*). Hybridogenní, agamospermicky se rozmnožující druhy mohou být teoreticky kompetičně zdatnější než rodičovské. Ačkoliv trend je u sexuálně se množících rostlin opačný (polyploidní potomci diploidů mají často sníženou fitness; Burton et Husband 2000), lze uvažovat o odlišné situaci v případě agamospermie u hybridogenních taxonů.

Vnitropopulační variabilita hybridogenních druhů (počítána jako *Average gene diversity* – AGD; Nei 1987) se pohybovala od 0 po 0,0873. Vyšších hodnot většinou dosahovaly málopočetné populace (nejvyšší hodnota u *S. sudetica*, populace Čertova rokle – pouze 2 jedinci, každý má jiný mikrosatelitový fenotyp), výsledky je proto nutné interpretovat s rezervou. Existuje zde však jasný trend – velmi nízká úroveň vnitropopulační variability u druhů známých pouze z jediné populace (*S. alnifrons*, *S. rhodanthera*). Porovnání mezidruhové variability (AGD) bylo zajímavější – kolísala u hybridogenních druhů od 0,0053 do 0,0634 a u rodičovských druhů od 0,0793 do 0,1455. Je patrné, že mezi hybridogenními druhy se vyskytují jak agamospermické druhy s velmi nízkou genetickou variabilitou (*S. alnifrons*, *S. rhodanthera*, případně *S. bohemica*) jejichž AGD nedosahuje ani hodnoty 0,01, tak i patrně fakultativně apomiktické druhy (*S. sudetica*, *S. hardeggensis*, populace Knobloška) blízcí se svým AGD rodičovským druhům. Je otázkou, zda pozorovaná variabilita souvisí se zbytkovou sexualitou (fakultativní apomixie) nebo je možné diskutovat polytopní vznik druhu. U *S. sudetica* i u *S. hardeggensis* se vyskytují různé mikrosatelitové fenotypy nejen mezi populacemi, ale i v rámci populací. Jako pravděpodobnější se tedy jeví přítomnost zbytkové sexuality, než polytopní vznik druhu. U *S. hardeggensis* by ještě připadal v úvahu hybridní původ – nešlo by tedy o ustálený hybridogenní druh, ale o primárního hybrida. Molekulární data (sdílení jen některých alel *S. hardeggensis* se *S. aria* a *S. torminalis*, je však velmi pravděpodobné, že nebyla zcela podchycena variabilita potenciálních rodičovských druhů *S. hardeggensis*) však tuto domněnku ne zcela podporují, ačkoliv výsledky mezidruhového porovnání poskytují výrazně nízké hodnoty rozdílnosti mezi druhy (zde mezi *S. hardeggensis*, *S. danubialis*, *S. aria* a *S. torminalis*) oproti ostatním hybridogenním taxonům (které mají hodnoty cca dvounásobné!). Obdobná situace nastává u populace Knobloška, kde jsou hodnoty rozdílnosti od rodičovských druhů ještě výrazně nižší (0,00377).

Rozdílná vnitrodruhová variabilita byla nalezena u druhů se zjištěnou variabilitou ploidní úrovně embryí (triploidní a pentaploidní). U *S. eximia* byla zjištěna vyšší variabilita, což lze přikládat rozdělení taxonu na populaci Koda a zbytek Českého krasu (0,0414), nižší byla nalezena u *S. alnifrons* (0,0053) a *S. gemella* (0,0179). Z těchto výsledků proto lze usuzovat na přítomnost zbytkové sexuality pouze u *S. eximia* a *S. gemella*, u *S. alnifrons* lze předpokládat spíše mutaci v místě mikrosatelitového lokusu. Situace u *S. eximia* je zřejmá, v rámci Českého krasu existuje výrazné rozdělení na dvě hlavní skupiny mikrosatelitových fenotypů – populace Koda a ostatní populace. Je evidentní, že tento taxon vznikl vícenásobně (tj. polytopní vznik) – v jeho evoluci lze tedy uvažovat minimálně dvě hybridizační události.



*S. bohémica*, který se vyskytuje na dvounásobném množství lokalit, oproti tomu nevykazuje žádnou tendenci, která by indikovala polytopní vznik. Rozdělení populací není kopírováno unikátními alelami jako u *S. eximia*.

Zajímavá je situace u agamospermických linií *S. alnifrons* a *S. rhodantha* – jak již bylo uvedeno, v jejich populacích byla nalezena velmi nízká úroveň vnitropopulační variability. V těchto populacích mají pouze jeden nebo dva jedinci odlišný mikrosatelitový fenotyp (lišící se například pouze jednou alelou od ostatních), Vzhledem k velké mutační rychlosti mikrosatelitů ( $10^{-3} - 10^{-4}$  / lokus / gameta / generace; Schug et al. 1997) je možné uvažovat o délkové mutaci (tj. o repetici méně či více) v oblastech mikrosatelitů. Nízká populační variabilita bude nejpravděpodobněji způsobena striktním agamospermickým rozmnožováním (což nevylučuje fakt, že některá semena mohou vznikat i sexuálně; srovnej - pentaploidní embrya u *S. alnifrons*, *S. eximia* a *S. gemella*), ale selekční tlak je ve prospěch triploidních, agamospermicky vznikajících jedinců (podobný případ je u hybridních typů *Roripa austriaca* (CRANTZ) BESSER × *R. sylvestris* (L.) BESSER - vznikající triploidi mají vyšší fitness než pentaploidi; Bleeker et Matthies 2005). Ačkoliv tedy vznikají i jiné genotypy (pentaploidní), došlo patrně k fixaci triploidního genotypu, který je pro dané prostředí nejvhodnější.

**Závěr**

- 1) U všech studovaných druhů byly determinovány DNA ploidní stupně. Jednotlivé druhy jsou diploidní, triploidní a tetraploidní. Vnitrodruhová variabilita v DNA ploidním stupni nebyla nalezena. Druhy se liší v absolutní velikosti genomu minimálně (do 6%), tento marker však lze považovat za druhově specifický.
- 2) Nalezená morfologická variabilita jednotlivých taxonů byla nízká. Jednotlivé dosud uznávané taxony jsou morfologicky vyhraněné a na základě souboru znaků je lze velmi dobře odlišit.
- 3) Reprodukčním způsobem studovaných hybridogenních druhů je fakultativní agamospermie.
- 4) Molekulární variabilita studovaných druhů je malá, byly však nalezeny různé stupně vnitrodruhové variability související s reprodukčním způsobem. Většina druhů má unikátní sadu alel, která je spolehlivě odlišuje od ostatních. U tří druhů byl diskutován polytopní vznik.

**Seznam použité literatury**

- Aas G., Maier J., Baltisberger M. & Metzger S. (1994): Morphology, isozyme variation, cytology, and reproduction of hybrids between *Sorbus aria* (L.) Crantz and *S. torminalis* (L.) Crantz. - *Botanica Helvetica* **104**: 195-214.
- Aldasoro J.J., Aedo C., Navaro C. & Garmendia F.M. (1998): The genus *Sorbus* (Maloideae, Rosaceae) in Europe and in North Africa: Morphological analysis and systematics. - *Systematic Botany* **23**: 189-212.
- Becher S.A., Steinmetz K., Weising K. Boury S., Peltier D., Renou J.P. Kahl G. & Wolff K. (2000) Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. - *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 643–651.
- Bernátová D. & Májovský J. (2003): New endemic hybridogeneous species of the genus *Sorbus* in the Western Carpathians. - *Biológia* **58**: 781-790.
- Bicknell R.A. & Koltunow A.M. (2004): Understanding of apomixis: Recent advantages and remaining colundrums. - *The Plant Cell* **16**: 228-245.
- Bleeker W. & Matthies A. (2005): Hybrid zones between invasive *Rorippa austriaca* and native *R. sylvestris* (Brassicaceae) in Germany: ploidy levels and patterns of fitness in the field. - *Heredity* **94**: 664-670.
- Boublík K., Lepší M. & Lepší P. (2002): Jeřáb český (*Sorbus bohemica*) v Českém středohoří. - *Severočeskou Přírodou* **33-34**: 55-72.
- Burton T.L. & Husband B.C. (2000): Fitness differences among diploids, tetraploids, and their triploid progeny in *Chamaerion angustifolium*: Mechanisms of inviability and implications for polyploid evolution. - *Evolution* **54**: 1182-1191.
- Campbell C. S., Greene C. W. & Dickinson T. A. (1991): Reproductive biology in subfam. *Maloideae* (*Rosaceae*). - *Systematic Botany* **16**: 333-349.
- Campbell C. S. & Dickinson. T. A. (1991): Apomixis, pattern of morphological variation, and species concept in Subfam. *Maloideae* (*Rosaceae*). - *Systematic botany* **15**: 124-135.
- Challice J. & Kovanda M. (1978): Flavonoids as markers of taxonomic relationships in the genus *Sorbus* in Europe. - *Preslia* **50**: 305-320.
- Challice J. (1981): Chemotaxonomic studies in the family Rosaceae and evolutionary origins of the subfamily *Maloideae*. - *Preslia* **53**: 289-304.
- Challice J. & Kovanda M. (1986): Flavonoids of *Sorbus eximia*. - *Preslia* **58**: 165 – 167.

- Darlington C.D. & Mofett A.A. (1930): Primary and secondary chromosome balance in *Pirus*. - *Journal of Genetics* **22**: 129-151.
- Doležel J. (1997): Application of flow cytometry for the study of plant genomes. – *Journal of Applied Genetics* **38**: 285-302.
- Doyle J.J. & Doyle J.L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. – *Phytochem. Bulletin* **19**: 11-15
- Excoffier L., Laval L. G. & Schneider S. (2005): Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. - *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**:47-50.
- Excoffier L. (2006): Arlequin forum FAQ. [online]. URL: <<http://www.rannala.org/phpBB2/viewtopic.php?t=499&sid=4751a0ae7eca4a83cbee6ec2deab01eb>>.
- Fritsch K. (1898): Zur Systematic der Gattung *Sorbus* 1. – *Oesterreichische botanische Zeitschriften* **48**: 1-4, 47-49, 167-171.
- Fritsch K. (1899): Zur Systematic der Gattung *Sorbus* 2. – *Oesterreichische botanische Zeitschriften* **49**: 381-385, 426-429.
- Gianfranceschi L., Seglias N., Tarchini R., Komjanc M. & Gessler C. (1998): Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. - *Theoretical and Applied Genetics* **96**: 1069-1076.
- Greilhuber J., Doležel J., Lysák & M.A. Bennet M.D. (2005): The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms ‘Genome Size’ and ‘C-Value’ to Describe Nuclear DNA Contents. - *Annals of Botany* **95**: 255-260.
- Gládková V.N. (1972): On the origin of the subfamily *Maloideae*. - *Botaničnij žurnal* **57**: 42-49.
- Hedlung T. (1901): Monographie der Gattung *Sorbus*. – *Kongliga Svenska Vetenskaps – Akademiens Handlingar* **35**: 1-147.
- Hudec K. & Černý W. (1977): Fauna ČSSR vol. 2 – Ptáci – *Aves*, Academia, Praha
- Jankun A. & Kovanda M. (1986): Apomixis in *Sorbus sudetica* (Embryological studies in *Sorbus* 1). – *Preslia* **58**: 7-19.
- Jankun A. & Kovanda M. (1987): Apomixis and origin in *Sorbus bohemica* (Embryological studies in *Sorbus* 2). – *Preslia* **59**: 97-116.
- Jankun A. & Kovanda M. (1988): Apomixis at the diploid level in *Sorbus eximia* (Embryological studies in *Sorbus* 3). – *Preslia* **60**: 193-213.
- Kalendar R. (2005): *Fast PCR*. Computer program, version 3.6.28, Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland

- Klecka W.R. (1980): *Discriminant analysis*. (Sage University Papers, Series: Quantitative applications in the social sciences, no. 19). Sage Publications, Beverly Hills and London.
- Kociánová M. & Štursová H. (1986): Revize rozšíření a ekologie jeřábu krkonošského (*Sorbus sudetica*). - *Opera Corcontica* **23**: 77-110
- Kociánová M., Štursová H. & Zahradníková J. (2005): Klonální růst endemického jeřábu *Sorbus sudetica* v Krkonoších. - *Opera Corcontica* **42**: 99-105.
- Kovanda M. (1959): Proměnlivost muku v ČSR. Ms. [Dipl. Práce, depon. In: Knihovna katedry botaniky PřF UK].
- Kovanda M. (1961a): Flower and fruit morphology of *Sorbus* in correlation to the taxonomy of the genus. - *Preslia* **33**: 1-16
- Kovanda M. (1961b): Spontaneous hybrids of *Sorbus* in Czechoslovakia. - *Acta Universitatis Carolinae - Biologica* **1961/1**: 41-83
- Kovanda M. (1965): Taxonomie jeřábu sudetského (*Sorbus sudetica* (Tausch) Hedl.) a otázka jeho endemismu. - *Československá ochrana přírody* **2**: 47-62.
- Kovanda M. (1984): A new hybridogenous *Sorbus*. - *Preslia* **56**: 169-172.
- Kovanda M. (1996a): New taxa of *Sorbus* from Bohemia (Czech Republic). - *Verhandlungen der Zoologisch - Botanischen Gesellschaft in Österreich* **133**: 319-345.
- Kovanda M. (1996b): Observations on *Sorbus* in Southwest Moravia (Czech Republic) and adjacent Austria I. - *Verhandlungen der Zoologisch - Botanischen Gesellschaft in Österreich* **133**: 347-369.
- Kovanda M. (1998): Jeřáby NP Podyjí. - *Příroda* **12**: 99-108.
- Kovanda M. (1999): Jeřáby (*Sorbus*) České Republiky a jejich ochrana. - *Příroda* **15**: 31-47.
- Kovanda M. (2002): *Sorbus* L. In: Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J. & Štěpánek J. [eds.] (2002): *Klíč ke květeně České Republiky* p. 383-386. - Academia, Praha.
- Kovanda M. (2003): *Sorbus* L. In: Hejný S. & Slavík B. (eds.), *Květena České republiky* **3**, pp. 474 - 484. Academia, Praha
- Kraft T., Nybom H. & Werlemark G. (1996): DNA fingerprint variation in some blackberry species (*Rubus* subg. *Rubus*, *Rosaceae*). - *Plant Systematics and Evolution* **199**: 93-108.
- Krahulcová A. (1998): *Karyologie cévnatých rostlin*. Příručka praktických cvičení, Průhonice.
- Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J. & Štěpánek J. (eds.) (2002): *Klíč ke květeně České republiky*, Academia, Praha.

- Kutzelnigg H. & Silbereisen R. (1994): *Sorbus* L. In: Conert H.J., Hamann U., Schultze-Motel W. & Wagenitz G., *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, Band IV, Teil 2B. Parey, Hamburg.
- Lepší P., Lepší M. & Vít P. (2006): *Ohrožení a ochrana endemických zástupců rodu Sorbus v České republice*. - In: *Ohrožené dřeviny ČR - Workshop*. [prezentace]
- Liljefors A. (1953): Studies on propagation, embryology, and polination in *Sorbus*. – *Acta Horti Bergiani* **16**: 277-329.
- Linnaeus C. (1753): *Species plantarum* 1. - Holmiae.
- Marhold K. & Suda J. (2002): *Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody)*. Karolinum, Praha.
- Markwith S. H., Stewart D. J. & Dyer J. L. (2006): Tetrasat: A program for the population analysis of allotetraploid microsatellite data. - *Molecular ecology notes* **6**: 586-589.
- Matzk F., Meister A. & Schubert I. (2000): An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. – *Plant Journal* **21**: 97-108.
- Matzk F., Meister A., Brutovska R. & Schubert I. (2001): Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixis. - *The Plant Journal* **26**(3): 275-282.
- Meusel H., Jäger E. & Weinert E. (1965): *Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora*, pp 209-210. Fischer Verlag, Jena.
- Meyer N., Meierott L., Schuwerk H. et Angerer O. (2005): Beiträge zur Gattung *Sorbus* in Bayern. – *Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft, Sonderband*: 5-216.
- Nebel B. (1929): Zur Cytologie von *Malus* und *Vitis*. - *Die Gartenbauwissenschaft* **1**: 549-592.
- Nei, M. (1987): *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nelson - Jones E. B., Briggs D. & Smith A. G. (2002): The origin of intermediate species of genus *Sorbus* – *Theoretical and Applied Genetics* **105**: 953-963.
- Oddou-Muratorio S., Aligon C., Decroocq S., Plomion C., Lamant T. & Mush-Demesure B. (1991): Microsatellite primers for *Sorbus torminalis* and related species. – *Molecular Ecology Notes* **1**: 297-299.
- 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*. pp. 105-110. Academic Press, New York.

- Pfossor M., Jakubowsky G., Schlüter P. M., Fer T., Kato H., Stuessy T. F. & Sun B. Y. (2005): Evolution of *Dystaenia takesimana* (Apiaceae), endemic to Ullung Island, Korea. - *Plant Systematics and Evolution* **256** (1-4): 159 – 170
- Podani J. (2001): *SYN-TAX 2000*. Computer programs for data analysis in ecology and systematics. User's manual. Scientia Publishing, Budapest.
- Pogan E., Czapiak R. & Jankun A. (1985): Further studies in chromosome numbers of polish Angiosperms. Part XVIII. – *Acta Biologica Cracoviensia* **28**: 57-86.
- Polívka F. (1900): *Názorná květena zemí koruny české*. Olomouc.
- Robertson A., Newton A.C. & Ennos R. A. (2004a): Multiple hybrid origins, genetic diversity and population genetic structure of two endemic *Sorbus* taxa on the Isle of Arran, Scotland. – *Molecular Ecology* **13**: 123-134
- Robertson A., Newton A.C. & Ennos R.A. (2004b): Breeding systems and continuing evolution in the endemic *Sorbus* taxa on Arran. – *Heredity* **93**: 487-495.
- Rostafiński J.R. (1990): *Slovník polských imion rodzajów, oraz wyższych skupień roślin, poprzedzony historyczna rozprawa o źródłach*. Kraków.
- Sax K. (1931): The origin and relationships of the *Pomoideae*. - *Journal of the Arnold Arboretum* **12**: 3-22.
- Scribner K. T. & Pearce J. M. (2000): Microsatellites: Evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic levels. In: Barker A. J. (ed.), *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Sciences, Toronto.
- Slavík B. (1998): *Phytocartografical syntheses of the Czech Republic*, Vol 3, pp 28-34. Academia, Praha.
- Schug M.D., Mackay T.F.C. & Aquadro C.F. (1997): Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. - *Nature genetics* **15**: 99-102.
- Suda J. (2004): An employment of flow cytometry into plant biosystematics. – Ms. [Disert. práce, depon. In: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- 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.
- Šingliarová B. (2005): *Pilosella officinarum* (Asteraceae, Lactuceae): Altitudinal and regional Differences in Ploidy Level Distribution in the Western Carpathians and General Pattern in Europe - Ms. [Dipl. práce, depon. In: Univerzitní knižnice UPJŠ, Košice].
- Tausch (1834): Über *Pyrus sudetica* Tausch. – *Flora* **17**: 75-77.

- Tischler G. (1928): Über die cytologischen Phänomene bei der Gonensterilität der Angiospermen  
Sammelbericht. - *Plant Systematics and Evolution* 77: 292-306.
- Trávníček (2005): Taxonomie a ekologie druhů *Alchemilla* v Krkonoších. - Ms. [Dipl. práce, depon.  
In: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- Urfus T. (2006): Zdroje variability u *Hieracium pilosella* L. – Ms. [Dipl. práce, depon. In: Knihovna  
katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- Vít P. & Suda J. (2006): Endemické jeřáby ČR – perly mezi našimi dřevinami. *Živa* xx: xx – xx (v  
tisku).
- Warburg E.F. (1952): *Sorbus*. – In Clapham A.R., Tutin T.G. & Warburg E.F., *Flora of the British  
Isles*. Cambridge University Press, Cambridge..
- Warburg E.F. & Kárpáti Z.E. (1968): *Sorbus* L. In: Tutin T.G., Heywood V. H., Burges N.A., Moore  
D.M., Valentine D.H, Walters S.M. & Webb D.A., *Flora Europaea*, Vol.2, *Rosaceae* to  
*Umbelliferae*, pp. 67-70. Cambridge University Press, Cambridge.
- Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984): Estimating F-staistics for the analysis of population structure.  
*Evolution* 38: 1358-1370.



**Abstract**

This MSc. thesis deals with morphological, karyological, and molecular variations of selected apomictic hybridogenous hawthorns (*Sorbus* L.) endemic to the Czech Republic. The genus is represented by 17 taxa in the Czech Republic, eight of which rank among the (sub)endemics (i.e., *S. alnifrons* KOVANDA, *S. bohemica* KOVANDA, *S. eximia* KOVANDA, *S. gemella* KOVANDA, *S. hadeggensis* KOVANDA, *S. rhodanthera* KOVANDA and *S. sudetica* (TAUSCH) BLUFF, NEES et SCHAUER). Two morphologically-distinct populations of unknown taxonomic position as well as selected parental taxa were also studied.

DAPI and propidium iodide flow cytometry, chromosome counting using rapid squash techniques, multivariate statistics (PCA, cluster analyses, discriminant analyses), and molecular approaches (microsatellite variation) were employed. All native populations of above-mentioned (sub)endemic taxa were included into the study (i.e., 29 populations and over 450 individuals).

DNA ploidy screening, using leaf tissue of mature individuals, revealed triploidy in majority of hybridogenous taxa (often in contrast to previous reports). Exceptions included tetraploid *S. querneana* and *S. sudetica*, and diploid *S. hardeggensis*. Flow cytometric data were mostly confirmed by chromosome counts. Low, but statistically significant, between-species differences in genome size were often observed. Remarkably, triploid and pentaploid embryos were observed during flow cytometric investigation of the mode of reproduction.

Morphometric analyses revealed low intraspecific variation in most taxa, *S. eximia* with two distinct morphotypes being an exception. Species-specific sets of morphological features, which allowed reliable species identification, were identified.

Molecular variation in hybridogenous taxa (both within and among populations of the same taxa) was low while between-species differences were high. Generally, single-locality species were more uniform than their counterparts occurring in several localities. Increased variation in *S. sudetica*, *S. eximia* and *S. hardeggensis* may be explained by their multiple origins and/or facultative apomixis. Genetic variation of putative parental taxa was, according to expectations, significantly higher.

## **Seznam obrázků**

### **Charakteristika rodu *Sorbus* L.**

Obrázek 1: Rozšíření *S. aria* (tmavé šrafování) (Meusel et al. 1965).

Obrázek 2: Rozšíření *S. torminalis* (tmavé šrafování) (Meusel et al. 1965).

Obrázek 3 a 4: Rozšíření *S. chamaemespilus* (vlevo, tmavé šrafování, trojúhelník označuje výskyt *S. sudetica*) a *S. aucuparia* (vpravo, tmavé šrafování) (Meusel et al. 1965).

### **Výskyt zástupců rodu *Sorbus* v ČR**

Obrázek 6: Rozšíření *S. aria* v ČR (Slavík 1998).

Obrázek 7: Rozšíření *S. danubialis* v ČR (Slavík 1998).

Obrázek 8: Rozšíření *S. torminalis* v ČR (Slavík 1998).

Obrázek 9: Rozšíření *S. aucuparia* v ČR (Slavík 1998).

Obrázek 10: Distribuční mapa rodu *Sorbus* v ČR: Bod plný - *S. torminalis*. Převzato z Lepší et al. 2006.

Obrázek 11: Geografická distribuce hybridogenních druhů rodu *Sorbus* v ČR.

### **Charakteristika jednotlivých druhů**

Obrázek 12: *S. alnifrons* rostoucí nad kaňonem řeky Jihlavy. Jde o strmé svahy s řídkým porostem sv. *Melampyro – Carpinetum*.

Obrázek 13: Jedinci *S. bohemica* často rostou na skalních útesech, kde jim nehrozí konkurence rychleji rostoucích druhů rostlin (Lokalita Deblík).

Obrázek 14: Malvice endemita Českého krasu *S. eximia* v pozdním létě na lokalitě Paví hora

Obrázek 15: Plody *S. gemella* na největším jedinci lokality Konětopy u Loun

Obrázek 16: Vícekmenný jedinec *S. hardeggensis*, charakterizovaný bronzově oranžovými malvicemi na platu Ledových slují.

Obrázek 17: Květy *S. rhodanthera*, výrazným znakem oproti ostatním hybridogenním druhům skupiny *S. hybrida* jsou růžové prašníky.

Obrázek 18: Výrazně zaoblené laloky listů jsou hlavním znakem odlišujícím skupinu *S. hybrida* od *S. latifolia*. Na obrázku je jedinec *S. querneana* na lokalitě Bílá skála.

Obrázek 19: Kvetoucí keř *S. sudetica* na okraji Schustlerovy zahrádky v Labském dole

Obrázek 20: Populace Knobloška se vyznačuje mělce laločnatými listy.

Obrázek 21: Jedinci v populaci na vrchu Milá jsou velmi podobní *S. rhodanthera* a *S. gemella*

Obrázek 22: Srovnání listů populací Milá, Knobloška a *S. bohemica*. Populace Milá je oproti *S. bohemica* charakterizována laloky protaženými v špičku a populace Knobloška mělkými zářezy mezi laloky listů.

## Cytometrie a karyologie

Obrázek 23: Grafický výstup z průtokového cytometru diploidního *S. hardeggensis*. Pík standardu je v 2,59 násobku vzorku. CV Bellis = 2,29, CV vzorku = 4,89.

Obrázek 24: Grafický výstup z průtokového cytometru tetraploidního *S. querneae*. Pík standardu je v 1,36 násobku vzorku. CV Bellis = 2,4, CV vzorku = 4,01.

Obrázek 25: Grafický výstup z průtokového cytometru triploidního *S. alnifrons*. Pík standardu je v 1,75 násobku vzorku. CV Bellis = 2,2, CV vzorku = 3,34.

Obrázek 26: Grafický výstup analýzy 4 semen *S. aucuparia*. Poměr píků diploidního embrya a triploidního endospermu je 1,496. CV embrya – 3,09; CV endospermu – 2,98.

Obrázek 27: Grafický výstup z průtokového cytometru triploidního *S. gemella*. Analýza dvou semen, na kanálu 200 je triploidní embryo, na kanálu 331 je pentaploidní embryo. poměr píků je 1,655, CV embrya – 3,23; CV embrya - 2,77.

Obrázek 28: Grafický výstup analýzy 5ti semen triploidního *S. eximia*. Na kanálu 222 je vidět triploidní embryo, na kanálu 358 je pentaploidní embryo. Poměr píků je 1,611. CV1 – 3,86; CV2 - 3,61.

Obrázek 29: Grafický výstup z analýzy pěti semen *S. bohémica*. vlevo je pík embrya, vpravo malý pík endospermu. poměr píků 2,702. CV1-2,11; CV2-2,7.

## Morfometrické analýzy

Obrázek 30: Vybrané znaky měřené na listech třech typů hybridogenních jeřábů; zleva *S. sudetica*, *S. querneae*, *S. alnifrons* (měřítko 20mm).

Obrázek 31 a 32: Znaky měřené na čnělce (vlevo) a korunním lístku (vpravo) *S. eximia* (měřítko 2mm vlevo, 1mm vpravo).

Obrázek 33: Znaky měřené na kališních lístcích (měřítko 3mm).

Obrázek 34: Grafický výstup PCA pro všechny studované druhy s použitím všech 28 znaků. Jednotlivé osy vysvětlují 34,05%, 13,89% a 9,85% variability.

Obrázek 35: Grafický výstup PCA pro všechny druhy (mimo *S. sudetica* a *S. querneae*) a všech 28 znaků. Jednotlivé osy vysvětlují 25,81%, 13,03% a 11,14% variability.

Obrázek 36: Výstup z CDA pro všechny druhy a všech 28 znaků ilustrující výrazné oddělení *S. sudetica*, *S. querneae* a *S. hardeggensis* od zbytku taxonů. Jednotlivé osy vysvětlují 68,34%, 12,74% a 7,83% variability

Obrázek 37: CDA všech jedinců znázorňuje oddělení *S. sudetica*, *S. hardeggensis* a *S. querneae* od zbytku taxonů. Analyzováno se všemi znaky mimo znaků v7 a v8. Jednotlivé osy vysvětlují 68,57%, 13,51% a 8,33% variability.

Obrázek 38: CDA všech druhů mimo *S. sudetica*, *S. quernei* a *S. hardeggensis* ukazující oddělení *S. bohémica* a *S. rhodanthera* od zbývajících taxonů. Jednotlivé osy vysvětlují 39,05%, 32,59% a 12,98% variability

Obrázek 39: CDA *S. alnifrons*, *S. eximia*, *S. gemella* a dvou populací nejasného taxonomického postavení (Knobloška a Milá). Jednotlivé osy vysvětlují 48,23%, 30,37% a 19,87% variability

Obrázek 40: Dvourozměrná CDA oddělující *S. alnifrons* (modrý trojúhelník), *S. eximia* (červený čtverec) a *S. gemella* (zelený kruh). Jednotlivé osy vysvětlují 60,21% a 39,79% variability.

Obrázek 41: Kanonická diskriminační analýza *S. eximia* (populace Koda vs. zbývajících populace v Českém krasu).

Obrázek 42: CDA jednotlivých populací *S. eximia* ilustrující oddělení populace Koda (modrá srdce) od ostatních populací.

Obrázek 43: CDA osmi populací *S. bohémica* – žádná z populací není jasně morfologicky oddělena od ostatních.

Obrázek 44: CDA *S. bohémica* (fialové trojúhelníky), a populací Knobloška (modré čtverce) a Milá (černé kruhy). Jednotlivé osy vysvětlují 88,53% a 11,47% variability.

### Molekulární metody

Obrázek 45: Zřetelně amplifikované fragmenty pomocí mikrosatelitových primerů Mss1 a Mss6

Obrázek 46: Skórovatelné mikrosatelitové pattern na histogramu (výstup z programu GeneMarker Demo).

Obrázek 47: Ukázka 4 lokusů u tří vybraných jedinců (výstup z programu GeneMarker).

Obrázek 48: PCoA všech vzorků hybridogenních a rodičovských druhů. Jednotlivé osy vysvětlují 12,85%, 10,09% a 9,72% variability.

Obrázek 49 a 50: Analýza PCoA hybridogenních a rodičovských druhů jeřábů (bez zobrazení rodičovských druhů). Jednotlivé osy vysvětlují 16,51%, 13% a 12,11% variability.

Obrázek 51: Analýza hlavních koordinát potenciálních rodičovských druhů. Jednotlivé osy vysvětlují 8,44%, 7,47% a 5,52% variability.

Obrázek 52: Analýza hlavních koordinát hybridogenních druhů. Jednotlivé osy vysvětlují 16,51%, 13% a 12,11% variability.

## Seznam tabulek

### Charakteristika rodu *Sorbus* L.

Tab. 1: (Sub)endemitní jeřáby ČR a oblasti jejich výskytu.

Tab. 2: Somatické chromosomové počty zjištěné u hybridogenních a jejich potenciálních rodičovských taxonů.

### Výskyt zástupců rodu *Sorbus* v ČR

Tabulka 3: Přehled jednotlivých lokalit endemických jeřábů v ČR.

### Cytometrie a karyologie

Tabulka 4: DNA ploidie zjištěná u druhů *Sorbus*. Relativní fluorescence jader izolovaných z listových pletiv je vztažena k internímu standardu *Bellis perennis* ( $2C = 3,405$  pg), jehož fluorescence byla považována za jednotkovou.

Tabulka 5: Chromozómové počty u vybraných zástupců jeřábů.

Tabulka 6: Absolutní velikosti genomu v pikogramech.

Tabulka 7: Výsledek procedury GLM. Tabulka udává průkaznost rozdílů ve velikosti genomu mezi jednotlivými dvojicemi druhů.

Tabulka 8: Zjištěné ploidie embryí a endospermu u hybridogenních a vybraných rodičovských druhů.

### Morfometrické analýzy

Tabulka 9: Vybrané morfometrické znaky používané v literárních pramenech k determinaci zástupců rodu *Sorbus*

Tabulka 10: Morfologické znaky měřené na jednotlivých jedincích

Tabulka 11: Kanonické diskriminační koeficienty pro analýzu všech druhů s použitím všech znaků. Tučně jsou označeny kódy znaků (spolu s odpovídajícími kanonickými koeficienty) použitých v klasifikační analýze.

Tabulka 12: Klasifikační diskriminační analýza druhů *S. sudetica*, *S. querneae* a *S. hardeggensis*. Hodnota v prvním řádku u každého druhu je počet jedinců, na druhém řádku procentuální zastoupení z- celého druhu. Např. u *S. sudetica* je 22 jedinců zařazeno správně, což je 100% analyzovaných jedinců. V řádku „chybně zařazených“ je vyjádřeno procento chybně zařazených jedinců daného taxonu.

Tabulka 13: Kanonické korelační koeficienty všech druhů mimo *S. sudetica*, *S. querneae* a *S. hardeggensis*. Tučně jsou označeny znaky (spolu s odpovídajícími kanonickými korelačními koeficienty) použité v klasifikační analýze.

Tabulka 14: Klasifikační diskriminační analýza druhů *S. bohemica* a *S. rhodantha*

Tabulka 15: Kanonické korelační koeficienty analýzy druhů *S. alnifrons*, *S. eximia*, *S. gemella* a populací Knobloška a Milá. Tučně jsou označeny znaky (spolu s odpovídajícími kanonickými korelačními koeficienty) použité v klasifikační analýze.



Tabulka 16: Klasifikační diskriminační analýza *S. alnifrons*, *S. eximia*, *S. gemella* a populací Knobloška a Milá

Tabulka 17: Kanonické korelační koeficienty dvourozměrné diskriminační analýzy *S. alnifrons*, *S. eximia* a *S. gemella*. Tučně jsou označeny znaky (spolu s odpovídajícími kanonickými korelačními koeficienty) použité v klasifikační analýze.

Tabulka 18: Klasifikační diskriminační analýza druhů *S. alnifrons*, *S. eximia* a *S. gemella*

Tabulka 19: Kanonické korelační koeficienty analýzy *S. eximia*. Tučně jsou označeny znaky (spolu s odpovídajícími kanonickými korelačními koeficienty) použité v klasifikační analýze.

Tabulka 20: Klasifikační analýza populací *S. eximia*

Tabulka 21: Porovnání výsledků klasifikačních analýz vybraných znaků dle fenofází.

### **Molekulární metody**

Tabulka 22: Přehled použitých SSR primerů a jejich základní charakteristiky (sekvence, fluorescenční označení, rozsah velikosti amplifikovaného fragmentu, typ repetitivní sekvence, teplota annealingu).

Tabulka 23: Jednotlivé kroky při PCR

Tabulka 24: Výstup analýzy AMOVA z programu Arlequin pro porovnání populací.

Tabulka 25: Výstup analýzy AMOVA z programu Arlequin pro porovnání druhů.

Tabulka 26: Hodnoty vážené  $F_{ST}$  statistiky přes všechny lokusy mezi jednotlivými dvojicemi druhů rodu *Sorbus*, matice vypočítána jako *Number of pairwise difference* v programu Arlequin 3.01.

Tabulka 27: Vybrané hybridogenní druhy + *S. aria*, druhy k nim nejpodobnější a hodnota této rozdílnosti (*Number of pairwise difference*).

Tabulka 28: Vnitropopulační variabilita hybridogenních druhů v porovnání s rodičovskými druhy.

Tabulka 29: Mezidruhová variabilita hybridogenních a rodičovských druhů.

### **Klíč k určování hybridogenních endemických jeřábů**

Klíč je určen pouze pro hybridogenní druhy jeřábů se zřetelně laločnatými listy (+ *S. sudetica*) vyskytující se v České republice. Byl vytvořen na základě CDA a klasifikačních analýz morfologických znaků. Navíc byly do klíče přidány ověřené kvalitativní znaky (laločnatost listů, barva malvic apod.) dle údajů Kovandy (2002). Na prvním místě jsou uvedeny znaky výrazně odlišující jednotlivé skupiny / taxony, za pomlčkou následují znakové trendy. Uvedeny jsou údaje - (minimum-) dolní kvartil (25% jedinců) - horní kvartil (75% jedinců) (-maximum).

**1a** Listy celistvé, korunní lístky růžové, postranní žilky se ztrácejí před okrajem listu, délka řapíku (5,3-) 6,3-7,3 (-8,3) mm, délka prašníků (0,8-) 0,9-1,1 (-1,2) mm, rostliny horské. Endemit Krkonoš.

*S. sudetica* (TAUSCH) BLUFF, NEES et SCHAUER

**1b** Listy zřetelně laločnaté, korunní lístky bílé n. žlutobílé, postranní žilky dosahují až k okraji listu, délka řapíku (11,3-) 17-21,3 (-35,0) mm, délka prašníků (0,9-) 1,3-1,4 (-1,7) mm, 2.

**2a** Průměr malvic (7,8-) 9,2-9,7 (-10,9) mm, délka srostlé části čnělky (0-) 0,1-0,7 (-1,5) mm, čnělky srostlé do (0-) 10-20 (-40) % 3.

**3a** Laloky listů zaoblené, semeník polospodní, malvice červené, délka čepele (56-) 78-92 (-110) mm, maximální šířka jedné strany čepele (19-) 26-30 (-35) mm, délka malvic (8,7-) 9,7-10,3 (-11,2) mm. Endemit vrchu Jabloňka a Bílá skála v Praze.

*S. querneae* KOVANDA

**3b** Laloky listů výrazně špičaté, semeník spodní, malvice okrově žluté až bronzové, délka čepele (80-) 92-129 (-138) mm, maximální šířka jedné strany čepele (32-) 40-50 (-54) mm, délka malvic (12,4-) 12,8-13,1 (-13,9) mm. Endemit Podyjí.

*S. hardeggensis* KOVANDA

**2b** Průměr malvic (9,0-) 11,3-12,6 (-14,8) mm, délka srostlé části čnělky (0-) 1,4-2,2 (-3,5) mm, čnělky srostlé do (0-) 40-60 (-90) % 4.

**4a** Prašníky růžové, maximální šířka jedné strany čepele (32-) 39-44 (-47) mm, hloubka zářezu mezi 2. a 3. lalokem od báze čepele (4,3-) 7,7-9,7 (-12,0) mm. - Počet žilek na jedné straně listu (8-) 9-10 (-11), průměr malvic (11,6-) 12,7-12,8 (14,1) mm, šířka blizny (0,4-) 0,5-0,6 (-0,7) mm. Endemit Chlumské hory u Manětína.

*S. rhodanthera* KOVANDA

**4b** Prašníky bílé nebo bledožluté, maximální šířka jedné strany čepele (17-) 27-36 (-49) mm, hloubka zářezu mezi 2. a 3. lalokem od báze čepele (2,0-) 4,3-6,0 (-10,0) mm. - Počet žilek na jedné straně listu (6-) 8-9 (-11), průměr malvic (9,0-) 11,3-12,1 (14,8) mm, šířka blizny (0,5-) 0,6-0,7 (-0,9) mm **5.**

**5a** Maximální šířka jedné strany čepele (18-) 24-31 (-42) mm. - Počet laloků širších než 1cm (1-) 2-3 (-4), délka malvic (8,9-) 10,3-10,5 (-12,2) mm. Endemit Českého středohoří.

*S. bohémica* KOVANDA

**5b** Maximální šířka jedné strany čepele (17-) 32-39 (-49) mm. - Počet laloků širších než 1cm (2-) 3 (-4), délka malvic (10,4-) 12,3-12,6 (-14,2) mm, **6.**

**6a** Hloubka zářezu mezi 2. a 3. lalokem od báze čepele (2,5-) 3,7-4,9 (-7,7) mm, počet postranních žilek na jedné straně listu (6-) 7-8 (-9). - Šířka korunních lístků (3,8-) 4,6-4,9 (-5,2) mm. Endemit Českého krasu *S. eximia* KOVANDA

**6b** Hloubka zářezu mezi 2. a 3. lalokem od báze čepele (2,0-) 5,3-8,2 (-10,0) mm, počet postranních žilek na jedné straně listu (8-) 9-10 (-11). - Šířka korunních lístků (3,6-) 4,3-4,6 (-4,8) mm **7.**

**7a** Délka srostlé části čnělky (1,3-) 2,1-2,8 (-3,5) mm, čnělky srostlé do (40-) 50-70 (-90). - Délka kališních lístků (1,7-) 2-2,4 (-3,0). Endemit okolí hradu Templštyňa u Dukovan *S. alnifrons* KOVANDA

**7b** Délka srostlé části čnělky (0,0-) 1,2-1,5 (-2,4), mm, čnělky srostlé do (0-) 30-40 (-67) %. - Délka kališních lístků (2,4-) 2,5-3,2 (-3,8). **8.**



- 
- 8a** Maximální šířka jedné strany čepele (23-) 34-41 (-43) mm, šířka třetího laloku od báze čepele (8,3-) 11,3-13,8 (-16,0) mm, průměr malvic (10,9-) 11,9-12,0 (-13,0) mm. - Délka malvic (11,2-) 12,3-12,4 (-14,2) mm. Endemit hradiště nad obcí Konětopy u Loun ***S. gemella* KOVANDA**
- 8b** Maximální šířka jedné strany čepele (17-) 27-35 (-49) mm, šířka třetího laloku od báze čepele (6,7-) 8,7-10,7 (-14,7) mm, průměr malvic (12,0-) 12,7-13,7 (-14,8) mm. - Délka malvic (12,3-) 12,9-13,9 (-14,2) mm **9.**
- 9a** Maximální šířka jedné strany čepele (17-) 27-28 (-30) mm, šířka třetího laloku od báze čepele (6,7-) 8,3-9,3 (-11,7) mm. **populace Knobloška**
- 9b** Maximální šířka jedné strany čepele (30-) 33-38 (-49) mm, šířka třetího laloku od báze čepele (9,7-) 10,4-12,0 (-14,7) mm. **populace Milá**