

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Botanika

Studijní obor: Cévnaté rostliny



Tereza Koberová

Lokální edafické adaptace v okruhu *Minuartia verna*

Local edaphic adaptation in the *Minuartia verna* group

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Jindřich Chrtek, CSc.

Konzultantka: RNDr. Veronika Lipánová Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

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

V Praze, 10. 8. 2023

Tereza Koberová

Poděkování

Tato diplomová práce by nevznikla bez pomoci mnoha osob. Nejdříve bych ráda poděkovala svému školiteli Jindrovi Chrtkovi za ochotu a trpělivost při vedení mé diplomové práce a za veškerou pomoc, která byla potřeba s realizací tohoto projektu.

Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Verče Lipánové za pomoc při experimentech a jejich vyhodnocování a za rady po celou dobu řešení diplomové práce. Její nasazení a touha po vědeckém poznání je pro mě vzorem.

Poděkování si zaslouží i zahradníci David a Mírek, kteří mi pomáhali s výsevem rostlin a pak se v Průhonicích o moje rostlinky během experimentu pečlivě starali. Dále děkuji Ivaně Plačkové z analytické laboratoře v Průhonicích za analýzy půd. Anně Krejčové a Dagmar Kopicové z Fakulty chemicko-technologické UPCE děkuji za analýzy rostlinného materiálu a za milý přístup, když jsem u nich byla na stáži.

Největší poděkování určitě patří mé rodině a blízkým kamarádům, kteří mi pomáhali při terénních pracích i odečítání dat v průběhu experimentu a všestranně mě podporovali při mém studiu.



Abstrakt

Rostliny, které svůj metabolismus přizpůsobily životu na půdách obsahujících těžké kovy, jsou vhodnými kandidáty pro studium lokálních adaptací. Ačkoliv půdy obsahující těžké kovy a rostliny, které na nich rostou, přitahují pozornost botaniků už několik desítek let, neexistuje dostatečný počet studií, které by se zabývaly ekologicko-evolučními otázkami souvisejícími s pre-adaptací rostlin na tyto náročné podmínky.

Tato práce se zabývá druhem *Minuartia verna*, jež zahrnuje populace rostoucí na důlních výsypkách, populace rostoucí na hadci a populace rostoucí na netoxických substrátech. Lokální adaptace a pre-adaptace byly studovány pomocí recipročního kultivačního experimentu zahrnujícího populace, které reprezentují každou ze tří výše zmíněných skupin. U rostlin bylo sledováno několik vegetativních a generativních znaků, ze kterých byla vypočtena *fitness* rostlin. Z porovnání měřených znaků a *fitness* rostlin mezi populacemi a půdami, ve kterých rostliny byly pěstovány vyplývá, že nemetaliferní populace nejsou pre-adaptovány pro růst v půdách kontaminovaných těžkými kovy v důsledku těžby. Všechny populace však dobře prospívaly v hadcové půdě, což znamená že jsou geneticky adaptovány na hadcový substrát. Metaliferní populace prospívaly ve všech typech metaliferních půd, ale dvě z nich měly horší *fitness* v jedné z vápencových půd než v metaliferních půdách. Z analýzy obsahu kovů v rostlinách vyplývá, že se jedná o vylučovače Ni a Pb, koncentrace těchto kovů v kořenech byly větší než v listech. V případě těchto dvou kovů byly pozorovány podobné trendy v akumulaci napříč všemi populacemi. Množství absorbovaného Zn v kořenech nemetaliferních rostlin bylo v půdách s vysokým množstvím Zn větší než u rostlin metaliferních populací, což může vypovídat o chybějící adaptaci těchto populací k vysokým koncentracím Zn v půdě.

Výsledky naznačují, že by celá linie zahrnující nížinné populace střední Evropy byla pre-adaptovaná na hadcový substrát a metaliferní populace rostoucí na výsypkách se adaptovaly na půdy s těžkými kovy až během jejich kolonizace.

Klíčová slova

Minuartia, Caryophyllaceae, lokální adaptace, těžké kovy, hadce.

Abstract

Plants that have adapted their metabolism to life in soils containing heavy metals are suitable candidates for studying local adaptation. Although soils containing heavy metals and the plants that grow in them have attracted the attention of botanists for several decades, there is a lack of studies that address the ecological-evolutionary questions related to the pre-adaptation of plants to these challenging conditions.

This work focuses on the species *Minuartia verna*, which includes populations growing in mine dumps, populations growing in serpentinite, and populations growing in non-toxic substrates. Local adaptation and pre-adaptation were studied using a reciprocal experiment involving populations representing each of the three aforementioned groups. I measured several vegetative and generative plant traits, *fitness* was then calculated based on these traits. A comparison of plant *fitness* of the populations grown in different soils suggests that non-metallicolous populations are not pre-adapted to grow in soils contaminated with heavy metals. However, all populations thrived well in serpentine soil, indicating a genetic adaptation to this substrate. The analysis of metal content in plants indicates that they function as excluders of Ni and Pb, with higher concentrations of these metals found in the roots compared to the leaves. Similar trends in accumulation of these two metals were observed across all populations. The amount of absorbed Zn in the roots of non-metallicolous plants was greater in soils with high Zn content compared to plants from metallicolous populations, which might suggest a lack of adaptation in these populations to high Zn concentrations in the soil.

The results suggest that the entire lineage including lowland Central European populations may have been pre-adapted to serpentine substrates. These metallicolous populations growing in mine tailings possibly adapted to heavy metal-rich soils later during that colonization.

Key words

Minuartia, Caryophyllaceae, local adaptation, heavy metals, serpentinites.

Obsah

Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Klíčová slova	4
Abstract.....	5
Key words	5
1. Úvod.....	7
1.1 Adaptace rostlin na půdy obsahující těžké kovy	8
1.2 <i>Minuartia verna</i> – pozoruhodný model pro studium edafické adaptace.....	16
1.2.1 Hypertolerance k těžkým kovům	19
1.2.2 Proč studovat edafickou adaptaci v okruhu <i>Minuartia verna</i> ?	21
2. Cíle práce	25
3. Materiál a metody	26
3.1 Výběr populací pro experimenty.....	26
3.2 Materiál	27
3.3 Metody	28
4. Výsledky	36
4.1 Analýza půd	36
4.2 Reciproční experiment I.....	38
4.3 Prvková analýza rostlin.....	52
5. Diskuze	59
5.1 Lokální adaptace okruhu <i>Minuartia verna</i>	59
5.2 Jak rostliny řeší přítomnost těžkých kovů.....	62
6. Závěr	65
7. Literatura.....	67
8. Přílohy.....	75

1. Úvod

Změna podmínek prostředí je jedna z častých situací, se kterou se organismy musí vypořádat. Živočichové schopní pohybu mohou jednoduše nevhodné prostředí opustit a přesunout se do prostředí příznivějšího, pokud takové v dostupné vzdálenosti existuje. Příkladem mohou být stěhovaví ptáci, kteří na zimu odlétají do jiných částí světa, kde je pro ně v tuto dobu přijatelnější klima. Rostliny se však vyznačují sesilným způsobem života a jejich migrační rychlost je velmi omezená, proto se musí změnám prostředí přizpůsobit. Ty, které se nepřizpůsobí, nejspíše vyhynou. Adaptace na nové nebo měnící se prostředí je tedy klíčovým mechanismem evoluce rostlin (Davis, Shaw & Etterson, 2005).

Jedním ze způsobů adaptace rostlin na různé podmínky je fenotypová plasticita, kdy rostlina se stejným genotypem dokáže vytvářet různé fenotypy v závislosti na prostředí, ve kterém se nachází (Bradshaw, 1965; Schlichting & Levin, 1986). V jiném případě může dlouhodobý a výrazný tlak prostředí vést až k adaptaci rostlin na konkrétní nové podmínky. Dochází ke změnám genetické informace, které se odráží ve vlastnostech vedoucích ke zvýšení biologické zdatnosti (*fitness*) rostlin ve vlastním prostředí v porovnání s cizím prostředím a domácí genotyp je proto ve výhodě oproti genotypu z cizí oblasti; tento proces se nazývá lokální adaptace (Kawecki & Ebert, 2004). Na druhou stranu však adaptované rostliny mohou ztratit schopnost prosperovat v původním prostředí tzv. *trade-off* (Hereford, 2009). Právě tato dědičná fenotypová diferenciace mezi populacemi přitahuje pozornost evolučních biologů už po desetiletí.

Vyrovnaní se s biotickými a abiotickými faktory prostředí umožnilo některým rostlinám obývat nehostinná místa a s nimi spojené extrémní podmínky prostředí zahrnující například teplotu (Griffith et al., 2007; Wang et al., 2016), dostupnost a množství vody (Knight et al., 2006; Giménez-Benavides et al., 2007), sluneční záření (Eshel et al., 2017; Huaranca Reyes et al., 2020) či chemické složení půdy (MacNair, 1983; Babst-Kostecka et al., 2016; Bisschop et al., 2019). Studium těchto adaptací může přinést zajímavé informace s ohledem na měnící se klima nebo na změnu prostředí vlivem průmyslu (Davis, Shaw & Etterson, 2005; Flowers & Colmer, 2015), které lze uplatnit v zemědělství nebo ochraně přírody. V budoucnu nám získané informace umožní lépe předpovídat chování rostlin s ohledem na náhlé změny prostředí související především s lidskou činností a my budeme schopni na tyto změny rychleji a vhodněji reagovat.

1.1 Adaptace rostlin na půdy obsahující těžké kovy¹

Pro moji diplomovou práci jsem si vybrala přítomnost toxických kovů v půdě jako hlavní faktor, se kterým se rostliny musí vypořádat, jelikož stanoviště bohatá na obsah těžkých kovů se řadí mezi jedny z nejextrémnějších prostředí pro růst rostlin. V těchto podmínkách dokážou přežít a rozmnožovat se pouze rostliny, které dokázaly svůj metabolismus adaptovat takovým způsobem, aby se vyrovnaly s přítomností iontů těžkých kovů ve svých pletivech. Také se však musely přizpůsobit i na další nepříznivé abiotické faktory těchto prostředí, zejména na nedostatek vody a vysoké teploty (Rajakaruna, 2018). Ačkoliv řada kovů spadá mezi stopové prvky (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni a Zn), které jsou pro růst a vývoj rostlin nezbytné, neumí si většina rostlin s vyšším množstvím těchto prvků v půdě poradit, takže se pro rostliny stávají toxické. Další těžké kovy, jako je například Al, Cd, Cr, Hg a Pb jsou pro rostliny toxické i ve velmi malých koncentracích (Ernst, 2006; Singh, Kumar & Agarwal, 2013).

Některé půdy přirozeně obsahují vyšší koncentrace určitých těžkých kovů v důsledku geologických procesů a geologického složení daného území. Jako příklad mohou být zmíněny oblasti s vulkanickou činností (Wang et al., 2020), oblasti tvořené podložím z černé břidlice (Peng et al., 2004) nebo hadce (Proctor & Woodell, 1975). Často se však můžeme s těžkými kovy v půdě setkat jako důsledek znečištění spojený s lidskou činností zahrnující těžbu a zpracování rud, používání chemikálií v zemědělství nebo nesprávné zpracování odpadu (Duruibe, Ogwuegbu & Egwurugwu, 2007; Huang et al., 2007). Dále se budu podrobněji zabývat oblastmi s hadcovým podložím a důlními oblastmi.

1.1.1 Hadce a výsyvky jako ostrovy těžkých kovů

Hadec je z biologického hlediska tmavá hornina, která vzniká přeměnou (serpentinizací) bazických a ultrabazických vyvěřelých hornin obsahujících především minerály olivín, amfíbol nebo hořečnaté pyroxeny. Při procesu přeměny dochází za vysokého tlaku a relativně nízkých teplot (nejčastěji do 500 °C) k hydrataci původní horniny a minerálů za vzniku hadce, původní minerály jsou nahrazeny skupinou

¹ Jako těžké kovy zde budou označovány potenciálně toxické prvky jako hliník, (Al), arsen (As), kadmium (Cd), kobalt (Co), chrom (Cr), měď (Cu), železo (Fe), rtuť (Hg), mangan (Mn), molybden (Mo), nikl (Ni), olovo (Pb), cín (Sn) nebo zinek (Zn).

serpentinů², magnetitem, brucitem, mastkem a dalšími méně zastoupenými minerály (Proctor & Woodell, 1975; Moody, 1976; Harrison & Rajakaruna, 2011; Evans, Hattori & Baronnet, 2013).

Stejně jako existovala různorodost a rozdílný obsah minerálů původních hornin, tak se i hadce mezi sebou mohou lišit v chemickém složení. Hlavní složkou je vodnatý křemičitan hořečnatý ($\text{Mg}_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$), dále zde může být proměnlivý obsah železa a v malém množství je zde zastoupen i nikl, chrom a kobalt (Whittaker, 1954; Oze, 2004; Brady et al., 2005). Rostliny rostoucí na hadci se kromě přítomnosti iontů těžkých kovů musí potýkat s další výzvou, v půdě se nachází několikanásobně vyšší množství hořčíku ve srovnání s vápníkem ($\text{Ca}/\text{Mg} < 1$), což je přesně opak toho, s čím se setkáváme u běžných půd. Dalším důležitým faktorem je nedostatek makroživin, jako je dusík, fosfor a draslík (Walker, Walker & Ashworth, 1955; Proctor & Woodell, 1975).

Kromě chemických specifik těchto lokalit hrají roli i fyzikální faktory, včetně mnohdy členitého terénu, sucha způsobeného vysokou propustností substrátu a výparem vody z povrchu půdy, ke kterému zde dochází v důsledku řídké vegetace. Otevřená vegetace těchto biotopů dále vystavuje rostliny intenzivnímu slunečnímu záření a na strmých svazích dochází k časté erozi. Významné jsou i teplotní výkyvy, tmavá barva horniny způsobuje přehřívání substrátu za slunečního počasí, naopak v noci rychle vychladne (Whittaker, 1954; Proctor & Woodell, 1975).

Souhrn abiotických (chemických a fyzikálních) a biotických podmínek, které na hadcových lokalitách panují bývá označován jako „hadcový syndrom“ (Jenny, 1980). U rostlin adaptovaných k hadcovému prostředí se setkáváme s častými morfologickými změnami oproti rostlinám téhož druhu rostoucím v netoxickém prostředí. Příkladem těchto změn mohou být xeromorfní listy, které jsou malé, sivě zbarvené, hustě oděné, nebo naopak lysé, aby zabránily odparu vody a chránily rostlinu před herbivory. Dále je u rostlin pozorován celkově menší vzrůst způsobený nedostatkem vody a živin, které přijímají pomocí vyvinutějšího kořenového systému (Brady et al., 2005). Tento trend je výrazný hlavně v oblastech s teplým klimatem s nízkými úhrny srážek. Menší rozdíl mezi hadcovou a nehadcovou vegetací je pozorován v chladnějších klimatických podmínkách, které nejsou náchylné k vysychání (Teptina et al., 2018).

² Skupinou serpentinů jsou označovány příbuzné minerály vniklé serpentizací, jejich chemické složení je dáno obecných vzorcem $\text{X}_{2-3}\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ kdy X = Mg, Fe, Ni, Mn nebo Zn. Mezi nejvýznamnější minerály serpentinů spadají antigorit, lizardit a chrysotil (Moody, 1976).

Hadce můžeme nalézt po celém světě, tvoří zhruba jedno procento zemského povrchu (D'Amico et al., 2015), ale vyskytují se spíše jako jednotlivé rozptýlené ostrůvky, které netvoří objemná rozsáhlá tělesa. Každá hadcová hornina je však specifická, kromě různého chemického složení se liší také klimatickými podmínkami na daném území, geomorfologií povrchu a hloubkou půdy (Harrison & Rajakaruna, 2011). Hadcové oblasti máme i v Česku, nejznámější je hadec tvořící Mohelenskou hadcovou step na jihozápadní Moravě (Obrázek 1), nejrozsáhlejší hadcovou oblastí jsou Mnichovské hadce ve Slavkovském lese.



Obrázek 1: Mohelenská hadcová step; fotografie: Tereza Koberová

Půdy s neobvykle vysokými koncentracemi těžkých kovů můžeme nalézt také na stanovištích, které vznikly v důsledku těžby rudy (Obrázek 2). Těžební a důlní činnost probíhá na Zemi už po několik staletí a má za následek odkrývání podloží a díky vyvážené hlušině také distribuci těžkých kovů (například As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb nebo Zn) do okolní krajiny, přičemž zastoupení kovů v půdě závisí na lokálním podloží (Antonovics, Bradshaw & Turner, 1971). Bylo zjištěno, že potenciál kontaminace půdy těžkými kovy je vyšší při těžbě a zpracování rud nežli při pouhém odkrývání kovonosných rud erozí (Duruibe, 2007).

Na výsypkách a v jejich okolí se setkáváme s podobnými stresovými faktory jaké byly zmíněny u hadců – vysoká koncentrace těžkých kovů (zde zejména Cd, Cu, Pb a Zn), nízká koncentrace makroživin, nedostatek vody a exponovaný terén (Monterroso, 2014).



Obrázek 2: Výsypka bývalého dolu (Pb, Zn, Ag) u města Clausthal-Zellerfeld, Německo;
fotografie: Tereza Koberová

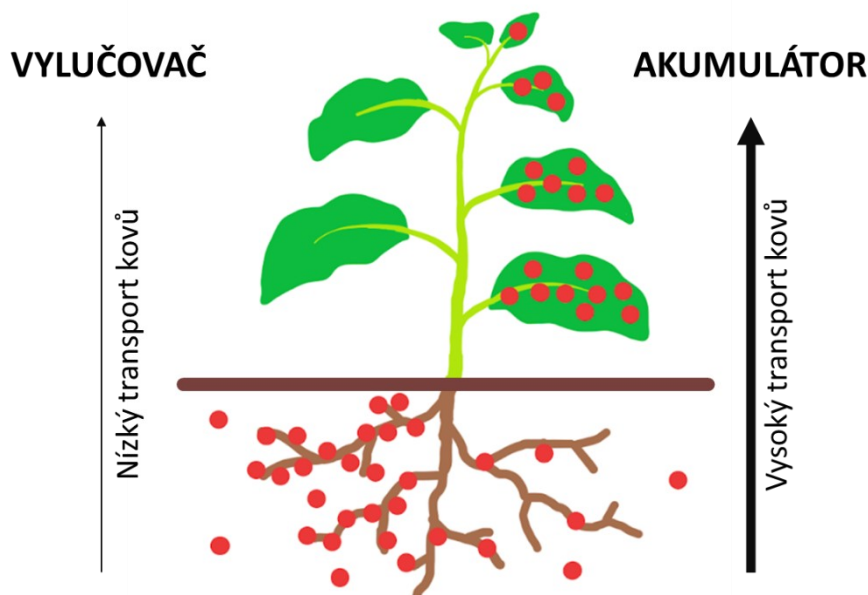
Podobně jako hadcové podloží jsou těžební oblasti roztroušené v podobě malých ostrůvků. Na rozdíl od hadců, u kterých měly rostliny dostatek času na postupnou adaptaci (postglaciální kolonizace hadců u *Arabidopsis arenosa* - Konečná et al. 2021), zde těžba probíhá v řádu desetiletí, rostliny se do stresových podmínek dostávají nárazově, a to má za následek zvýšení selekčního tlaku na adaptaci rostlin v krátkém časovém úseku (*Silene uniflora* - Papadopulos 2021; Ernst, 2006). Jsou tedy ideálním modelovým systémem pro studium rychlých adaptací na náhlou změnu podmínek prostředí pod silnou selekcí.

1.1.2 Metalofyty

Ionty těžkých kovů přijaté rostlinami do svých pletiv mohou mít různé, navzájem kumulativní nežádoucí účinky. Přítomnost kovů může vést ke změně chemické a fyzikální struktury membrán, ionty kovů se mohou vázat na thiolové skupiny ($-SH$) enzymů, změnit jejich strukturu a tím je deaktivovat nebo dokáží nahradit funkční prostetickou skupinu³ enzymu a tím ho učinit neaktivním. Volné ionty těžkých kovů také značně přispívají k tvorbě reaktivních forem kyslíku (Foy, Chaney & White, 1978; Hall, 2002; Bothe, 2011; Peralta-Videa et al., 2009).

³ Prostetická skupina je kofaktor, který je tvořen nízkomolekulární nebiřkovinnou složkou enzymu a umožňuje jeho katalytický účinek. Prostetická skupina je nejčastěji na tento enzym pevně vázána kovalentní vazbou.

I přes všechny zmíněné nepříznivé podmínky, které panují na stanovištích bohatých na těžké kovy, se najdou rostliny, které si osvojily mechanismy, jak se ubránit iontům těžkých kovů nebo se přizpůsobit na jejich obsah ve svých pletivech (metalofyty). Baker (1981) rozdělil metalofyty do tří kategorií podle způsobu nakládání rostlin s těžkými kovy: vylučovače (*excluders*), indikátory (*indicators*) a akumulátory (*accumulators*).



Obrázek 3: Obecné strategie tolerance vůči těžkým kovům. Vlevo je znázorněn typ vylučovače (*excluder*), který zabraňuje přesunu kovů do nadzemní části rostliny, vpravo je akumulátor, který naopak kovy v nadzemní části rostliny akumuluje. Ionty kovů znázorňují červené body.

Vylučovače (*excluders*, Obrázek 3, vlevo) zabraňují iontům těžkých kovů vstoupit do nadzemní části rostliny potlačením transportu z kořenů do prýtu, to se projevuje nižším poměrem obsahu prvku v prýtu než v kořenech ($[M]_{\text{list}} / [M]_{\text{kořen}} < 1$; Baker, 1981). Rostliny přijaté kovy buď detoxifikují v kořenech, kde je následně v inaktivní formě skladují nebo je aktivně vylučují zpět do půdy. Některé rostliny ionty kovů zadržují hned v buněčné stěně kořenů anebo eliminují samotný příjem kovů (Hossain et al., 2012; Muszyńska et al., 2019). Do této skupiny spadá *Arabidopsis halleri* (Ni, Pb, Cu; Dahmani-Muller et al., 2000), *Biscutella didyma* (Zn; Peer et al., 2006), *Lycopersicon esulentum* (Cd; Zhu et al., 2011), *Silene vulgaris* (Pb; Sieghardt, 1990) *Zea mays* (Al; Kidd et al., 2001) a mnoho dalších (Wei, Zhou & Wang, 2005).

Indikátory (*indicators*) přijímají a transportují těžké kovy do nadzemní části rostliny ve střední míře a koncentrace kovu v půdě je podobná jako koncentrace kovu v rostlině ($[M]_{\text{list}} / [M]_{\text{kořen}} \approx 1$; $[M]_{\text{list}} \approx [M]_{\text{kořen}} \approx [M]_{\text{půda}}$; Baker, 1981).

Akumulátory (*accumulators*, Obrázek 3, vpravo) absorbované ionty těžkých kovů aktivně přenášejí ať už v aktivní, nebo chelatované formě z kořenné části do prýtu, kde jsou uskladněny v místech se sníženou biochemickou aktivitou, tedy například ve vakuolách bez příznaků fytotoxicity (Baker & Brooks; 1989; Rascio & Navari-Izzo, 2011). Koncentrace prvku v listech je tedy vyšší než koncentrace v kořenech ($[M]_{\text{list}} / [M]_{\text{kořen}} > 1$). V případě, že je koncentrace kovů v sušené biomase rostlin mohanásobně vyšší než v půdě (Tabulka 1), jsou tyto rostliny nazývány jako hyperakumulátory (Reeves et al., 2018). Je známo přes 720 druhů rostlin, které se řadí mezi hyperakumulátory, z toho většina (přes 530 druhů) hyperakumuluje nikl, který se přirozeně nachází v půdě hadcových oblastí. Mezi nejvíce studované druhy patří *Arabidopsis halleri* (Cd, Zn; Küpper et al., 2000), *Noccaea caerulescens* (Ni, Zn, Cd; Assunção, Schat & Aarts, 2003) nebo *Alyssum bertolonii* (Ni; Robinson et al., 1997).

Tabulka 1: Obsah kovů v rostlině určující hyperakumulaci. U každého prvku je kromě limitní hodnoty hyperakumulace také počet čeledí a druhů rostlin, které daný kov hyperakumulují.

Prvek	Hyperakumulace	Počet čeledí	Počet druhů
Arsen (As)	$> 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	1	5
Hořčík (Mg)	$> 10\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	16	42
Kadmium (Cd)	$> 100\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	6	7
Kobalt (Co)	$> 300\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	18	42
Měď (Cu)	$> 300\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	20	53
Nikl (Ni)	$> 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	52	532
Olovo (Pb)	$> 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	6	8
Selen (Se)	$> 100\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	7	41
Thalium (Tl)	$> 100\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	1	2
Zinek (Zn)	$> 3\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	9	20

Zdá se, že život rostlin v půdách s těžkými kovy je velmi obtížný a energeticky náročný. Proč rostliny zvolily tuto strategii a přináší jim adaptace na půdy obsahující těžké kovy nějaké výhody? Jsou známy příklady (*Arabidopsis kamchatica*, *Noccaea caerulescens*, *Rumex acetosa*), kdy rostlina obsah těžkých kovů ve svém těle využívá jako zbraň před herbivory (Harflett, 2012; Cabot et al., 2019; Shimizu-Inatsugi et al., 2020). Rostliny také mohou využívat alelopatii, kdy listový opad (bohatý na těžké kovy) v okolí

rostliny znemožňuje růst semenáčků rostlin citlivých na těžké kovy (Jaffe, Ketterer & Shuster, 2018). Jak už bylo zmíněno, na metaliferních lokalitách roste jen omezený počet rostlin a není zde téměř žádná konkurence, daří se zde i rostlinám, které by v obvyklém hustém a velmi konkurenčním porostu neměly šanci přežít (Roberts & Proctor, 1992).

I člověk si našel několik výhod, které mu rostliny hyperakumulující těžké kovy mohou nabídnout. Dříve se přemýšlelo nad bio-těžbou kovových rud, při které by se žádoucí kov získával extrakcí z hyperakumulačních rostlin (Brooks et al., 1998), v tuto dobu se však jedná o velmi neekonomickou a složitou variantu oproti klasické těžbě. Tyto rostliny však mohou sloužit jako indikátory rud, které následně mohou být zpracovány běžnými metodami (Antonovics, Bradshaw & Turner, 1971; Brooks, Holzbecher & Ryan, 1981). Mnoho lidí se zabývá, jak lze hyperakumulační rostliny využít při fytoremediaci, tedy technologii využívající rostliny k detoxifikaci znečištěných půd nebo vodních zdrojů (Islam et al., 2021). Všechny rostliny tolerující přítomnost kovů lze potenciálně využít k rekultivaci bývalých dolů a výsypek (Antonovics, Bradshaw & Turner, 1971), což by bylo mohlo být jednodušší, levnější a zajímavější než u běžných komerčních přístupů, kdy časté zarovnání povrchu a vysetí komerčních travních směsí má za následek ochuzení pestrosti druhů a stanovišť.

1.1.3 Genetický základ adaptace rostlin na půdy s těžkými kovy

V předchozí kapitole byly popsány rostliny, které se adaptovaly na různé typy metaliferních půd a byly zmíněny základy mechanismů, které umožňují toleranci rostlin k těžkým kovům. Všechny biochemické a morfologické projevy však mají svůj základ v jejich genetické informaci. Adaptace rostlin k přítomnosti těžkých kovů je často studované téma, ale o genetické podstatě tohoto procesu je zatím známo jen málo informací, ty se většinou týkají hlavně modelových druhů tolerantních rostlin.

Genetická podstata akumulace těžkých kovů byla zkoumána mimo jiné na modelovém rodu *Arabidopsis*, u něhož je znám celý genom. Konkrétně jde o druh *Arabidopsis halleri*, který vykazuje toleranci k půdám bohatých na Zn a Cd a zároveň se jedná o hyperakumulátora těchto kovů (Peer et al., 2006). Populace *A. halleri* ssp. *halleri* se vyskytují na půdách kontaminovaných Zn a Cd, např. v pohoří Harz v Německu, můžeme však najít i populace *A. halleri* na ne-metaliferních půdách, často na vápníkem chudých půdách v horských oblastech (např. Český les nebo švýcarské Alpy; Bert et al.,

2002). Hyperakumulace kovů byla pozorována jak v metaliferních, tak v ne-metaliferních populacích, v případě akumulace Zn bylo pozorováno, že 16–40 % jedinců vykazuje hyperakumulaci Zn ($> 10\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; vztaženo na dřívější hodnotu pro hyperakumulaci Zn) a 10–33 % jedinců dosáhlo hranice pro akumulaci Cd ($> 100\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), přičemž hyperakumulace byla pozorována i u řady jedinců pocházejících z nekontaminovaných stanovišť (Bert et al., 2002). Bylo zjištěno, že za hyperakumulaci Cd a Zn je v jisté míře zodpovědný *HMA4* (Heavy Metal ATPase 4) gen (Hanikenne et al., 2008). Tento gen kóduje protein, který spadá do přenašečů těžkých kovů ze skupiny ATPáz P-typu, umožňující přenos Cd^{2+} a Zn^{2+} z pericyklu a xylemu parenchymatických buněk do apoplastického xylemu, což vede k přesunu těchto iontů z kořenů do listů (Talke, Hanikenne & Krämer, 2006; Courbot et al., 2007; Hanikenne et al., 2008). Úspěch hyperakumulujícího druhu *A. halleri* spočívá ve vysoké transkripci *HMA4* a také skutečnosti, že se tento gen u této rostliny vyskytuje ve třech kopiích, což vede k přenosu většího množství iontů těžkých kovů (Talke, Hanikenne & Krämer, 2006; Hanikenne et al., 2008). Za hyperakumulaci Zn je u *A. halleri* dále zodpovědný gen kódující přenašeč *MTP1* (metal tolerance protein 1, také známý jako *ATCDF1* nebo *ZAT1*) nacházející se v membránách vakuol v listech, který umožňuje antiport Zn^{2+} a H^+ iontů (Becher et al., 2004, Dräger et al., 2004). Podobnost v genetické podstatě hypertolerance a hyperakumulace Cd a Zn lze nalézt například u druhu *Noccaea caerulea*, u kterého se na hyperakumulaci podílejí geny *HMA4* a *ZTP1*, což je gen blízký příbuzný *MTP1* (uveden výše) nacházející se u rodu *Arabidopsis* (Fernandes, 2010; Krämer, 2010; Lochlainn et al. 2011). Rod *Arabidopsis* je tolerantní také vůči zvýšené koncentraci mědi, tuto schopnost umožňují geny kódující ATPázy (*HMA5*), a také geny kódující metalothioneiny (*MT*), což jsou peptidy vázající ionty těžkých kovů v buňce, a tak ji chrání před toxickými efekty těchto kovů (Guo, Bundithya & Goldsbrough, 2003; Andrés-Colás et al., 2006).

Dalším zajímavým rodem, u kterého je snaha zjistit genetickou podstatu tolerance na těžké kovy je *Silene*. Druh *S. vulgaris* je fakultativní metalofyt vyskytující se na hadcových a metaliferních půdách po celé Evropě, jeho metaliferní populace jsou hypertolerantní na Zn, Cd, Cu a Ni, narozdíl od ne-metaliferních populací (Bringezu et al., 1999; Li et al., 2017). Tolerance vůči mědi je zajištěna například pomocí genů kódujících metalothioneiny (*MT*), stejně, jako u rodu *Arabidopsis* (van Hoof et al., 2001; Mengoni et al., 2003). Na toleranci se podílejí i ATPázy *HMA5I* a *HMA5II*, které jsou podobné

HMA5 u *Arabidopsis*, avšak odpovídají jinému mechanismu. *HMA5I* sídlí v tonoplastu a vychytává Cu do vakuoly, zatímco *HMA5II* se nachází v endoplazmatickém retikulu, odkud přechází do plazmatické membrány a vylučuje Cu z buňky (Li et al., 2017). Mechanismus tolerance Zn však u rodu *Silene* není zatím dobře objasněný. Podle nejnovějších studií metaliferních a nemetaliferních populací tuto schopnost umožňují tři geny, *PSD2* kódující fosfatidylserin dekarboxylázu, *WRKY23* kódující transkripční faktor, který zvyšuje koncentraci chelatačního činidla quercetinu, a *RWPI*, který je nutný pro produkci suberinu (Papadopoulos et al., 2021).

Studium genetické podstaty adaptací je teprve v počátku a ve velké míře se provádí hlavně na modelových druzích, jejichž genetická informace je dobře prozkoumána. Jiné druhy mohou mít vyvinuté naprosto odlišné mechanismy vypořádání se s přítomností těžkých kovů v půdě a proces adaptace těchto druhů a pochopení genetické podstaty by mohl přinést zajímavé informace. Nové poznatky by dále mohly být aplikovatelné například v zemědělství nebo ochraně přírody s ohledem na neustálou přítomnost člověka v krajině a jeho nešvarem tuto krajinu měnit nebo znečišťovat a tím přispívat ke změně klimatu.

1.2 *Minuartia verna* – pozoruhodný model pro studium edafické adaptace

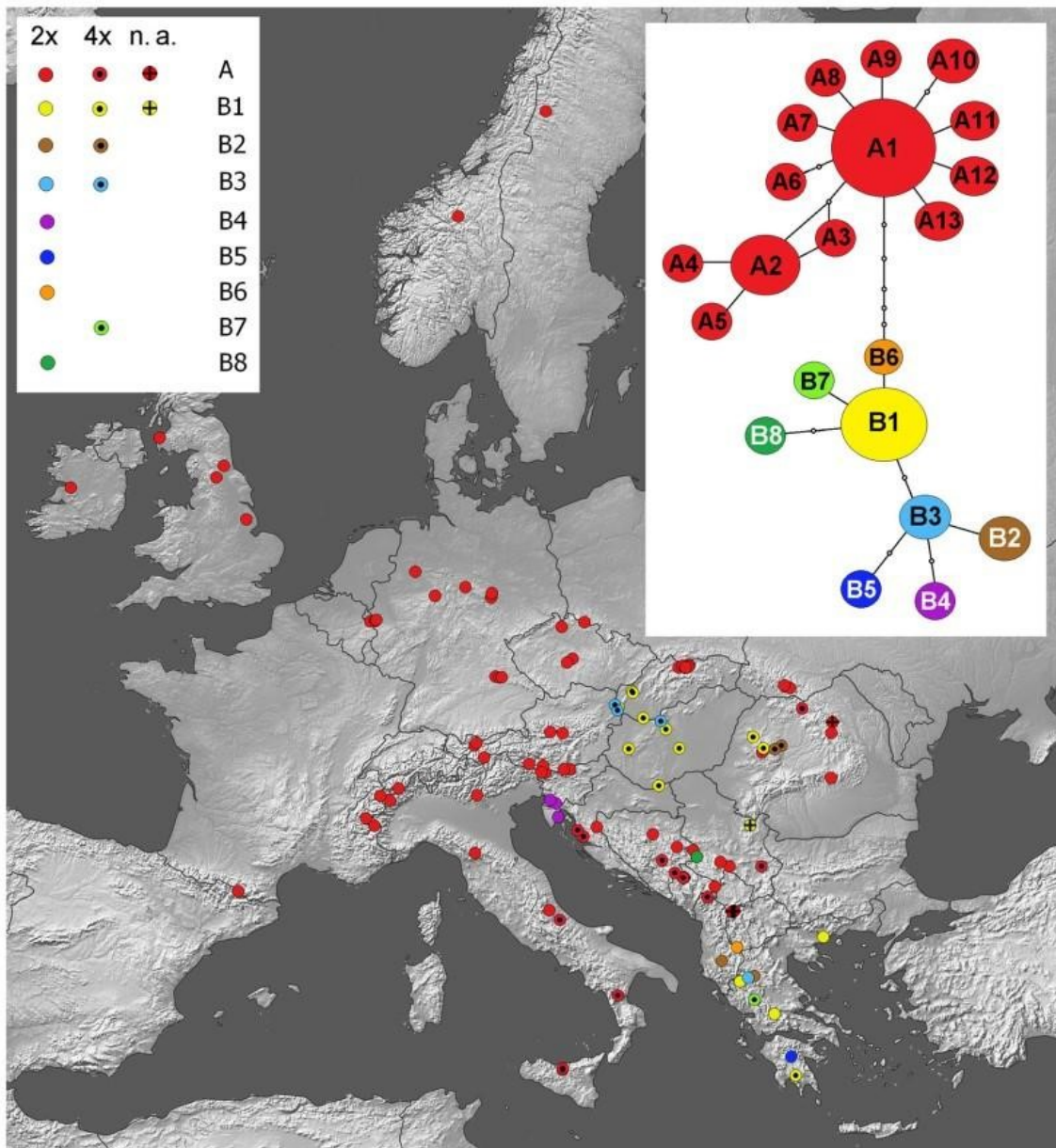
Pozoruhodnou skupinou rostlin, kterou lze často nalézt na stanovištích obsahujících v půdě těžké kovy je okruh *Minuartia verna* (Obrázek 4) z čeledi Caryophyllaceae (Hayek, 1922; Rune 1953; Rüter 1957; Barry & Clark, 1978; Kelepertsis & Andrulakis, 1983; Baker & Proctor, 1990). Jedná se o trsnaté nebo polštářovité, sytě nebo sivě zelené byliny, které mohou mít zdřevnatělou bázi. Listy jsou vstřícné, čárkovité, šídlovitě až úzce kopinaté a trojžilné. Květy jsou uspořádané v řídkých vrcholících. Kališní lístky jsou špičaté, z převážné části zelené s nevýrazným, úzkým blanitým lemlem, vždy alespoň na bázi žláznaté. Korunní lístky jsou bílé, o jednu třetinu kratší až delší než kališní, eliptické až téměř okrouhlé, někdy trojúhelníkovité s nápadným zúžením na bázi, nehet je nanejvýš 1 mm dlouhý. Semena bývají v obrysu okrouhle ledvinitá, 0,4–1,4 mm široká, celá nebo alespoň na hřbetu papilnatá (Dvořáková, 2000). Rostliny jsou vytrvalé, stáří některých rostlin může dosahovat až třiceti let (Verkleij, Lugtenborg & Ernst, 1988). Přestože rozmnožovací systémy tohoto

okruhu nebyly blíže studovány, protogynní květy naznačují, že rostliny upřednostňují opylení pylem z jiných rostlin (Stojanova et al. 2021).



Obrázek 4: *Minuartia verna*; fotografie: Tereza Koberová

Rozšíření této skupiny je souvislé v arktických oblastech a ostrůvkovitě v evropských, asijských a severoamerických pohořích, v menší míře je zastoupena ale i na vhodných lokalitách v nížinách a pahorkatinách. I když se lokality, na kterých *M. verna* roste, výrazně liší, ať už typem podloží nebo nadmořskou výškou, vždy se jedná o místa se sníženou kompeticí ostatních rostlin (Dvořáková, 2000). Zároveň to jsou otevřená stanoviště, jelikož *M. verna* špatně prospívá v zastíněném terénu (Schubert, 1954). Mezi tyto lokality patří vysokohorské polohy (v Evropě zejména Alpy, Karpaty a Pyreneje), ale i stanoviště v nížinách, na kterých se dlouhodobě nenachází lesní porost (velmi členitý terén, oblasti s přirozeným výskytem těžkých kovů v půdě – především hadce) nebo sekundární antropogenní stanoviště vázaná na důlní činnost. Dále pak roste i na vápencových půdách bez zvýšeného obsahu těžkých kovů (Dvořáková, 2000). Předpokládáme, že se jedná o interglaciální (holocénní) refugia pro rostliny, jejichž souvislé rozšíření spadá hlavně do glaciálu. Na těchto místech hledají útočiště v dnešních, pro ně nepříznivých, klimatických podmínkách (Verkleij, Lugtenborg & Ernst, 1988; Birks & Willis, 2008; Stewart et al., 2010).



Obrázek 5: Cytotypová a plastidová diverzita v rámci skupiny *Minuartia verna* v Evropě. Barvy odpovídají konkrétním haplotypům oblasti trnH-psbA; symboly označují ploidii populací (diploidní – prázdný kruh; tetraploidní – tečka; úroveň ploidie není k dispozici – křížek). Vpravo nahoře je zobrazena síť haplotypů; Nunvářová-Kabátová et al., 2019

Okruh *M. verna* je polyploidní komplex zahrnující diploidy ($2n = 24$) a tetraploidy ($2n = 48$; Nunvářová-Kabátová et al., 2019), jehož taxonomické hodnocení není stále zcela jasně vyřešeno; v závislosti na taxonomickém pojetí zahrnuje 2–15 druhů (Hayek, 1922; Dvořáková, 2000; Dillenberger a Kadereit, 2014; Mosyakin a Fedoronchuk, 2015). V rámci okruhu je možné rozlišit dvě základní evoluční linie, označované jako arкто-alpínská a balkánská (Dvořáková, 2000, Lipánová et al., 2023), což z velké části

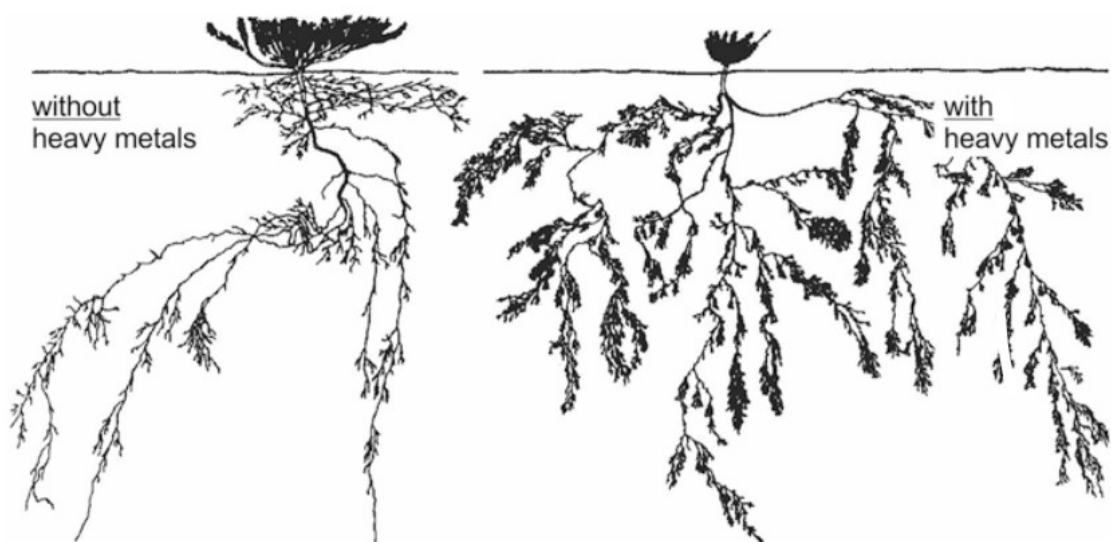
odpovídá výsledkům získaných analýzou chloroplastové DNA (Obrázek 5; Nunvářová-Kabátová et al., 2019). Arkto-alpínská skupina se vyskytuje v celé Evropě a jsou v ní zastoupeny téměř výhradně diploidní typy, zatímco balkánská skupina má centrum diverzity na Balkánském poloostrově a tetraploidní typy jsou zde mnohem častější. Zajímavé je, že distribuce ploidii v okruhu *M. verna* se nápadně liší od často pozorovaného trendu, kdy polyploidie osidlují vyšší nadmořské výšky a zeměpisných šířky, což je vysvětlováno jejich potenciálně větší ekologickou tolerancí a silnější kolonizační schopností (Brochmann et al., 2004; Weiss-Schneeweiss et al., 2013). U okruhu *M. verna* naopak tetraploidní rostliny zaujímají menší oblast, která zahrnuje především Balkánský poloostrov a Panonskou oblast, diploidní rostliny vykazují expanzní charakter a dokáží odolávat stresu v podobě substrátu obsahujícího těžké kovy (hadcové půdy a důlní oblasti), i kolonizovat vysoké nadmořské výšky (Nunvářová-Kabátová et al., 2019, Lipánová et al., 2023). Arkto-alpínská diploidní skupina tak představuje ideální modelový systém pro studium substrátových adaptací.

1.2.1 Hypertolerance k těžkým kovům

Skutečnost, že *Minuartia verna* dokáže růst na stanovištích se zvýšenou koncentrací těžkých kovů v půdě, zejména v minulém století upoutala pozornost mnoha odborníků. Ti se zaměřovali hlavně na obsah kovů v rostlinách s porovnáním k obsahu kovů v půdě. Bylo zjištěno, že anglické populace rostoucí v bývalých důlních oblastech akumulují Pb a Zn a někteří jedinci vykazovali známky hyperakumulace (Johnston & John Proctor, 1977a; Barry & Clark, 1978), v rostlinách rostoucích na hadci byly zjištěny několikanásobně větší koncentrace Ni, Cr a Co, obsahy kovů v rostlinných pletivech však nepřekročily hranici hyperakumulace (Johnston & John Proctor, 1977b). Hyperakumulace Pb a Zn byla pozorována také u rakouských populací z důlních oblastí (Wenzel & Jockwer, 1999), v jiné studii ze stejné oblasti byly analyzovány obsahy kovů zvláště v listech a kořenech, přičemž olovo bylo hromaděné více v kořenech, naopak zinek byl akumulován v listech (Wenzel & Jockwer, 1998). Obsah Zn, Cu a Pb v rostlinách řeckých populací byl silně korelován s obsahem těchto prvků v půdě (Kelepeetsis, Andrulakis & Reeves, 1985). Ve Francii byla analyzována populace rostoucí na lokalitě se zvýšeným obsahem Tl, avšak akumulace tohoto kovu nebyla u rostlin pozorována (Leblanc et al., 1999).

Kromě studií zabývajících se analýzou rostlinného a půdního materiálu z lokalit bylo provedeno i několik pokusů, které zjišťovaly míru tolerance rostlin pěstovaných v hydroponickém roztoku vystavených různým koncentracím zinku. Nejhůře přežívaly rostliny pěstované v 0,2–0,6 molárním roztoku $ZnSO_4$, při vyšších koncentracích se v protoplastu vytvořila ochranná vrstva, která zabránila dalšímu přísunu Zn (Rüther, 1967). Také byly provedeny pokusy, které testovaly vliv koncentrace Zn na klíčení a rostlinnou akumulaci různých kovů (Ag, Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn), jejich interakci a závislost na měnící se koncentraci, u všech kovů kromě Cu byl zaznamenán menší růst kořene při větších koncentracích, Cu v koncentraci $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ naopak růst kořene stimulovala (Hajar, 1987).

Ačkoliv akumulace těžkých kovů byla u rostlin široce zkoumána, o mechanismech podílejících se na toleranci a akumulaci kovů není zatím mnoho známo. Odlišnosti rostlin z toxických půd zaznamenal i Schubert (1954), který vyobrazil vzhled rostlin jak nadzemních, tak podzemních částí (Obrázek 6). Rostliny z netoxických půd mají větší vzrůst a menší plochu kořenového systému, naopak rostliny rostoucí na půdě znečištěné Cu jsou menšího vzrůstu, kompaktnější a jejich kořenový systém má větší plochu vytvořenou hustým kořenovým vlášením.



Obrázek 6: Struktura kořenů *Minuartia verna* v půdě s nízkou koncentrací těžkých kovů (vlevo) a na měděné struskové haldě (vpravo; Schubert, 1954). Rostlina ve stresovém prostředí je mnohem xeromorfnější a její kořenový systém je odpovídajícím způsobem větší a hustší.

Je známo, že na rezistenci rostlin vůči těžkým kovům se může podílet i mykorhiza, kdy houby adaptované na přítomnost kovů chrání rostliny před těmito kovy (Galli, Schuepp & Brunold, 1994). U rostlin *M. verna* však nebyl vliv asociace s mykorhizními houbami napomáhající toleranci těžkých kovů prokázán (Hildebrandt, Kaldorf & Bothe, 1999).

Další teorie vysvětluje toleranci rostlin vůči těžkým kovům tak, že rostliny na začátku a v průběhu sezóny vytváří nové listy, do kterých jsou kovy postupně akumulovány. Listy, které dosáhnou limitní hranice obsahu kovu usychají a následně odpadnou (Bothe, 2011).

Zajímavým zjištěním bylo, že absorbované Zn ionty v rostlinách *M. verna* se v nadzemní části nacházejí v mezibuněčných prostorách nebo v buněčných stěnách, přičemž v buněčných stěnách vznikají nerozpustné krystaly Zn silikátu. Kromě toho rostliny Zn aktivně vylučují pomocí hydatod⁴ (Neumann et al., 1997).

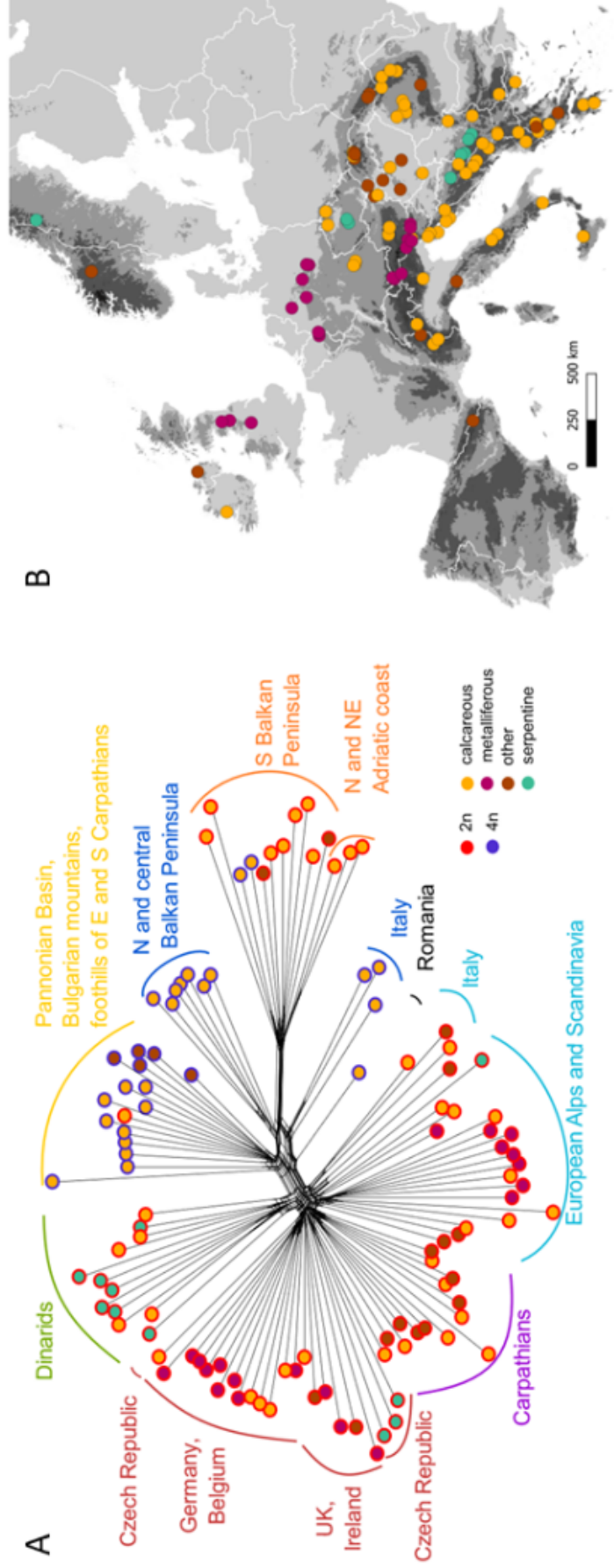
Zatím však není známá žádná studie, která by vyřešila otázku lokálních pre-adaptací u skupiny *M. verna* v souvislosti s její evolucí a s různými edafickými nároky.

1.2.2 Proč studovat edafickou adaptaci v okruhu *Minuartia verna*?

Je několik důvodů, proč se zabývat adaptacemi *Minuartia verna* na půdy bohaté na těžké kovy a jejich souvislostmi s evolucí této skupiny. Tato práce bude zaměřená na nížinné populace ze střední Evropy, u kterých se můžeme opírat o již známá fakta. Jedná se výhradně o diploidní rostliny (Nunvářová-Kabátová et al., 2019). Populace zde rostou na velkém spektru toxických půd, ať už se jedná o primární (hadcové oblasti) nebo sekundární (oblasti vázané na důlní činnost) lokality, také je však můžeme najít na vápencových nebo silikátových podkladech, které těžké kovy neobsahují (Dvořáková, 2000).

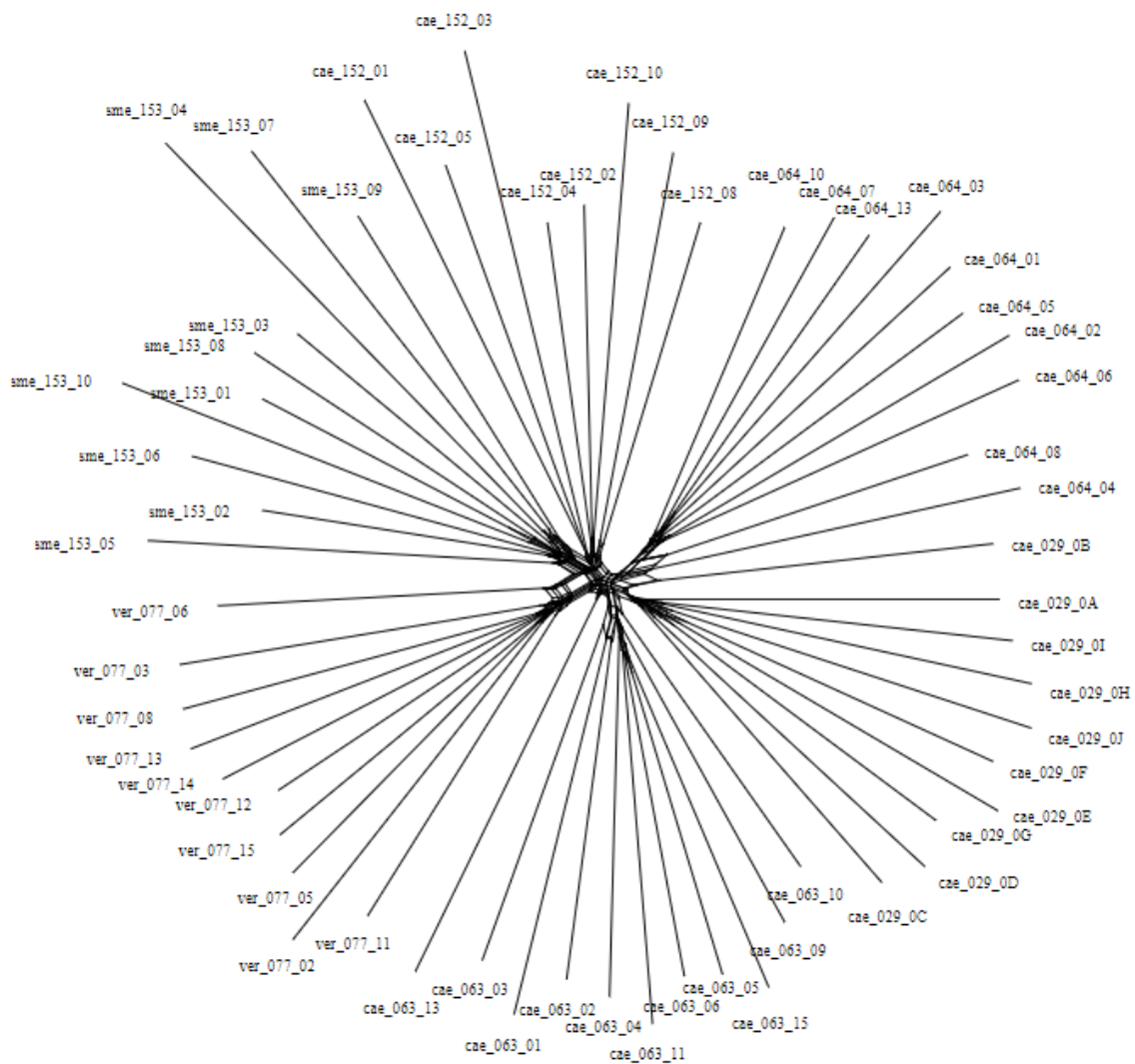
Díky genetické analýze RAD sekvenačních dat na základě populačních vzorků (8–10 jedinců/populace) ze střední Evropy (Obrázek 7) víme, že metaliferní, hadcové

⁴ Hydatoda také známé jako vodní skuliny jsou struktury nacházející se na listech, které slouží k vylučování vody ve formě kapek s rozpuštěnými minerály. Proces sekrece vody přes hydatody se nazývá gutace. Na rozdíl od průduchů nejsou uzavíratelné.

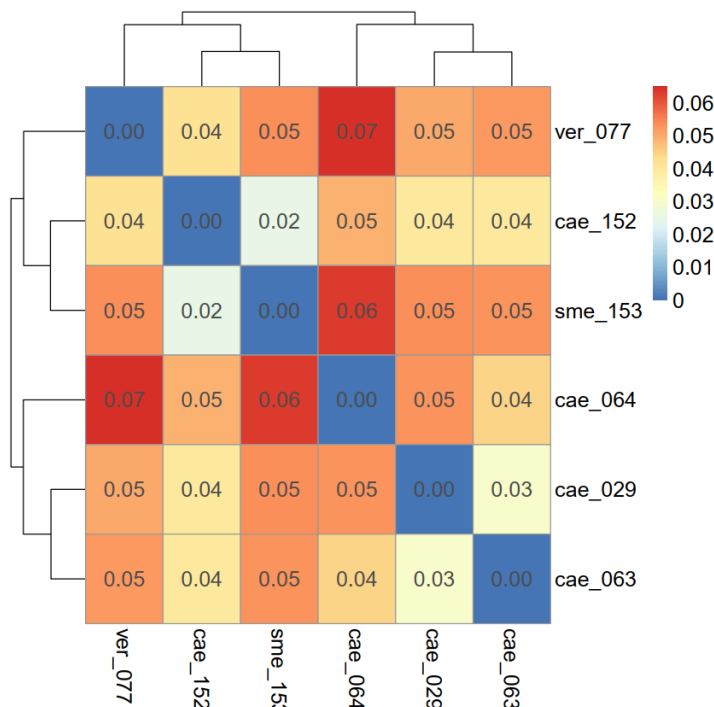


Obrázek 7: A) Síť genetických vzdáleností (Nei) mezi jedinci skupiny *M. verna* na základě RAD sekvenačních dat (18 561 SNPs). Barva bodů znázorňuje typ substrátu, na kterém byly rostliny odebrány, obrys bodů vypovídá o ploidii rostlin. B) Geografická poloha studovaných populací a typ substrátu, na kterém se populace vyskytuje (Lipánová et al. 2023, revize Molecular Phylogenetics and Evolution)

a vápencové nebo pískovcové lokality byly pravděpodobně kolonizovány stejnou genetickou linií, která se na daných substrátech diferencovala (Obrázek 7 - tmavě červená; genetická struktura populací použitých v experimentu je vyobrazena na Obrázku 8, párové F_{st} na Obrázku 9). Jiná genetická linie osídlila alpínské prostředí včetně metaliferních lokalit (Obrázek 7 - světle modrá), které byly pravděpodobně kolonizovány z ne-metaliferních horských stanovišť (Lipánová et al., 2023). Tento stav je ideální pro studium pre-adaptací rostlin a tolerance vůči těžkým kovům, na rychlost a rozsah adaptací a jejich *trade-off* (cena za adaptaci na určité prostředí), neboť genetické aspekty adaptací jsou dnes jedním z hlavních geneticko-ekologických témat.



Obrázek 8: Síť genetických vzdáleností (Nei) mezi jedinci skupiny *M. verna* na základě RAD sekvenačních dat pro populace použité v experimentu. Poznámka: cae_152 = C1; cae_063 = M3; cae_064 = M1; cae_029 = M2; ver_077 = C2; sme_153 = S. Zdroj: Lipánová et al. 2023 v přípravě.



Obrázek 9: Matice párových F_{st} populací zahrnutých v experimentu. Spočítána na základě Rad sekvenačních dat (18 561 SNPs). Zdroj: Lipánová et al. 2023 v přípravě.

Dalším zajímavým aspektem je způsob, jakým se *M. verna* vypořádává s přítomností těžkých kovů. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, populace v důlních oblastech akumulují Pb (kořeny) a Zn (listy), Zn je nejspíše vylučován pomocí hydratod. Další teorie předpokládá, že listy obsahující limitními obsahy kovů usychají a odpadávají. Na rostlinách se však nacházejí také žlázy, jejichž funkce je doposud neznámá, ale je možné, že také souvisí s vylučováním těžkých kovů. Jestliže by metaliferní půdy byly osídleny nezávisle, mohly by se lišit i způsoby tolerance rostlin k těžkým kovům. Každá nově adaptovaná linie by se mohla odlišovat mírou tolerance k jednotlivým těžkým kovům v závislosti na chemickém složení půdy. Metaliferní populace však mohou mít jednoho nemetaliferního předka, který se adaptoval na metaliferní půdy a následně tato linie mohla postupně osídlit všechna metaliferní stanoviště.

V neposlední řadě je vegetace vázaná na půdy obsahující těžké kovy velice specifická a hostí řadu endemických druhů, které jsou předmětem ochrany. Například v České republice je právě z okruhu *M. verna* známa *M. smejkalii*, která roste pouze na dvou hadcových lokalitách ve východní části středních Čech (hadce na Želivce a Hrnčičře; Stojanova et al., 2020). Znalost evoluční historie a ekologických nároků jsou důležitým předpokladem pro vhodnou strategii ochrany těchto druhů.

2. Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce je detailnější poznání lokálních edafických (pre-)adaptací střeoevropských nížinných populací v okruhu *Minuartia verna* (vápencový, hadcový, metaliferní substrát) a jejich zhodnocení v kontextu evoluce této skupiny. Dílčí otázky jsou následující:

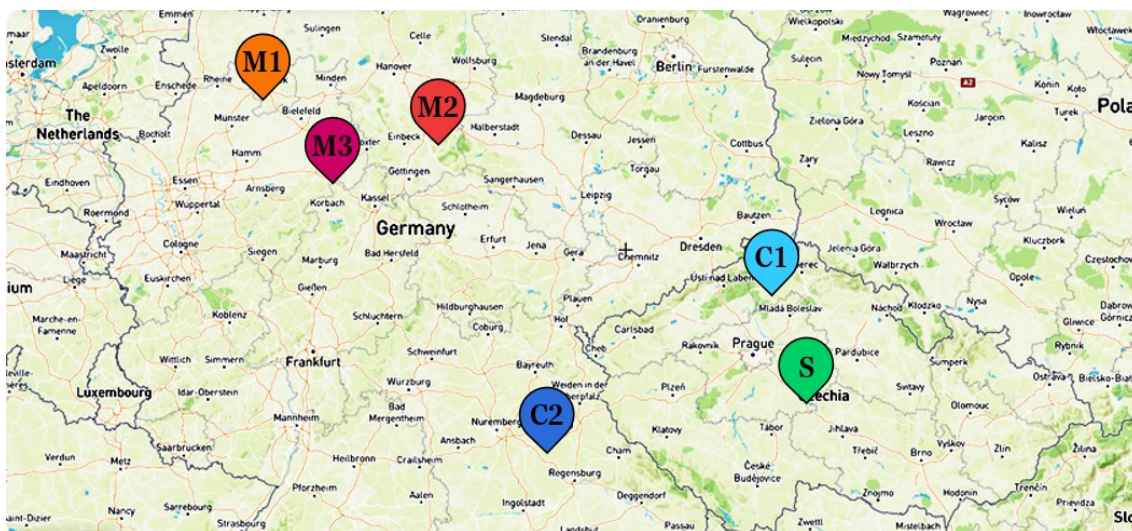
1. Jsou vybrané populace z okruhu *Minuartia verna* lokálně adaptované?
 - a. Mají rostliny rostoucí na vápencové půdě predispozici k růstu na hadcových půdách a na půdách obsahujících ionty těžkých kovů?
 - b. Jsou metaliferní populace navzájem pre-adaptované? Dokáží rostliny rostoucí na půdě s nadbytkem určitého těžkého kovu růst na půdě s nadbytkem odlišného těžkého kovu?
 - c. Jsou metaliferní populace adaptované na půdy s těžkými kovy natolik, že *fitness* rostlin pěstovaných v nemetaliferních půdách bude nižší než u rostlin pěstovaných ve vlastní půdě?
2. Jakým způsobem nakládají rostliny skupiny *M. verna* s ionty těžkých kovů?
 - a. Dochází k akumulaci těžkých kovů?
 - b. Pokud ano, do jaké části rostliny (kořen vs. nadzemní část) jsou těžké kovy ukládány?
3. Závisí obsah iontů těžkých kovů v rostlinách pouze na substrátu, na kterém právě rostou, nebo na jejich původu (vápencové, hadcové a metaliferní populace)?
 - a. Liší se akumulace iontů těžkých kovů u metaliferních populací?
 - b. Liší se obsah akumulovaných kovů mezi metaliferními a nemetaliferními populacemi, jestliže jsou pěstované na metaliferních půdách?

3. Materiál a metody

Abych odpověděla na výše kladené otázky, provedla jsem dva reciproční transplantační experimenty. V prvním případě (experiment I) byla každá populace pěstovaná ve vlastní půdě (kontrola) a zároveň ve všech půdách ostatních populací. Pozornost byla věnována míře mortality semenáčků v průběhu experimentu a měření *fitness* rostlin. Dále byla porovnána akumulace vybraných kovů mezi jednotlivými populacemi (experiment II) a její závislost na daných substrátech, s ohledem na to, jestli jsou dané kovy akumulovány v kořenové nebo nadzemní části rostlin.

3.1 Výběr populací pro experimenty

Na základě pilotních prvkových analýz půd vybraných lokalit ve střední Evropě (obsah iontů Ca, Mg, Ni, Pb, Zn a Cu v půdě), bylo vybráno celkem 6 populací z okruhu *M. verna* (Obrázek 8) pro reciproční experiment.



Obrázek 10: Mapa vybraných populací pro experiment. Modré (C1, C2) – populace rostoucí v netoxických půdách, zelená (S) – populace rostoucí na hadcovém podloží, červené (M1, M2, M3) – populace rostoucí v půdách obohacených těžkými kovy v důsledku důlní těžby.

Jedná se jednak o dvě populace (C1, C2), které rostou na půdách bohatých na Ca a tyto půdy neobsahují ionty těžkých kovů ve zvýšených koncentracích. Populace C1 roste na pískovcových výchozech Hradčanských stěn na Dokesku, populace C2 se nachází na vápencovém podloží v Bavorsku. Dále se jedná o hadcovou populaci (S), která pochází z Dolnokralovických hadců na Benešovsku. Další tři populace (M1, M2 a M3)

jsou populace, které rostou na antropogenních místech, kde v minulosti probíhala důlní těžba a půdy zde obsahují zvýšené množství iontů těžkých kovů. Tyto metaliferní populace se nachází v pohoří Harz v Německu. Všechny populace pocházejí z podobných klimatických podmínek a nadmořské výšky (< 600 m n. m.; Tabulka 2).

Tabulka 2: Seznam populací použitých pro experiment.

Populace	Půda	Lokalita	Koordináty	Nadmořská výška
C1	vápencová	CZ: Hradčany	50°37'16.900"N, 14°40'44.500"E	310 m n. m.
C2	vápencová	D: Hohenfels	49°12'11.115"N 11°51'0.118"E	400 m n. m.
S	hadcová	CZ: Borovsko	49°41'18.000"N, 15°6'12.600"E	400 m n. m.
M1	metaliferní	D: Gellenbeck	52°12'36.751"N, 7°57'17.661"E	170 m n. m.
M2	metaliferní	D: Blankenrode	51°48'10.000"N, 10°18'14.600"E	480 m n. m.
M3	metaliferní	D: Clausthal-Zellerfeld	51°31'52.348"N, 8°54'18.409"E	410 m n. m.

3.2 Materiál

3.2.1 Semena rostlin

Semena byla u každé populace sebrána z 30-ti mateřských rostlin, které od sebe byly vzdáleny minimálně 1 metr, v období od července do září roku 2021. Po sběru byla semena vysušena v papírových sáčkích v suché místnosti při teplotě 20 °C a poté byla skladována v chladničce v Eppendorfových zkumavkách při teplotě 10 °C.

3.2.2 Půda

Pro kultivaci rostlin byly použity půdy z vybraných lokalit. Z každé lokality bylo v září roku 2021 sebráno 25 litrů půdy pro pěstování semenáčků, pro přesazení rostlin do větších květináčů bylo na přelomu března a dubna roku 2022 sebráno dalších 50–120 litrů půdy (množství záviselo na počtu přežitých rostlin v experimentu I). Z důvodu nedostatku půdy (**C2a**) na lokalitě **C2** byla další půda sebrána na blízké vápencové lokalitě (půda **C2b**), kde *M. verna* také roste (Unterwiesenacker). Ve stejném čase byla sebrána půda pro experiment II, 15 litrů půdy z každé metaliferní a jedné hadcové lokality. Byla

vykopána vrchní část půdy (do 30 cm) na více místech v rámci lokality a proseta na sítu (velikost ok 2 cm). Pro kultivaci semenáčků v experimentu II byla použita zahradní zemina smíchaná s pískem v poměru 1:1.

3.3 Metody

3.3.1 Půdní analýzy

Vzorky půd z vybraných lokalit pro kultivaci rostlin byly sušeny při 60 °C po dobu 7 dnů a poté přesety na plastovém sítu (velikost ok 2 mm). Půdy byly analyzovány z hlediska pH (aktivní + výměnné), obsahu Ca, Mg a těžkých kovů (Cu, Pb, Ni, Zn). Vzorky jemnozeme (velikost částic do 2 mm, 10 g) byly rozemlety a extrahovány skupinovým extrakčním činidlem Mehlich III v poměru v/w = 1/10. Po extrakci na rotační třepače byla půdní suspenze přefiltrována přes filtrační papír a získaný roztok byl analyzován. K analýzám v oblasti atomové spektrometrie byl použit AAS Spektrometr ContrAA 700 firmy Analytik Jena AG. Analýzy byly provedeny v Analytické laboratoři Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích.

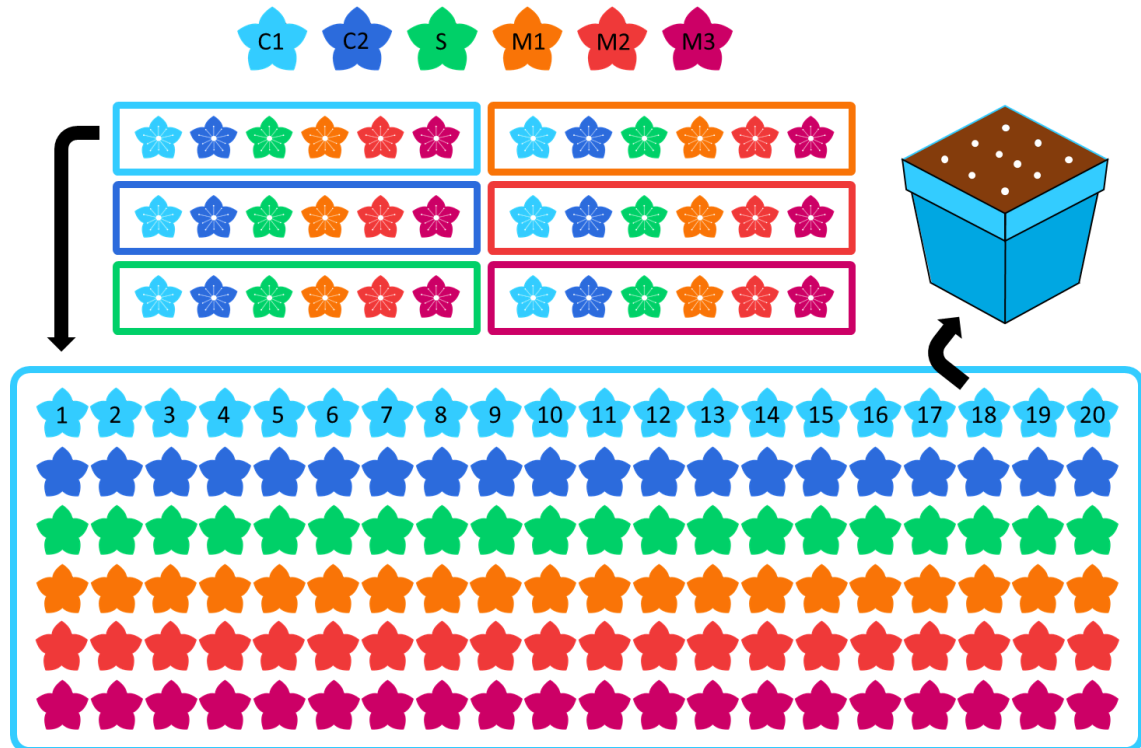
3.3.2 Experiment I

Všechny populace (**C1, C2, S, M1, M2, M3**) byly kultivovány ve své vlastní půdě (kontrola) a zároveň ve všech ostatních půdách, což zahrnuje 36 různých kombinací populací a půd. Každá populace byla vysazena na všechny půdy ve 20 květináčích odpovídajících 20 mateřským rostlinám **a-t** (vybrané mateřské rostliny s dobře vyvinutými semeny), ze kterých byla semena shromážděna (Obrázek 11). Tento experiment byl zaměřen na porovnání *fitness* populací rostlin v závislosti na typu půd, ve kterých byly rostliny pěstovány.

A) Klíčení rostlin

Experiment byl započat v říjnu roku 2021. Klíčení semen probíhalo v experimentálním skleníku Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích. Pro klíčení byly použity 200ml květináče (5×5×8 cm), které byly naplněny navlhčenou půdou. Do jednoho květináče bylo vyseto 10 semen z jedné mateřské rostliny (semena nebyla zahrnuta půdou, aby mohl být pozorován začátek klíčení kořínku). Půda byla zalévána třikrát denně mlžením. Teplota byla automaticky regulována (den: 20 °C, noc: 10 °C),

denní čas byl upraven na 12 hodin pomocí LED osvětlení. Klíčivost semen byla sledována a zaznamenávána třikrát týdně prvních 8 týdnů. Klíčení rostlin bylo skórováno jednak jako objevení kořínku, a dále při objevení děložních lístků.



Obrázek 11: Schéma experimentu I. Barevné květy značí různé populace, obdélníky ve stejné barvě jako květy značí půdu ze stejné lokality jako je populace. Ve vrchní části vlevo jsou znázorněny všechny kombinace půd a populací, ve spodní části je detailně znázorněn pokus v půdě C1, kde každý květ značí květináč, do kterého se zasel 10 semen od mateřské rostliny (detail vpravo nahoře).

B) Kultivace rostlin

Po 9 týdnech byly v jednom květináči náhodně ponechány pouze 3 rostliny (u dvou byly zaznamenávány pozorované znaky, jedna rostlina byla ponechána pro vážení biomasy), rostliny byly zalévány dvakrát denně. Po 6 měsících byla v květináči ponechána pouze 1 rostlina a ta byla přesazena do většího květináče o objemu 1 litr. V květnu byly rostliny přesunuty ze skleníku do venkovního záhonu. V listopadu roku 2022 byly květináče zahrnuty pískem pro ochranu kořenů před mrazem a ponechány venku.

C) Měření znaků rostlin

Pro porovnání *fitness* rostlin bylo skórováno několik vegetativních a generativních znaků. V průběhu klíčení byl zaznamenán počet vyklíčených semenáčků a jejich

přežívání. Od ledna 2022 byla u dvou rostlin v jednom květináči zaznamenávána výška rostlin, průměr trsu rostlin, doba objevení pupat, počet květních lodyh a květů. V květnu byla jedna rostlina z květináče vyjmuta a její nadzemní část byla usušena při teplotě 60 °C, následně byla zvážena nadzemní biomasa na analytických vahách (Mikrováhy XPR, METTLER TOLEDO). Semena nebyla sbírána kvůli možné reprodukční bariéře mezi některými populacemi, což by mohlo mít vliv na počet nebo kvalitu semen. Pro lepší přehlednost je vyobrazen časový plán pokusu (Tabulka 3). Počet květních lodyh byl skórován do celkového počtu 50, v případě, že rostlina nesla více jak 50 květních lodyh, byla zavedena kategorie 50+, podobným způsobem byly upraveny kategorie u celkového počtu květů rostlin, květy byly počítány do maximálního počtu 200 květů, pro více květů byla zavedena kategorie 200+. Znaky byly skórovány dvakrát za měsíc po dobu 10 měsíců. Průběžně bylo zaznamenáno také přežívání rostlin.

Tabulka 3: Časový plán experimentu I. První řádek vyjadřuje roky, čísla ve druhém řádku odpovídají měsícům.

2021			2022									
10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
klíčení, 10 rostlin/květináč			měření znaků rostlin									
			3 rostliny			přesazení, 1 rostlina	biomasa					

3.3.3 Experiment II

Jelikož při prvním experimentu v metaliferních půdách (**M1**, **M2** a **M3**) nepřežily ani rostliny z vápencových lokalit (**C1** a **C2**) ani rostliny z hadcové lokality (**S**), nebylo by na konci experimentu možné porovnat akumulaci některých těžkých kovů jednotlivých populací v závislosti na typu půdy. Proto byl navržen další experiment, při kterém rostliny byly nejdříve vypěstovány v zahradním substrátu a později přesazeny do půd obsahujících těžké kovy – do hadcové půdy (**S**) a metaliferních půd (**M1**, **M2** a **M3**). Takto vypěstované a přesazené rostliny lépe snášely nepříznivé podmínky půd obsahujících těžké kovy a bylo možné získat biomasu pro následnou prvkovou analýzu.

A) Klíčení rostlin

Experiment byl zahájen v říjnu roku 2021. Klíčení probíhalo v experimentálním skleníku Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích. Pro klíčení rostlin byly použity

výsevné misky, které byly naplněny zahradnickým substrátem smíchaným s pískem (poměr půd 1:1). Od všech populací (**C1**, **C2**, **S**, **M1**, **M2**, **M3**) byla vyseta semena z 10 mateřských rostlin (**a–j**), od každé mateřské rostliny bylo vyseto 10 semen. Půda byla zalévána třikrát denně mlžením. Teplota byla automaticky regulována (den: 20 °C, noc: 10 °C), denní čas byl upraven na 12 hodin pomocí LED osvětlení.

B) Kultivace a sběr rostlin

Po 5 měsících byly rostliny vyjmuty ze zahradního substrátu, jejich kořeny byly šetrně promyty ve vodě od původní půdy, ve které byly pěstovány a byly přesazeny do půd z hadcové lokality (**S**) a z metaliferních lokalit (**M1**, **M2**, **M3**). Od každé mateřské rostliny (**a–j**) byla do každé vybrané půdy (**S**, **M1**, **M2**, **M3**) přesazena jedna rostlina do 250ml květináče. V květnu 2022 byly rostliny přesunuty ze skleníku do venkovního záhonu. Po 5 měsících od přesazení rostlin bylo od každé kombinace populace a půdy náhodně vybráno 5 rostlin. Tyto rostliny byly důkladně promyty vodou od veškeré půdy a následně byly opláchnuty destilovanou vodou. Takto očištěné rostliny (jak nadzemní část, tak kořeny) byly vysušeny při 60 °C a pro prvkovou analýzu byly skladovány v silikagelu.

C) Prvková analýza rostlin

Listy a kořeny ze zahradního experimentu byly analyzovány z hlediska přítomnosti vybraných těžkých kovů (Pb, Ni, Zn), které měly nejvyšší koncentrace ve vybraných půdách. Vzorky byly před analýzou rozloženy pomocí mikrovlnné trouby Speedwave ®Xpert (Berghof, Německo, maximální výkon 2000 W): rostlinné pletivo bylo vloženo do digesčních zkumavek, byly přidány 2 ml koncentrované kyseliny dusičné. Mineralizované vzorky byly naplněny do konečného objemu 10 ml deionizovanou vodou. Připravený vzorek byl analyzován pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP OES) za využití sekvenčního ICP OES spektrometru INTEGRA 6000 (GBC, Dandenong Austrálie). Vzorky byly zpracovány v prvkové laboratoři Univerzity Pardubice.

3.3.4 Statistické analýzy dat

Analýzy byly provedeny pomocí programovacího jazyka R verze 4.3.1 (2023) v softwaru RStudio. Grafy byly vytvořeny především pomocí funkce *ggplot* nebo

radarchart z balíčku *ggplot2* (Wickham, 2016) a jeho rozšíření *ggh4x* (van den Brand, 2023).

Hodnoty obsahů prvků v půdách byly pro následné vynesení do grafu standardizovány pomocí funkce *scale* (Becker, Chambers & Wilks, 1988).

V průběhu klíčení byl pozorován počet vyklíčených semen, počet semenáčků s děložními lístky a dále byly zaznamenávány uhynulé semenáčky. Byla vypočítána klíčivost jako počet vyklíčených semen/celkový počet vysetých semen, klíčivost byla také vypočítána pro semenáčky s děložními lístky. Dále byla z dat počtu vyklíčených semen pro každou mateřskou rostlinu a danou populaci a půdu vypočítána rychlost klíčení *t50*, která udává čas, za který vyklíčí polovina z daného počtu semen. Hodnoty byly spočteny pomocí funkce *t50* z balíčku *germinationmetrics* (Aravind et al., 2022).

```
t50(data, intervaly, partial = FALSE, method = "farooq")
```

Distribuce hodnot rychlosti klíčení (*t50*) a biomasy neodpovídaly normálnímu rozdělení. Pro rychlost klíčení (*t50*) byla použita odmocninová transformace, pro biomasu logaritmická transformace. Procento kvetoucích rostlin bylo vypočteno i z rostlin, které uhynuly, jelikož některé rostliny vykvetly, vytvořily semena a poté uhynuly, tudíž přestože uhynuly, přispěly k přenesení genetické informace do další generace.

K analýze vlivu půdy na měřené parametry rostlin během kultivace byly použity hodnoty naměřené po 8 měsících po vysetí (tyto hodnoty byly nejvhodnější pro analýzy, později byly u počtu květů a lodyh vytvořeny směsné kategorie – viz. Měření znaků rostlin, které vedly k výrazné odchylce distribuce dat od normálního rozdělení a zkreslovaly skutečné údaje).

Odlehlé hodnoty byly zjištěny pomocí funkce *rosnerTest* z balíčku *EnvStats* (Millard, 2013).

```
rosnerTest(data)
```

Jelikož během pokusu některé rostliny uhynuly, nebyl počet pozorování v jednotlivých skupinách stejný (Tabulka 4) a lišil se i pro jednotlivé analyzované znaky. Dataset 1 náleží analýze klíčení, procentu kvetoucích rostlin a přežívání rostlin, dataset 2 analýze biomasy. Pro analýzy délky nejdelší lodyhy, šířce trsu, počtu květů a počtu květních lodyh byl použit dataset 3 a pro začátek kvetení dataset 4, protože byly analyzovány pouze kvetoucí rostliny.

Tabulka 4: Počet rostlin v jednotlivých kombinacích populace a půdy pro analyzované znaky. A) dataset 1, celkem 720 mateřských rostlin, analýzy klíčivosti, rychlosti klíčení (t50), procenta kvetoucích rostlin a přežívání rostlin. B) dataset 2, 611 rostlin, analýza biomasy. C) dataset 3, 496 rostlin, analýzy délky nejdelší lodyhy, průměru trsu, počtu květů a počtu květních lodyh. D) dataset 4, 476 rostlin, analýza začátku kvetení.

a)

dataset 1 720 mat.		půda					
		C1	C2	S	M1	M2	M3
populace	C1	20	20	20	20	20	20
	C2	20	20	20	20	20	20
	S	20	20	20	20	20	20
	M1	20	20	20	20	20	20
	M2	20	20	20	20	20	20
	M3	20	20	20	20	20	20

b)

dataset 2 611 rostl.		půda					
		C1	C2	S	M1	M2	M3
populace	C1	20	20	20	13	16	0
	C2	20	20	20	7	7	0
	S	20	20	20	14	18	0
	M1	20	20	20	20	20	20
	M2	20	18	20	20	20	20
	M3	20	19	19	20	20	20

c)

dataset 3 496 rostl.		půda					
		C1	C2	S	M1	M2	M3
populace	C1	20	20	20	0	0	0
	C2	20	18	20	0	0	0
	S	17	18	20	0	0	0
	M1	20	18	20	20	20	18
	M2	19	11	19	20	20	20
	M3	15	11	19	20	19	20

d)

dataset 4 476 rostl.		půda					
		C1	C2	S	M1	M2	M3
populace	C1	20	17	19	0	0	0
	C2	19	17	17	0	0	0
	S	17	17	20	0	0	0
	M1	20	18	20	20	18	16
	M2	19	10	19	20	20	20
	M3	15	9	16	18	17	18

Korelace znaků sledovaných jak při klíčení, tak při kultivaci a také u obsahů kovů v rostlinách byla spočítána pomocí funkce *cor*. Následné otestování, jestli je korelace signifikantní, bylo provedeno pomocí funkce *cor.mtest* z balíčku *corrplot* (Wei & Simko, 2021). Pro následné grafické vyobrazení byla použita funkce *corrplot* ze stejného balíčku.

```
cor(data)
```

```
cor.mtest(korelacni_matice, conf.level = 0.95)
```

Analýza vlivu půd na jednotlivé měřené znaky byla provedena pomocí porovnání dvou zobecněných lineárních modelů se smíšeným efektem (GLM). První GLM model udává, že jsou hodnoty znaků ve všech typech půd stejné. Druhý GLM model

předpokládá, že se střední hodnota znaků v jednotlivých půdách může lišit. Mateřská rostlina byla uvedena jako náhodný efekt. Každá populace byla analyzovaná zvlášť. Pro tvorbu modelů byla použita funkce **glmer** z balíčku *lme4* (Bates et al., 2015).

```
mod.null <- glmer(znak ~ 1 + (1 | meterska_rostlina),  
family = gaussian(link = "identity"), data = data)  
  
mod <- glmer(znak ~ puda + (1 | meterska_rostlina), family  
= gaussian(link = "identity"), data = data)  
  
anova(mod.null, mod, test = "Chisq")
```

Pro rozlišení jednotlivých skupin (rostliny stejné populace pěstované ve stejné půdě) byly použity písmena. Jestliže je více skupin označeno stejným písmenem, signifikantně se od sebe tyto skupiny neliší. Které skupiny se od sebe liší, bylo zjištěno pomocí funkce **multcompLetters4** z balíčku *multcompView*. Funkce je založena na předchozích analýzách ANOVA a Tukey testu pomocí funkcí **aov** a **TukeyHSD**.

```
anova <- aov(znak ~ xsoil, data = data)  
  
tukey <- TukeyHSD(aov(vyska ~ xsoil, data = data))  
  
multcompLetters4(anova, tukey)
```

Pro testování, zda se od sebe liší křivky přežívání byla použita funkce **survdiff** z balíčku *survival* (Therneau & Grambsch, 2000). Porovnání párů bylo provedeno funkcí **pairwise_survdiff** ze stejného balíčku. Po úpravě matice p-hodnot funkcí **fullPTable** z balíčku *rcompanion* (Mangiafico, 2023) byly získány rozlišovací písmena pomocí funkce **multcompLetters** z balíčku *multcompView* (Graves, Piepho & Selzer, 2023).

```
test <- survdiff(Surv(čas, udalost) ~ puda, data = data)  
  
porovnani <- pairwise_survdiff(Surv(time, event) ~ xsoil,  
data = data)  
  
porovnani $p.value <-fullPTable(porovnani$p.value)  
  
multcompLetters(porovnani $p.value, threshold = 0.05)
```

Fitness byla vypočítána pro každou rostlinu, k výpočtu byly použity hodnoty měřených znaků: klíčivost, rychlost klíčení (t50), biomasa, délka nejdelší lodyhy, průměr trsu, počet květů, počet květních lodyh, začátek kvetení, procento kvetoucích rostlin a procento přeživších rostlin. Pro rychlost klíčení a začátek kvetení byla použita převrácená hodnota. Všechny znaky byly převedeny do škály 0–1, aby bylo zajištěno, že budou mít stejnou váhu. *Fitness* rostliny byla vypočítána jako součet hodnot všech znaků. Pro každou kombinaci populace a půdy byla vypočtena kumulativní *fitness*, ta byla následně standardizována podle kumulativní *fitness* populace C1 v půdě C1.

Obsah prvků v rostlinách byl měřen zvlášť pro kořeny a zvlášť pro listy. Od každé kombinace populace a půdy bylo analyzováno 5 jedinců. Pro statistickou analýzu obsahu kovů v rostlinách byly hodnoty koncentrací logaritmičticky transformovány, aby jejich distribuce odpovídala normálnímu rozdělení. Následně byla zjištěna korelace mezi koncentracemi jednotlivých prvků stejným způsobem jako u měřených znaků rostlin. Testování, jestli se od sebe koncentrace prvků liší v kořenech a v listech, bylo u každé kombinace populace a půdy analyzováno zvlášť pomocí párového t-testu pomocí funkce *t.test*.

```
t.test (kov_kořeny, kov_listy)
```

Testování vlivu půdy, populace a jejich interakce na koncentrace prvků v kořenech a listech bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu funkcí *aov* z balíčku *stats* (R Core Team, 2023)

```
anova <- aov(prvek_log ~ půda * populace, data = data)
```

4. Výsledky

Výsledky diplomové práce jsou rozděleny do třech kapitol. Nejprve jsou prezentovány výsledky analýz půd z přírodních populací, které byly použity v experimentech, následně jsou uvedeny výsledky recipročního experimentu, poslední kapitola udává výsledky příjmu těžkých kovů rostlinami.

Hvězdičky uvedené u výsledků analýz udávají míru signifikance.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

4.1 Analýza půd

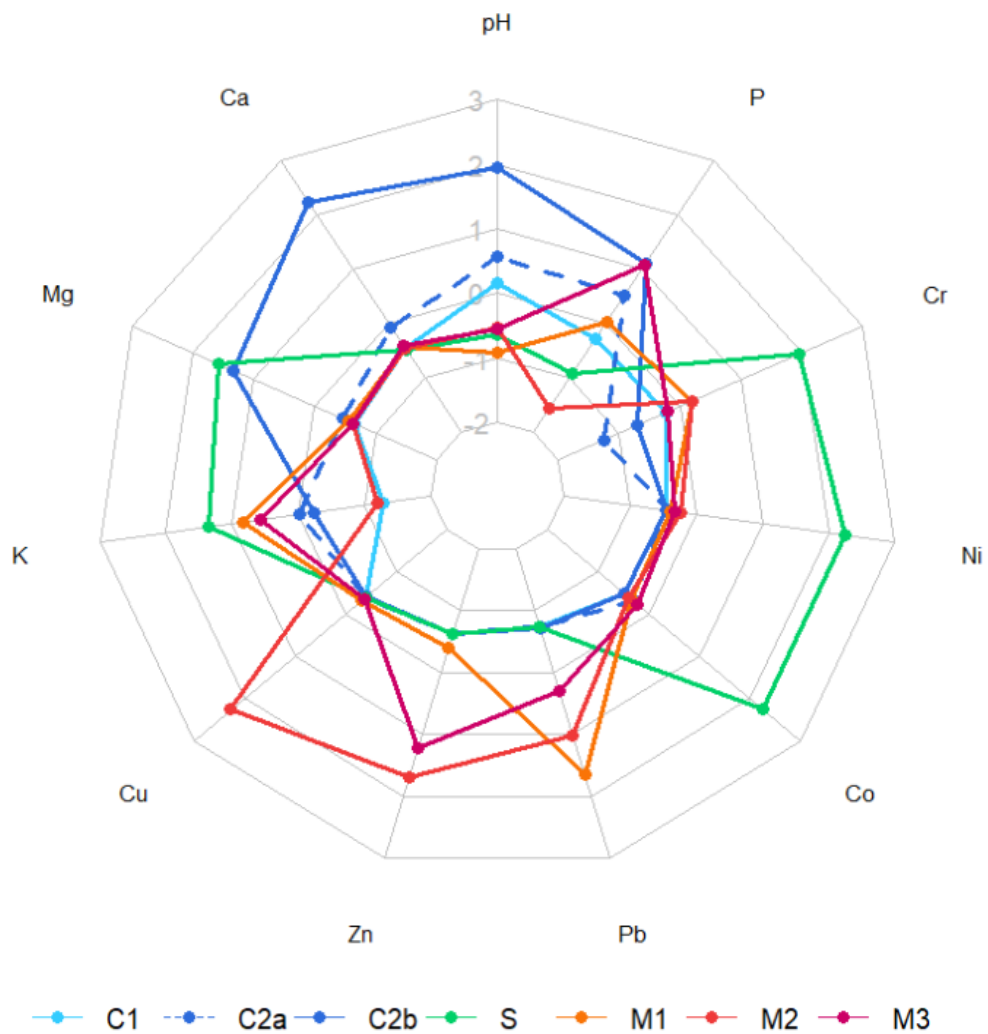
U všech půd, které byly zahrnuty do experimentů, bylo zjištěno jejich složení pomocí prvkové analýzy, také bylo změřeno pH těchto půd (naměřené hodnoty prvků, se kterými bylo dále pracováno jsou shrnuty v Tabulce 4; celkový přehled naměřených hodnot v Příloze 1). U všech vzorků byl dále vypočítán poměr Ca/Mg. Pro porovnání jednotlivých půd mezi sebou byla naměřená data (dostupný obsah vybraných prvků a volné vodíkové ionty) normalizována a následně vynesena do grafu (Obrázek 12).

Tabulka 5: Analýza půd vybraných lokalit. Hodnoty udávají dostupný obsah vybraných kovů charakteristických pro vybrané půdy. Obsah kovů je uveden jako hmotnost kovu na celkovou hmotnost půdy v jednotkách $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Dále je uveden poměr Ca/Mg a aktivní pH.

Lokalita	Ca	Mg	Ca/Mg	Zn	Pb	Cu	Ni	pH
C1	878,87	13,66	64,35	4,14	6,78	0,55	0,36	7,38
C2a	31759,83	3990,70	7,96	44,81	30,16	1,27	0,61	8,52
C2b	5274,87	399,67	13,20	26,23	10,53	1,81	1,48	7,46
S	480,82	4462,10	0,11	9,12	6,89	1,84	130,03	6,88
M1	991,61	209,45	4,73	2995,55	3472,90	6,87	3,30	6,70
M2	733,32	40,17	18,26	31068,94	2550,72	163,92	11,23	6,95
M3	1294,57	55,76	23,22	24675,85	1518,44	3,64	7,20	6,93

Půdy z vápencových lokalit (C1, C2a, C2b) vykazovaly mírně vyšší pH (7,38, 8,52, 7,64; Tabulka 4) a všechny měly nízký obsah měřených těžkých kovů ($< 45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), půda C2a měla vysoký obsah vápníků ($31\,760 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) a půda C2b měla

mírně zvýšený obsah Ca ($5\,275\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) v porovnání se všemi ostatními půdami ($< 1\,300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), také se vyznačovala vyšším obsahem Mg ($3\,991\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) stejně jako hadcová půda (S, $3\,956\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Půda z hadcové lokality (S) byla kromě zvýšeného obsahu Mg odlišná zejména charakteristickým poměrem $\text{Ca}/\text{Mg} < 1$, v tomto případě 0,11. Dále bylo pozorováno zvýšené množství těžkých kovů (Co, Cr a Ni) typických pro hadcové lokality. Vyšší obsah Pb se nacházel u všech metaliferních půd (M1, M2, M3), vyšší obsah Zn se nacházel pouze u dvou metaliferních půd (M2, M3) a vyšší obsah Cu byl pouze u metaliferní půdy M2.



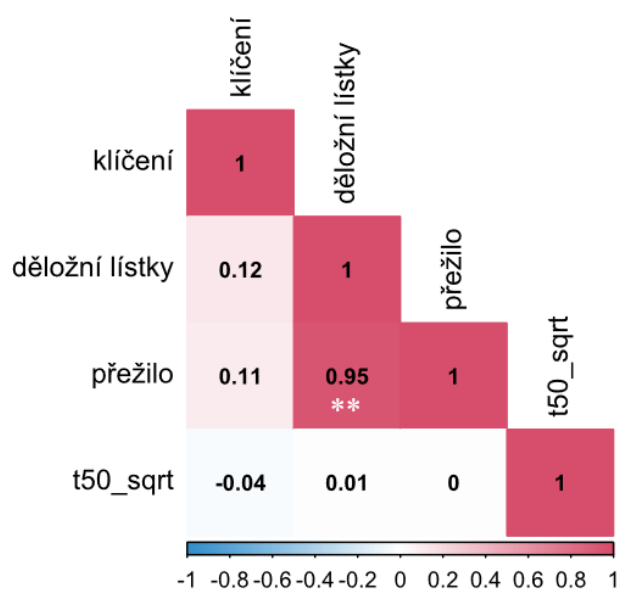
Obrázek 12: Radarový graf porovnávající standardizované obsahy prvků v experimentálních půdách.

4.2 Reciproční experiment I

4.2.1 Klíčení semen a přežívání semenáčků

Průběh klíčení byl pozorován na 720 květináčích (semena z 6 populací, 20 mateřských rostlin na populaci, 6 typů půd), ve kterých bylo po 10 semenech. Každé části pokusu zahrnující určitou populaci a typ půdy náleželo 20 květináčů (semena z různých mateřských rostlin), celkem 200 semen.

Zpracovány byly údaje o klíčivosti, rychlosti klíčení (t50), počtu semenáčků s děložními lístky a procentu přežitých semenáčků. Nejprve byla zjišťována míra korelace mezi uvedenými znaky (Obrázek 13). Vysoký Pearsonův korelační koeficient (0,95, $p = 0,0034$) byl pozorován mezi procenty semenáčků s děložními lístky a procentu přežitých semenáčků, proto byl parametr procenta semenáčků s děložními lístky vyřazen z dalších analýz.



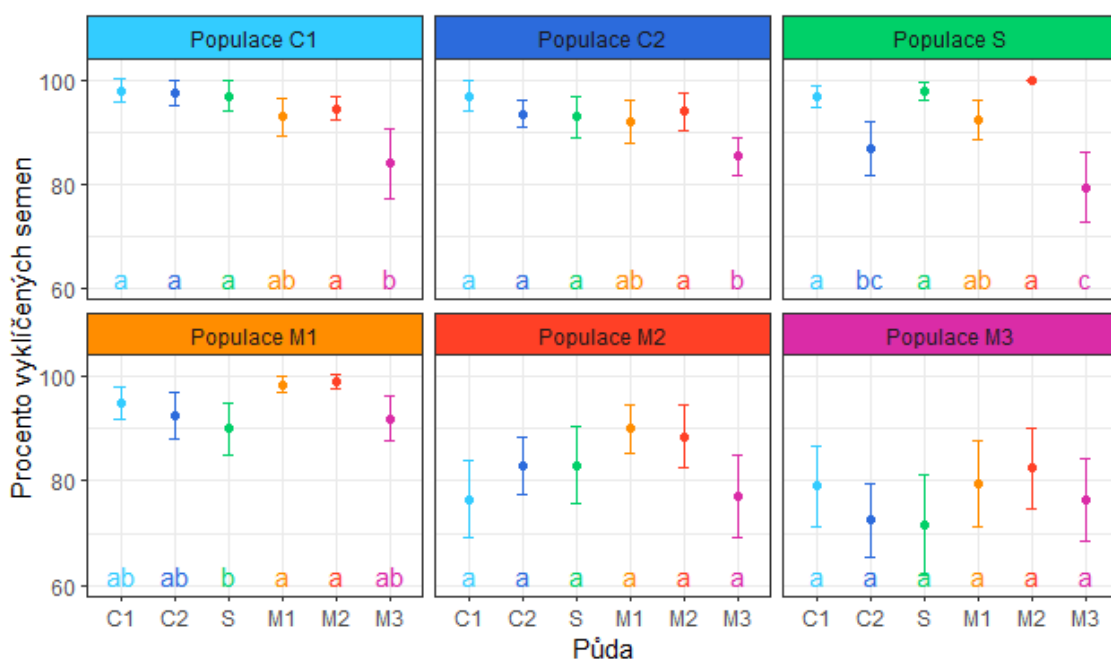
Obrázek 13: Korelace mezi znaky popisujícími průběh klíčení. Hodnoty odrážejí Pearsonův korelační koeficient, stínování znázorňuje hodnotu korelačního koeficientu.

Průměrná klíčivost semen byla u všech kombinací populace a půdy vysoká, vždy překročila hranici 70 %. U všech populací byl však pozorován signifikantní vliv půdy na klíčivost (Tabulka 6). U nemetaliferních populací (C1, C2, S) byl pozorován vliv půdy M3 na klíčivost, která byla v této půdě vždy nejmenší a signifikantně se lišila od většiny klíčivosti v jiných půdách. U metaliferních populacích není vliv půdy tak zřetelný.

Většina rozdílů mezi kategoriemi je ale nevýznamná kvůli velké variabilitě a překrývajícím se intervalům (Obrázek 14).

Tabulka 6: Výsledky GLM modelů testujících efekt půdy na procento vyklíčených semen.

Procento vyklíčených semen - ANOVA(null.model, model)				
Populace	χ^2	df	p-hodnota; grafické znázornění	
C1	32,863	5	< 0,001	***
C2	25,440	5	< 0,001	***
S	59,160	5	< 0,001	***
M1	20,916	5	< 0,001	***
M2	19,043	5	0,002	**
M3	11,269	5	0,046	*

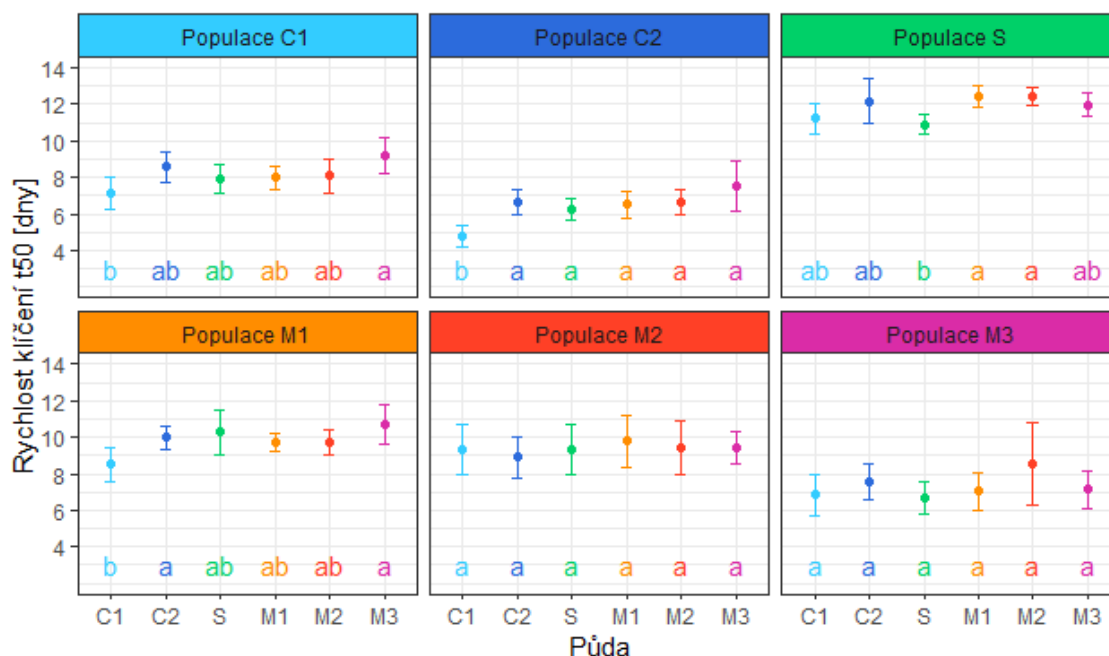


Obrázek 14: Vliv půdy na procento vyklíčených semen u jednotlivých populací. Body značí průměrnou hodnotu, zobrazen je 95% konfidenční interval. Malá písmena (a, b, c) označují signifikantní rozdíly mezi skupinami u jednotlivých populací.

Vliv půdy na rychlost klíčení semen (t_{50}) byl signifikantně prokázán pouze u populací **C1**, **C2**, **S** a **M1** (Tabulka 7). U populací **C1**, **C2** a **M1** je hodnota rychlosti klíčení nejnižší v půdě **C1**, což udává, že v této půdě semena klíčila nejrychleji, hodnoty se signifikantně liší od ostatních typů půd pouze u populace **C2**, u populací **C1** a **M1** se signifikantně liší pouze od rychlosti klíčení v půdě **M3**. I v tomto případě (stejně jako u procenta vyklíčených semen) vysoká variabilita způsobuje, že mezi populacemi jsou pozorovány většinou nevýznamné rozdíly (Obrázek 15).

Tabulka 7: Výsledky GLM modelů testujících efekt půdy na rychlost klíčení semen (t50).

Rychlost klíčení t50_sqrt - ANOVA(null.model, model)				
Populace	χ^2	df	p-hodnota; grafické znázornění	
C1	22,131	5	< 0,001	***
C2	27,462	5	< 0,001	***
S	33,109	5	< 0,001	***
M1	24,236	5	< 0,001	***
M2	2,182	5	0,823	
M3	4,805	5	0,440	

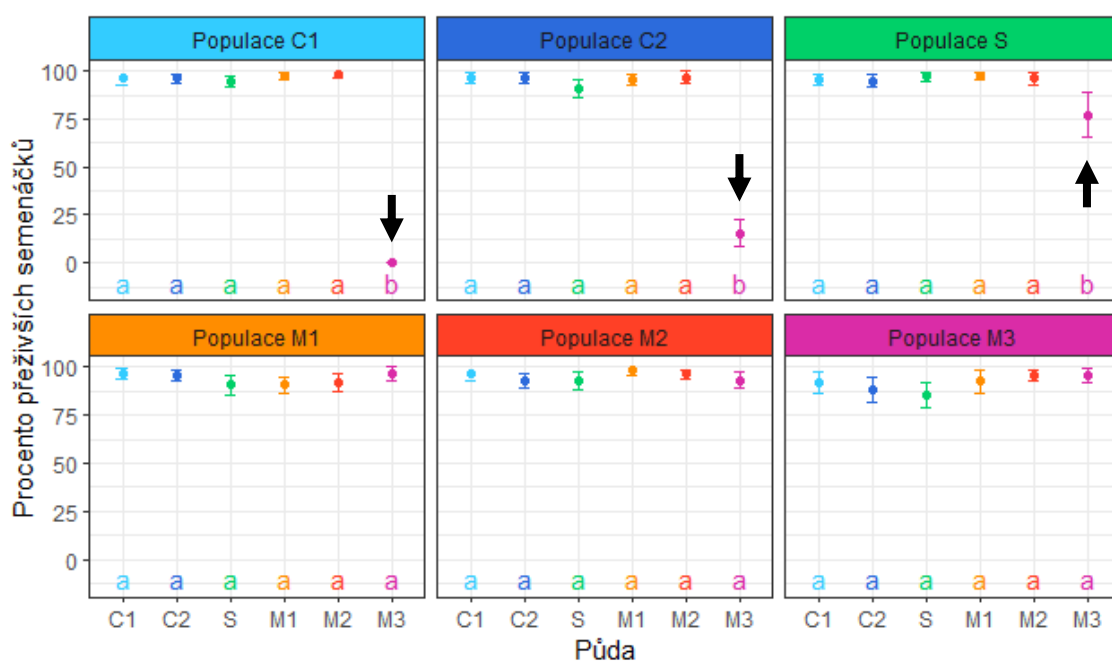


Obrázek 15: Vliv půdy na rychlost klíčení semen u jednotlivých populací. Body značí průměrnou hodnotu, zobrazen je 95% konfidenční interval. Malá písmena (a, b) označují signifikantní rozdíly mezi skupinami u jednotlivých populací.

Po 56-ti dnech od vysetí semen bylo zjištěno procento přeživších semenáčků. U metaliferních populací (**M1**, **M2**, **M3**) přežilo průměrně více jak 80 % semenáčků ve všech půdách, u ostatních populací (**C1**, **C2**, **S**) bylo procento přežitých semenáčků také vysoké, tedy až na semenáčky v půdě **M3**. U populace **C1** v půdě **M3** nepřežila žádná rostlina, u populace **C2** už některé rostliny dokázaly přežít a průměr přežitých rostlin činí 16 %, hadcová populace (**S**) se s nehostinými podmínkami půdy **M3** vyrovnala lépe a přežilo zde průměrně 77 % semenáčků. Rozdíly u těchto tří populací byly potvrzeny i pomocí analýzy variance GLM (Tabulka 8), následné testy signifikantně určily rozlišení mezi procentem přežití semenáčků v půdě **M3** a v ostatních půdách (Obrázek 16).

Tabulka 8: Výsledky GLM modelů testujících efekt půdy na procento semenáčků, které přežily po dobu 56 dní.

Procento přeživších semenáčků - ANOVA(null.model, model)				
Populace	χ^2	df	p-hodnota; grafické znázornění	
C1	452,266	5	< 0,001	***
C2	296,587	5	< 0,001	***
S	36,230	5	< 0,001	***
M1	9,753	5	0,0825	
M2	8,022	5	0,1550	
M3	11,103	5	0,0494	*



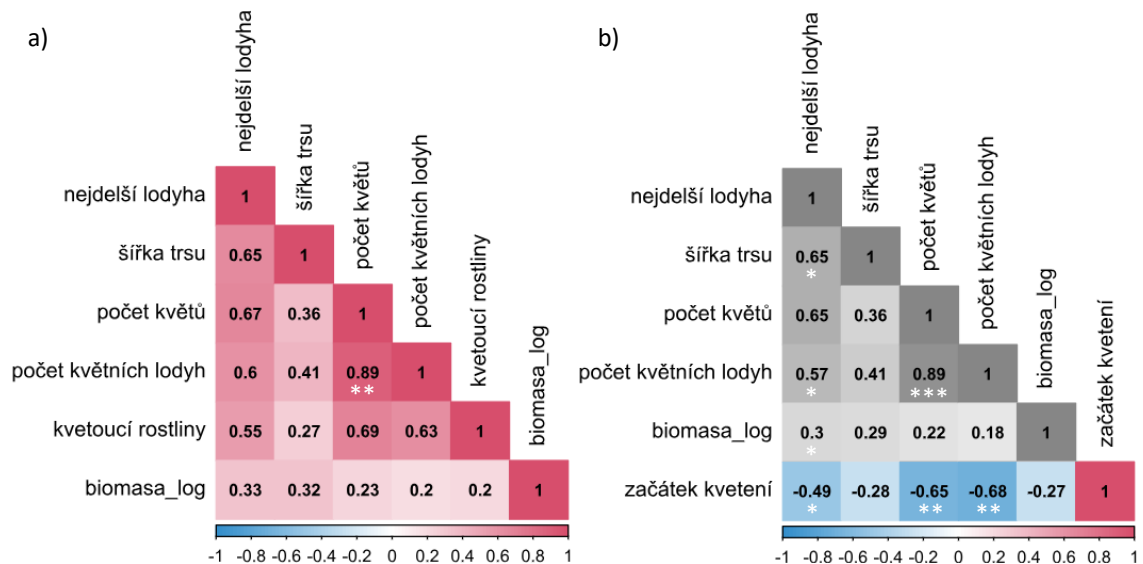
Obrázek 16: Vliv půdy na procento semenáčků, které přežily po dobu 56 dní u jednotlivých populací. Body značí průměrnou hodnotu, zobrazen je 95% konfidenční interval. Malá písmena (a, b) označují signifikantní rozdíly mezi skupinami u jednotlivých populací.

Po dobu klíčení byl výraznější vliv půdy, ve kterých byla semena klíčena, pozorován zejména u míry přežívání semenáčků, na který měla půda **M3** negativní efekt, u podílu vyklíčených semen nebyl vliv půdy moc výrazný. Rozdíl v rychlosti klíčení semen (t_{50}) nebyl ani tak patrný v rámci populací vlivem různých půd, různá rychlost klíčení byla pozorována spíše mezi jednotlivými populacemi.

4.2.2 Kultivace rostlin

Během kultivace rostlin byly sledovány následující znaky: délka nejdelší lodyhy (cm), šířka trsu rostliny (cm), počet květních lodyh a počet květů. V průběhu kultivace (po 6 měsících po vysetí) byla z každého květináče sebrána jedna rostlina (pouze v případě, že se v květináči nacházely alespoň dvě živé rostliny) pro měření nadzemní biomasy (mg). Také bylo u jednotlivých rostlin zaznamenáno, jestli rostlina během vegetační sezóny vykvetla nebo jestli uhynula.

Korelace mezi hodnotami získanými v průběhu kultivace rostlin byla vypočtena (Obrázek 17a) u celkového počtu 469 rostlin (dataset 2, Tabulka 4c). Vyšší Pearsonův korelační koeficient (0,89, $p < 0,001$) byl pozorován mezi počtem květů a počtem květních lodyh. Korelace začátku kvetení rostlin byla vypočítána z datasetu 4 bez znaku, jestli rostlina kvetla (Obrázek 17b), v tomto datasetu jsou obsažené pouze kvetoucí rostliny, tudíž jsou výsledky odlišné od předchozího výpočtu, důležitý je pouze spodní řádek. Začátek kvetení rostlin je negativně korelovaný s délkou nejdelší lodyhy, počtem květů a počtem květních lodyh, jelikož květní lodyhy jsou delší než vegetativní a čím dříve rostliny začaly kvést, tím měly více květů a květních lodyh v době, která byla vybrána pro porovnání znaků.



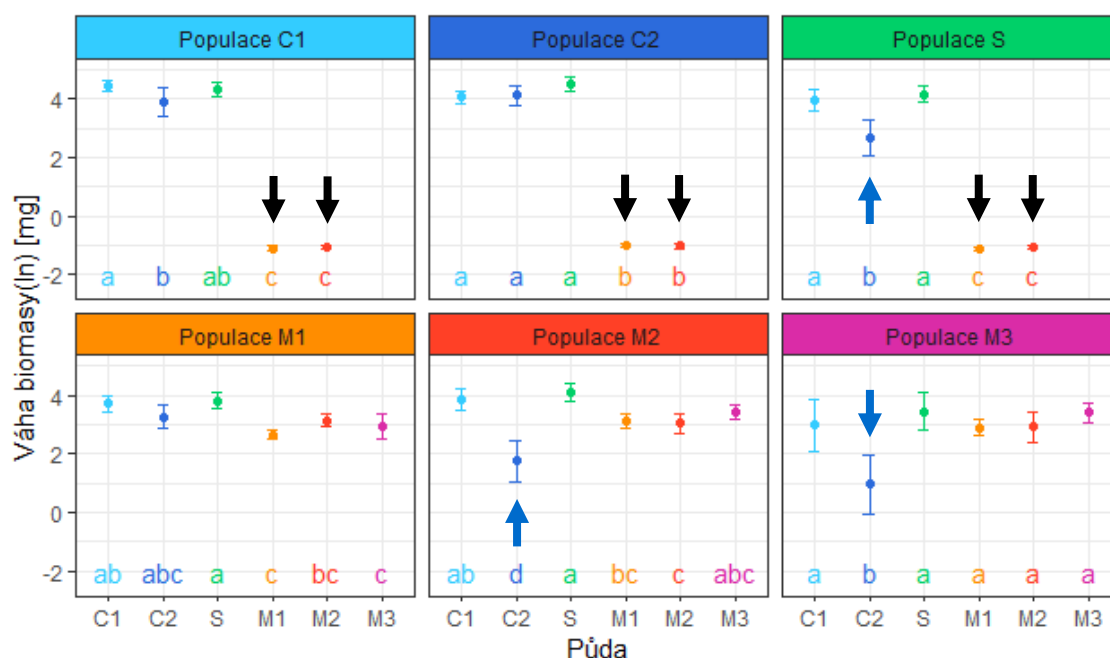
Obrázek 17: Korelace mezi znaky hodnotící *fitness* rostlin. Hodnoty odrážejí Pearsonův korelační koeficient, stínování znázorňuje hodnotu korelačního koeficientu; a) korelace mezi porovnávanými znaky datasetu 3; b) korelace mezi začátkem kvetení a ostatními znaky (dataset 4).

Nejprve byl analyzován vliv půdy na hmotnost biomasy rostlin získané v průběhu kultivace. Do analýzy byly zahrnuty údaje z celkového počtu 611 rostlin.

U nemetaliferních populací (C1, C2, S) chybí data o váze biomasy rostlin z půdy M3, jelikož všechny rostliny v této půdě uhynuly. Některé další skupiny obsahovaly nižší počet pozorování v důsledku úhynu rostlin (Tabulka 4). Analýza variance GLM modelů prokázala signifikantní vliv půdy na váhu biomasy rostlin u všech populací (Tabulka 9).

Tabulka 9: Výsledky GLM modelů testujících efekt půdy na váhu biomasy rostlin po uplynutí 6-ti měsíců od vysetí.

Biomasa - ANOVA(null.model, model)				
Populace	χ^2	df	p-hodnota; grafické znázornění	
C1	252,063	4	< 0,001	***
C2	199,104	4	< 0,001	***
S	207,458	4	< 0,001	***
M1	36,800	5	< 0,001	***
M2	67,444	5	< 0,001	***
M3	36,233	5	< 0,001	***



Obrázek 18: Vliv půdy na váhu biomasy rostlin po uplynutí 6-ti měsíců od vysetí. Body značí průměrnou hodnotu, zobrazen je 95% konfidenční interval. Malá písmena (a, b, c) označují signifikantní rozdíly mezi skupinami u jednotlivých populací. Šipky značí signifikantně nižší biomasu rostlin.

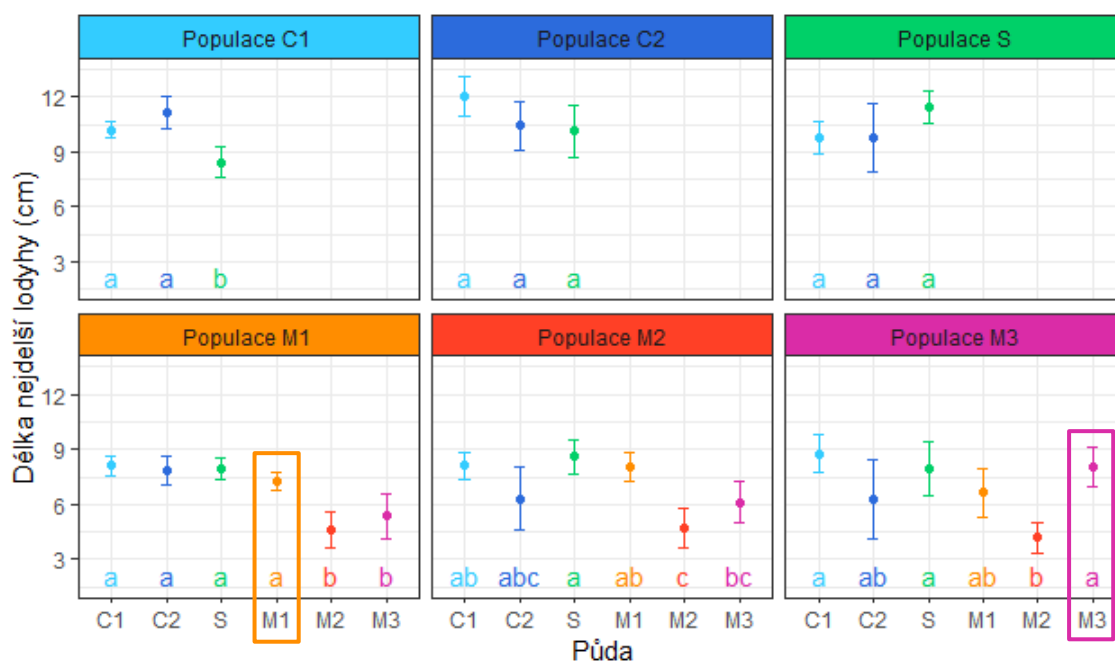
Váha biomasy nemetaliferních populací (C1, C2, S) byla výrazně nižší (menší jak 0,5 mg) u rostlin pěstovaných v metaliferních půdách M1 a M2 než v nemetaliferních půdách C1, C2 a S (v půdě M3 nepřežila žádná rostlina). Vždy se jednalo o malé rostlinky, které kromě dvou děložních lístků nesly maximálně další pár lístků, které

nebyly větší jak děložní lístky. Váha biomasy metaliferních populací v metaliferních půdách se výrazně nelišila. U populací **S**, **M2** a **M3** se výrazně lišila také biomasa rostlin vypěstovaných v půdě **C2** (Obrázek 18).

Analýza vlivu půdy na délku nejdelší lodyhy, šířku trsu a počtu květů byla zpracována na základě hodnot z celkového počtu 496 rostlin, v důsledku uhynutí rostlin (Tabulka 4c). Vliv půdy na délku nejdelší lodyhy rostlin byl prokázán v populacích **C1**, **M1**, **M2** a **M3** (Tabulka 10).

Tabulka 10: Výsledky GLM modelů testujících efekt půdy na délku nejdelší lodyhy rostlin po uplynutí 8 měsíců od vysetí.

Délka nejdelší lodyhy - ANOVA(null.model, model)				
Populace	χ^2	df	p-hodnota; grafické znázornění	
C1	26,302	2	< 0,001	***
C2	5,534	2	0,063	
S	5,185	2	0,075	
M1	54,886	5	< 0,001	***
M2	37,806	5	< 0,001	***
M3	30,390	5	< 0,001	***



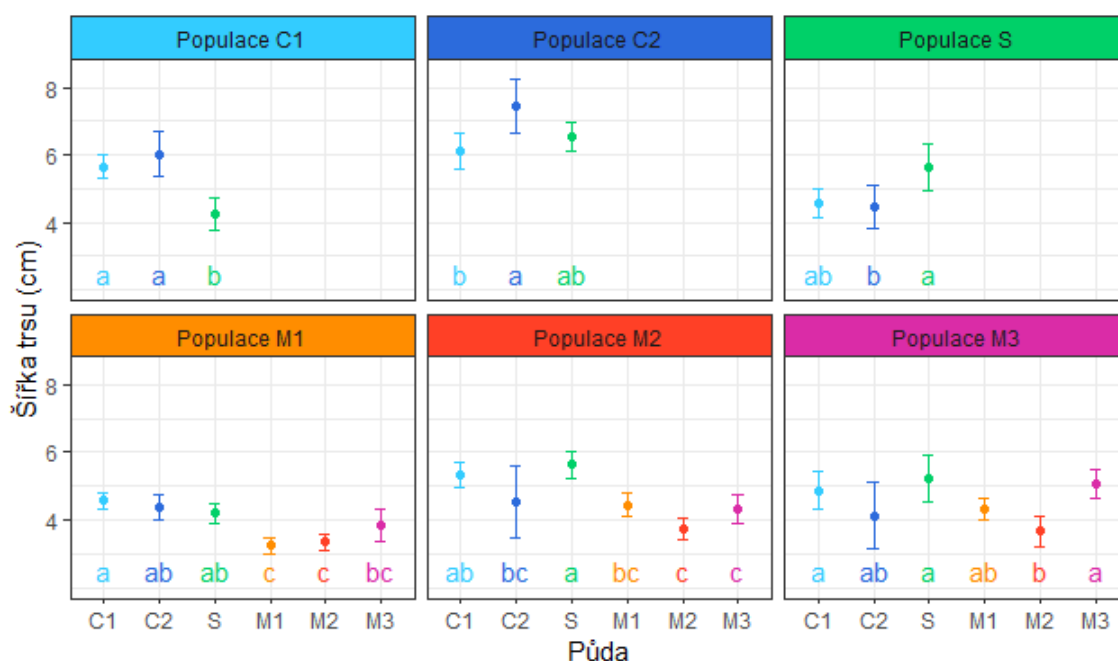
Obrázek 19: Vliv půdy na délku nejdelší lodyhy rostlin po uplynutí 8 měsíců od vysetí. Body značí průměrnou hodnotu, zobrazen je 95% konfidenční interval. Malá písmena (a, b, c) označují signifikantní rozdíly mezi skupinami u jednotlivých populací. Obdélníky značí metaliferní populace, které mají vysokou hodnotu měřeného znaku ve své vlastní půdě.

Nemetaliferní populace (C1, C2, S) si vedly dobře ve všech nemetaliferních půdách, jen u populace C1 byla délka lodyh signifikantně kratší u rostlin v hadcové půdě S. Metaliferní populace (M1, M2, M3) rostly dobře v nemetaliferních půdách, signifikantně kratší lodyhy byly pozorovány v půdě M2. Populace M1 a M3 měly dlouhé lodyhy také ve vlastních půdách (Obrázek 19).

Signifikantní rozdíl v šířce trsu rostlin byl zjištěn u všech populací (Tabulka 11).

Tabulka 11: Výsledky GLM modelů testujících efekt půdy na šířku trsu rostlin po uplynutí 8 měsíců od vysetí.

Šířka trsu - ANOVA(null.model, model)				
Populace	χ^2	df	p-hodnota; grafické znázornění	
C1	23,012	2	< 0,001	***
C2	9,236	2	0,010	**
S	8,525	2	0,014	*
M1	55,087	5	< 0,001	***
M2	41,789	5	< 0,001	***
M3	29,059	5	< 0,001	***



Obrázek 20: Vliv půdy na šířku trsu rostlin po uplynutí 8 měsíců od vysetí. Body značí průměrnou hodnotu, zobrazen je 95% konfidenční interval. Malá písmena (a, b, c) označují signifikantní rozdíly mezi skupinami u jednotlivých populací.

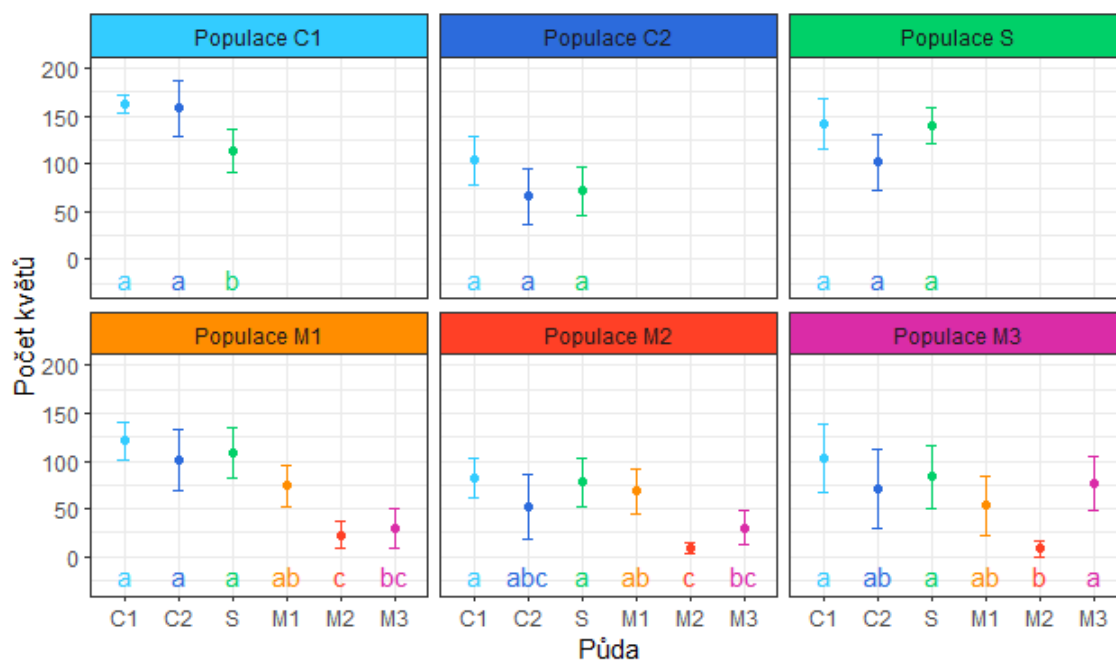
Populace C1 tvořila signifikantně menší trsy v hadcové půdě (S). Populacím C2 a S se nejlépe dařilo ve vlastních půdách. Metaliferní populace M1 měla širší trs

v nemetaliferních půdách. Populace **M2** a **M3** vykazovaly podobné hodnoty u jednotlivých půd, ale skupiny náležely často více kategoriím díky překryvu konfidenčních intervalů (Obrázek 20).

Analýza variance GLM modelů pro počet květů prokázala signifikantní vliv půdy na počet květů u 5 populací (**C1**, **S**, **M1**, **M2**, **M3**; Tabulka 12), následná analýza odlišila rostliny z různých půd do kategorií u 4 populací (**C1**, **M1**, **M2**, **M3**; Obrázek 21).

Tabulka 12: Výsledky GLM modelů testujících efekt půdy na počet květů po uplynutí 8 měsíců od vysetí.

Počet květů - ANOVA(null.model, model)				
Populace	χ^2	df	p-hodnota; grafické znázornění	
C1	12,719	2	0,002	*
C2	4,957	2	0,084	
S	6,461	2	0,040	*
M1	53,602	5	< 0,001	***
M2	34,578	5	< 0,001	***
M3	23,519	5	< 0,001	***



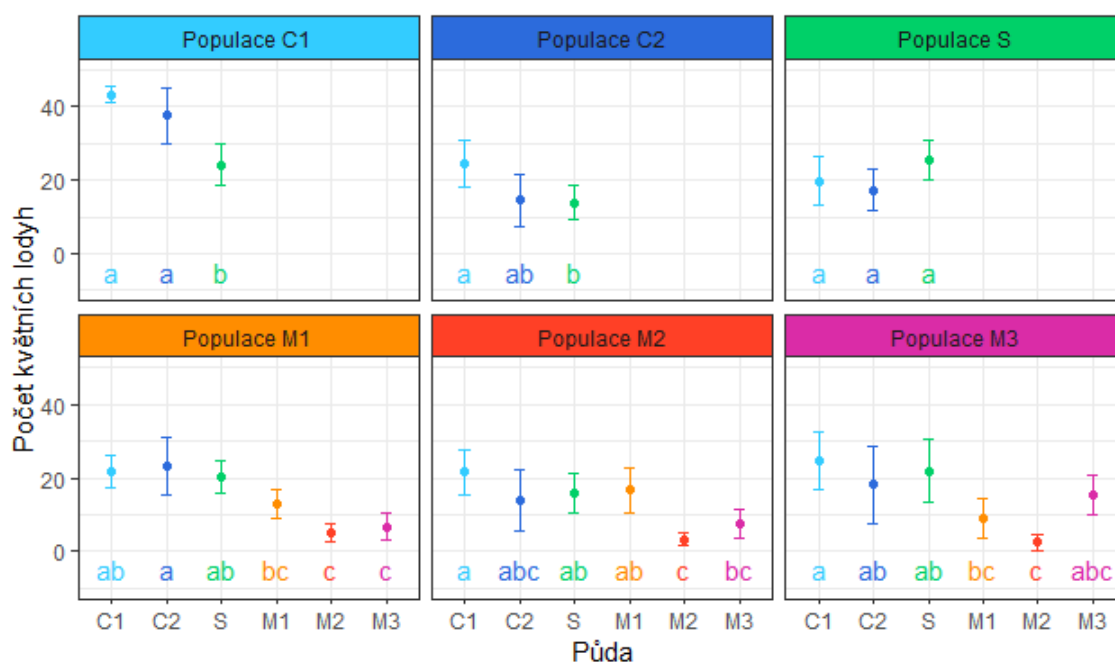
Obrázek 21: Vliv půdy na počet květů rostlin po uplynutí 8 měsíců od vysetí. Body značí průměrnou hodnotu, zobrazen je 95% konfidenční interval. Malá písmena (a, b, c) označují signifikantní rozdíly mezi skupinami u jednotlivých populací.

Největší počet květů byl pozorován u všech populací v půdě **C1**, to je zapříčiněno také díky tomu, že v půdě **C1** začínaly rostliny kvést jako první. U metaliferních populací byl všeobecně menší počet květů u rostlin pěstovaných v půdě **M2**.

Počet květních lodyh je typem půdy ovlivněn podobně jako počet květů (Tabulka 13; Obrázek 22). Výsledky u metaliférních populací jsou porovnatelné s výsledky u počtu květů. Nejméně květních lodyh měly rostliny v půdě **M2**. U populace **C2** byl počet květních lodyh prokazatelně vyšší v půdě **C1** než v hadcové půdě **S**.

Tabulka 13: Výsledky GLM modelů testujících efekt půdy na počet květních lodyh rostlin po uplynutí 8 měsíců od vysetí.

Počet květních lodyh - ANOVA(null.model, model)				
Populace	χ^2	df	p-hodnota; grafické znázornění	
C1	22,998	2	< 0,001	***
C2	8,901	2	0,012	*
S	4,055	2	0,132	
M1	46,439	5	< 0,001	***
M2	31,448	5	< 0,001	***
M3	30,273	5	< 0,001	***



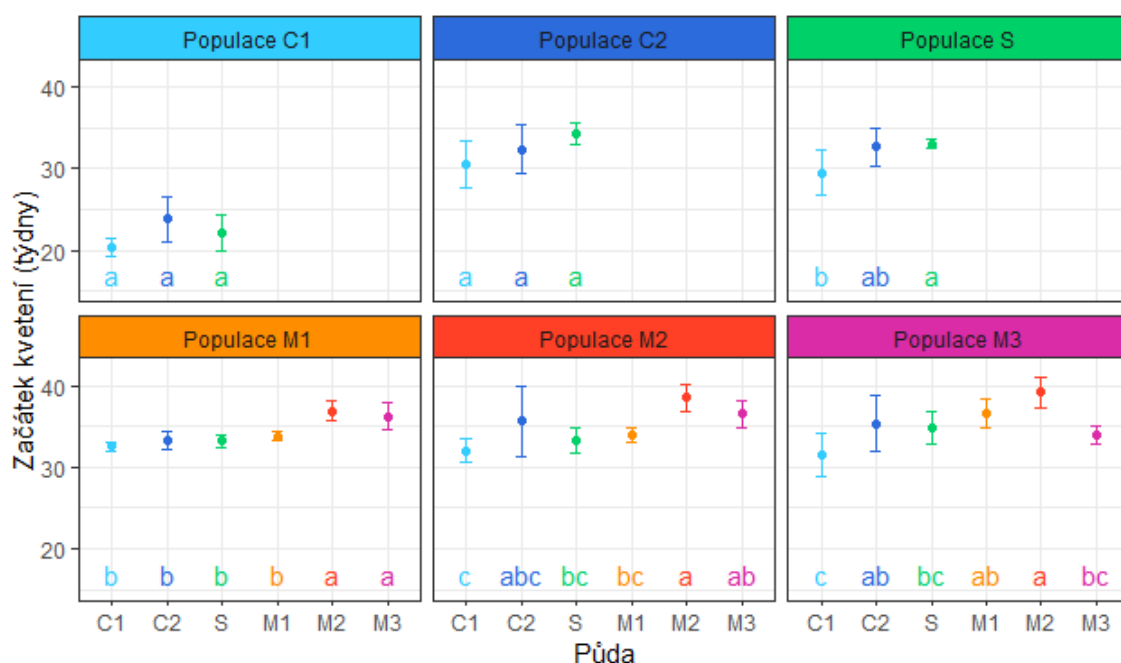
Obrázek 22: Vliv půdy na počet květních lodyh rostlin po uplynutí 8 měsíců od vysetí. Body značí průměrnou hodnotu, zobrazen je 95% konfidenční interval. Malá písmena (a, b, c) označují signifikantní rozdíly mezi skupinami u jednotlivých populací.

V nemetaliférních populacích **C1** a **C2** nebyl prokázán vliv půdy na počátek kvetení rostlin, u ostatních populací byl rozdíl začátku kvetení v různých půdách signifikantní (Tabulka 14). U hadcové populace dříve kvetly rostliny v půdě **C1** než ve vlastní hadcové půdě **S**. U metaliférní půdy **M1** kvetly rostliny později v půdách **M2**

a **M3** než v ostatních půdách. Kategorie u populací **M2** a **M3** se často překrývaly, ale do nejdříve kvetoucí kategorie v obou případech čistě spadaly rostliny pěstované v nemetaliferní půdě **C1** (Obrázek 23).

Tabulka 14: Výsledky GLM modelů testujících efekt půdy na začátek kvetení rostlin v průběhu experimentu.

Začátek kvetení rostlin - ANOVA (null.model, model)				
Populace	χ^2	df	p-hodnota; grafické znázornění	
C1	5,485	2	0,064	
C2	4,293	2	0,117	
S	6,933	2	0,031	*
M1	52,640	5	< 0,001	***
M2	33,271	5	< 0,001	***
M3	29,421	5	< 0,001	***



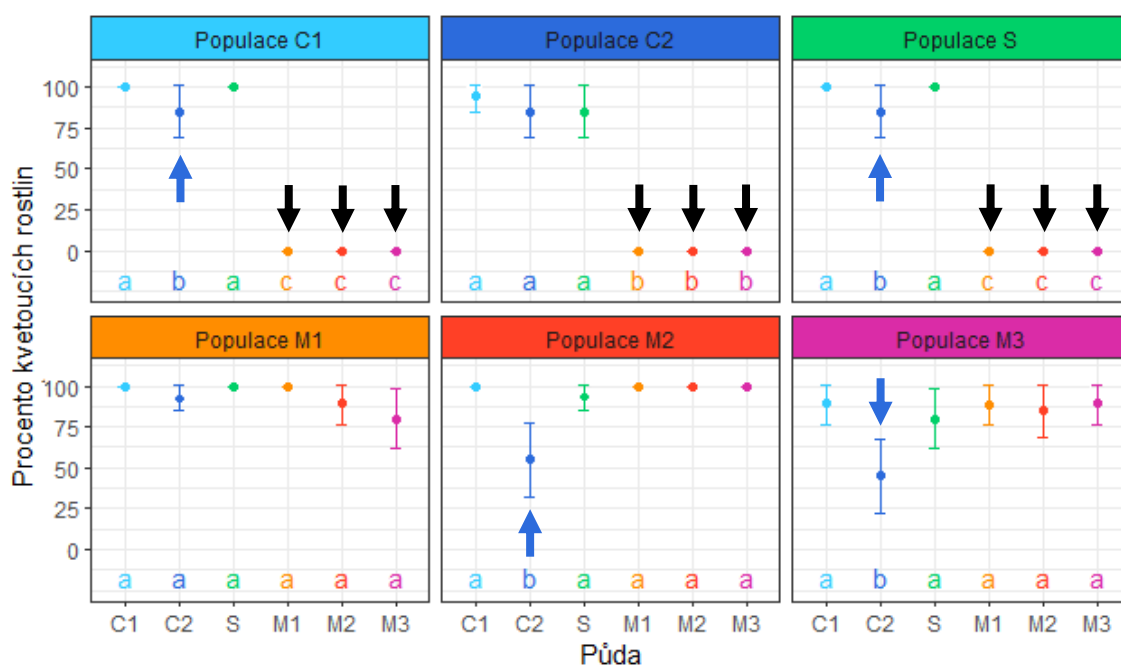
Obrázek 23: Vliv půdy na začátek kvetení rostlin v průběhu experimentu. Body značí průměrnou hodnotu, zobrazen je 95% konfidenční interval. Malá písmena (a, b, c) označují signifikantní rozdíly mezi skupinami u jednotlivých populací.

Vliv půdy měl za následek také rozdíl v procentu kvetoucích rostlin za celý experiment. Tento vliv byl statisticky prokázán a byl signifikantní u všech populací (Tabulka 15). V nemetaliferních populacích (**C1**, **C2**, **S**) se signifikantně lišily rostliny pěstované v metaliferních půdách (**M1**, **M2**, **M3**), žádná z rostlin totiž nevykvetla, všechny uhynuly. V nemetaliferních půdách bylo průměrné procento kvetoucích rostlin

vyšší jak 80 %. Přesto se u populací **C1** a **S** signifikantně liší procento kvetoucích rostlin v půdě **C2**, které je oproti rostlinám z ostatních nemetaliferních půd o něco nižší. Nižší procento kvetoucích rostlin v této půdě (**C2**) je pozorováno také u populací **M2** a **M3**, kde se hodnoty pohybují mezi 40–60 % (Obrázek 24).

Tabulka 15: Výsledky GLM modelů testujících efekt půdy na procento kvetoucích rostlin.

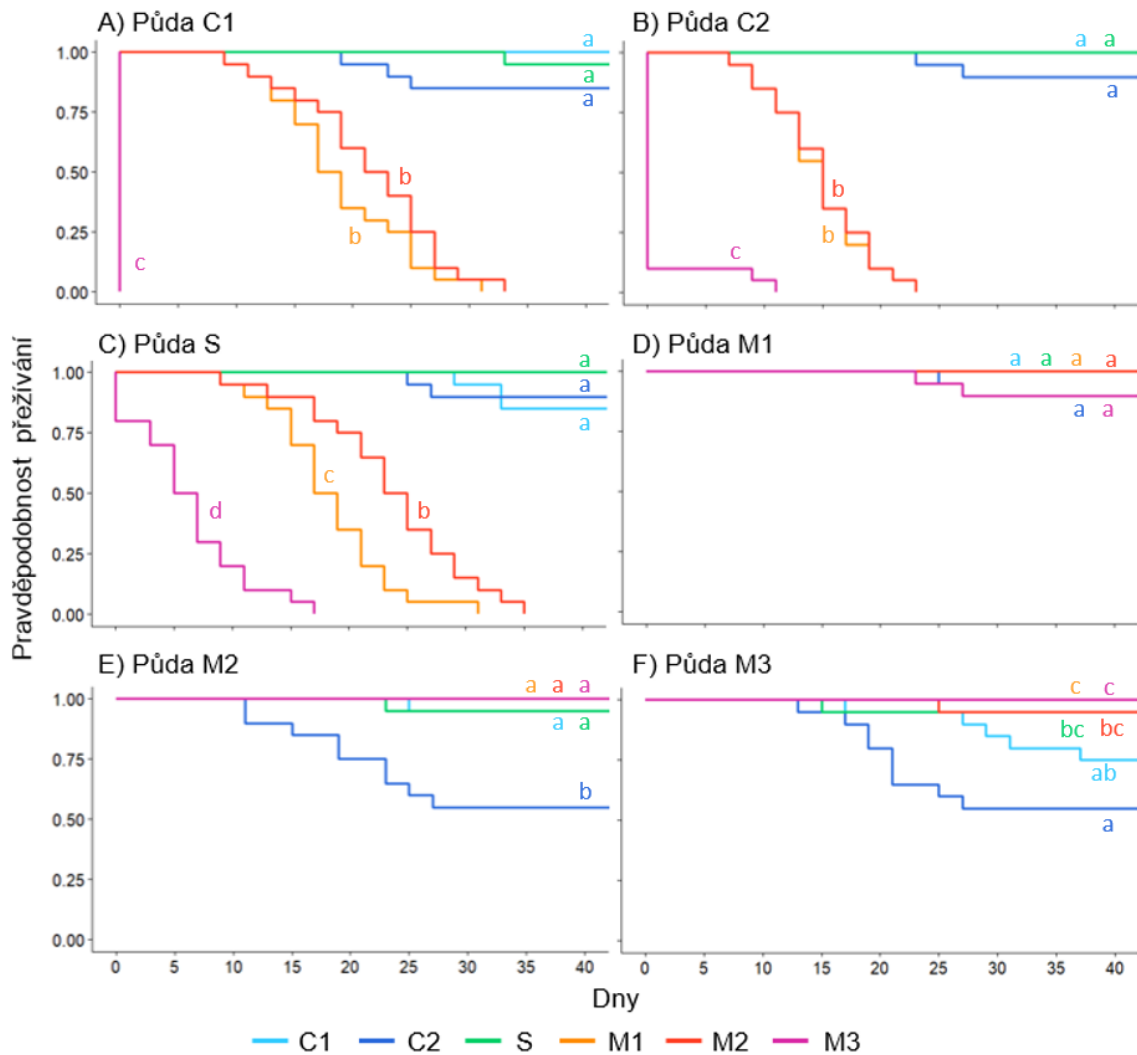
kvetoucí rostliny - ANOVA(null.model, model)				
Populace	χ^2	df	p-hodnota; grafické znázornění	
C1	295,512	5	< 0,001	***
C2	192,201	5	< 0,001	***
S	295,512	5	< 0,001	***
M1	12,406	5	0,030	*
M2	52,875	5	< 0,001	***
M3	26,462	5	< 0,001	***



Obrázek 24: Vliv půdy na procento kvetoucích rostlin. Body značí průměrnou hodnotu, zobrazen je 95% konfidenční interval. Malá písmena (a, b, c) označují signifikantní rozdíly mezi skupinami u jednotlivých populací.

Vliv půdy v průběhu kultivace rostlin se projevil i na přežívání rostlin (Obrázek 25). U nemetaliferních populací (**C1**, **C2**, **S**) nepřežily žádné rostliny pěstované v metaliferních půdách (**M1**, **M2**, **M3**), naopak průměrný počet rostlin z nemetaliferních půd (**C1**, **C2**, **S**) převyšoval vždy 90 %. V případě populace **C1** nepřežily žádné semenáčky do fáze kultivace, všechny uhynuly už během klíčení. U populace **C2** bylo na

začátku fáze kultivace pouze 10 % semenáčků (2 rostliny). V populaci **C2** uhynuly rostliny pěstované v půdách **M1** a **M2**, rostliny populace **C1** rychleji umíraly v půdě **M1**. V hadcové populaci **S** přeživaly nejlépe rostliny z půdy **M2**, následně **M1** a nejhůře **M3**. Více jak 90 % rostlin populace **M1** přežilo ve všech půdách. U zbylých populacích **M2** a **M3** klesl počet živých rostlin v průběhu experimentu pod 60 % v půdě **C2**.



Obrázek 25: Vliv půd na přežívání rostlin jednotlivých populací v průběhu pokusu.

Dále bylo analyzováno, jestli se od sebe jednotlivé křivky znázorňující přežívání rostlin v dané půdě liší. V populacích **C1** a **C2** byly rozdíly pravděpodobnosti přežívání rostlin v různých půdách stejné. Vylíšily se nemetaliferní půdy, ve kterých rostliny přeživaly nejlépe, hůře pak přeživaly v půdách **M1** a **M2**, v půdě **M3** rostliny přeživaly nejhůře. Hadcová populace přeživala stejně v nemetaliferních půdách **C1**, **C2** a **S**, naopak přežívání v metaliferních půdách je odlišné pro každou půdu zvláště sestupně pro půdy **M2**, **M1** a **M3**. Populace **M1** přeživala ve všech půdách obdobně a pravděpodobnost

přežívání byla vysoká. V populaci **M2** přežívaly rostliny hůře v půdě **C2**. Pro populaci **M3** je přežívání rostlin různých půdách hůře rozlišitelné, nižší pravděpodobnost přežívání rostlin byla zaznamenán v půdách **C1** a **C2**.

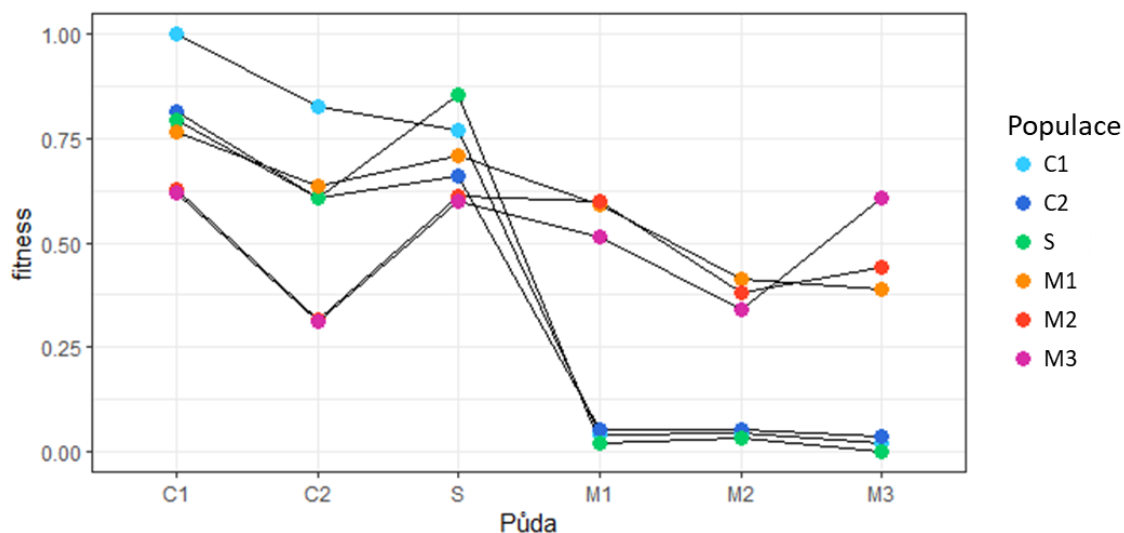
Z jednotlivých analýz znaků lze vysledovat, že metaliferní půdy (**M1**, **M2**, **M3**) mají negativní vliv na růst a přežívání rostlin z nemetaliferních stanovišť (**C1**, **C2**, **S**). U metaliferních populací **M2** a **M3** má půda **C2** negativní vliv na biomasu a procento kvetoucích rostlin.

4.2.3 Kumulativní *fitness*

Měřené znaky rostlin byly použity pro výpočet *fitness* rostlin, která byla dále porovnána mezi populacemi a půdami, ve kterých rostliny byly pěstovány (Tabulka 16, Obrázek 26). Celkově nejvyšší *fitness* měly rostliny populace **C1** pěstované ve vlastní půdě, nejnižší *fitness* měly nemetaliferní populace **C1**, **C2** a **S** v metaliferních půdách **M1**, **M2** a **M3**, jelikož od vysetí přežívaly pouze v zakrslé formě a postupně všechny zahynuly. Ve své vlastní půdě nejlépe prosperovaly rostliny populací **C1**, **S** a **M3**. Obecně měly rostliny všech populací vysoké *fitness* v půdách **C1** a **S**. Naopak metaliferní populace **M2** a **M3** měli sníženou *fitness* ve vápencové půdě **C2**.

Tabulka 16: *Fitness* rostlin pro jednotlivé kombinace populace a půdy

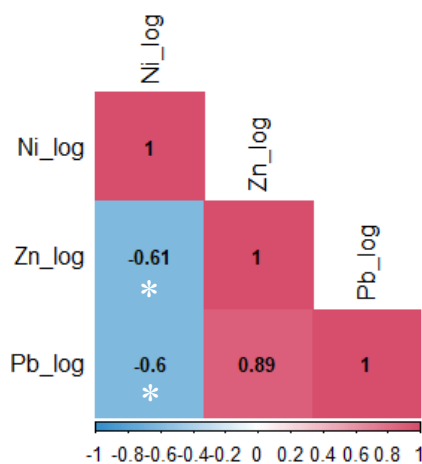
	půda C1	půda C2	půda S	půda M1	půda M2	půda M3
populace C1	1,000	0,848	0,844	0,176	0,182	0,15
populace C2	0,919	0,766	0,802	0,193	0,193	0,173
populace S	0,794	0,678	0,869	0,148	0,165	0,124
populace M1	0,806	0,717	0,764	0,703	0,608	0,566
populace M2	0,742	0,457	0,733	0,727	0,606	0,629
populace M3	0,716	0,427	0,702	0,660	0,555	0,717



Obrázek 26: Porovnání kumulativních *fitness* hodnot mezi populacemi v různých půdách. Pro výpočet byly zahrnuty následující znaky: klíčivost, rychlost klíčení, biomasa, délka nejdější lodyhy, průměr trsu, počet květů, počet květních lodyh, začátek kvetení, procento kvetoucích rostlin a procento přeživších rostlin.

4.3 Prvková analýza rostlin

Pro prvkové analýzy rostlin byly použity rostliny z experimentu II. Všechny populace byly nejdříve pěstovány v zahradním substrátu a po 5-ti měsících byly přesazeny do hadcové a metaliferních půd (**S**, **M1**, **M2**, **M3**). Z každé kombinace populace/půda bylo sesbíráno 5 rostlin. Prvkové analýzy byly provedeny zvlášť pro nadzemní (listy), tak pro podzemní biomasu (kořeny). Byl analyzován obsah Ni, Zn a Pb pomocí ICP-OES.

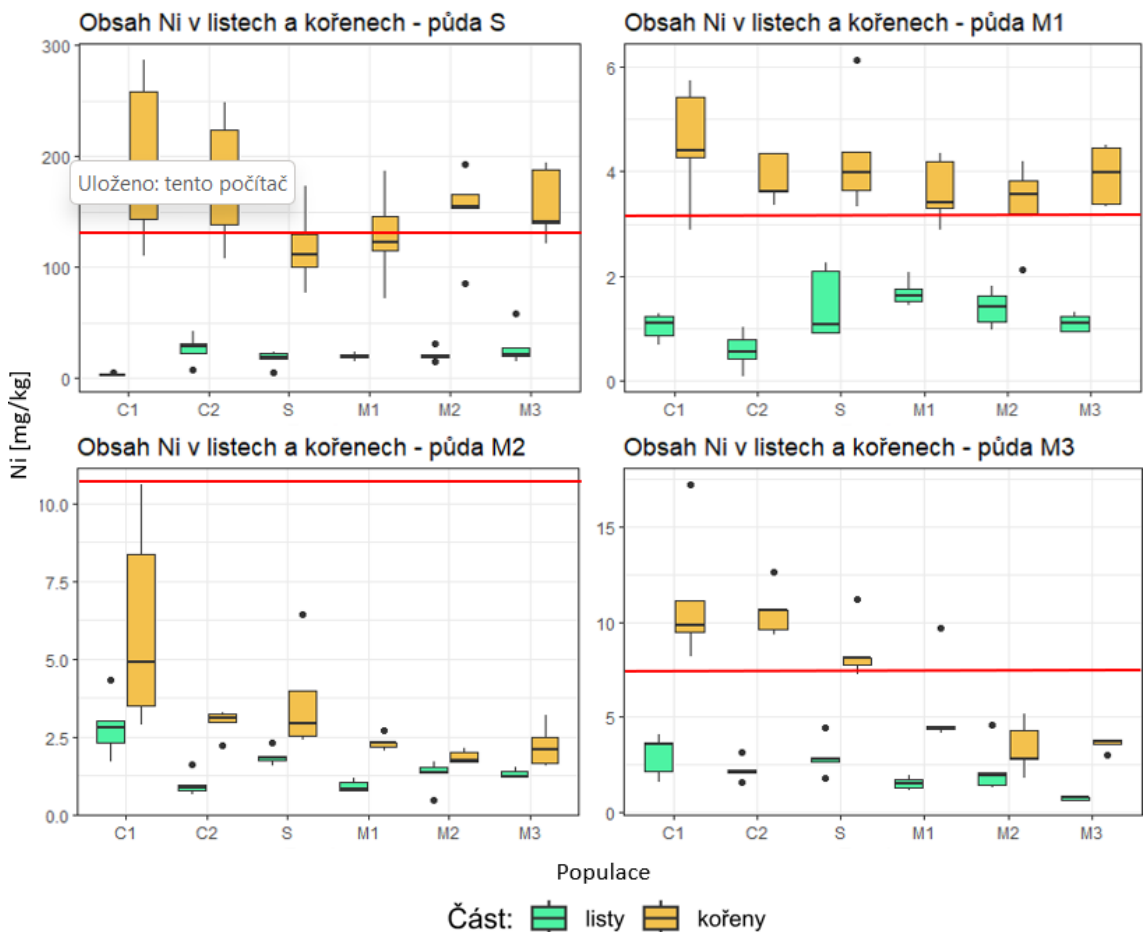


Obrázek 27: Korelace mezi obsahy těžkých kovů (Ni, Zn, Pb) v rostlinách. Hodnoty odrážejí Pearsonův korelační koeficient, stínování znázorňuje míru korelace.

Nejprve byly vypočítány korelační párové koeficienty jednotlivých znaků a jejich signifikance (Obrázek 27). Byla pozorována pozitivní korelace mezi obsahy Zn a Pb, naopak obsah Ni byl negativně korelován s obsahem Zn a Pb.

4.3.1 Nikl

Nikl je kov, který se vyskytuje především v hadcové půdě ve větším množství, v ostatních půdách se vyskytuje jen ve stopovém množství. Právě v hadcové půdě (S) byla zaznamenána jeho nejvyšší koncentrace v rostlinách, vysoké koncentrace v kořenech obsahovaly rostliny ze všech populací (Obrázek 28). Ve většině případů se významně lišil obsah Ni v kořenech a v listech (párový t-test, Příloha 2), přičemž obsah niklu v kořenech byl buď větší než v listech nebo se obsahy nelišily – populace C1 v půdě M2 a populace M2 v půdách M2 a M3 (Tabulka 17). Koncentrace Ni v listech byla vždy nižší než koncentrace Ni v půdách.



Obrázek 28: Obsah Ni v různých částech rostliny (listy a kořeny, odlišeno pomocí barev) u populací pěstovaných ve stejném typu půdy A) hadcová S, B) metaliferní M1, C) metaliferní M2, D) metaliferní M3. Obsah kovu je znázorněn pomocí boxplotů. Obsah Ni v půdách je znázorněn červeně.

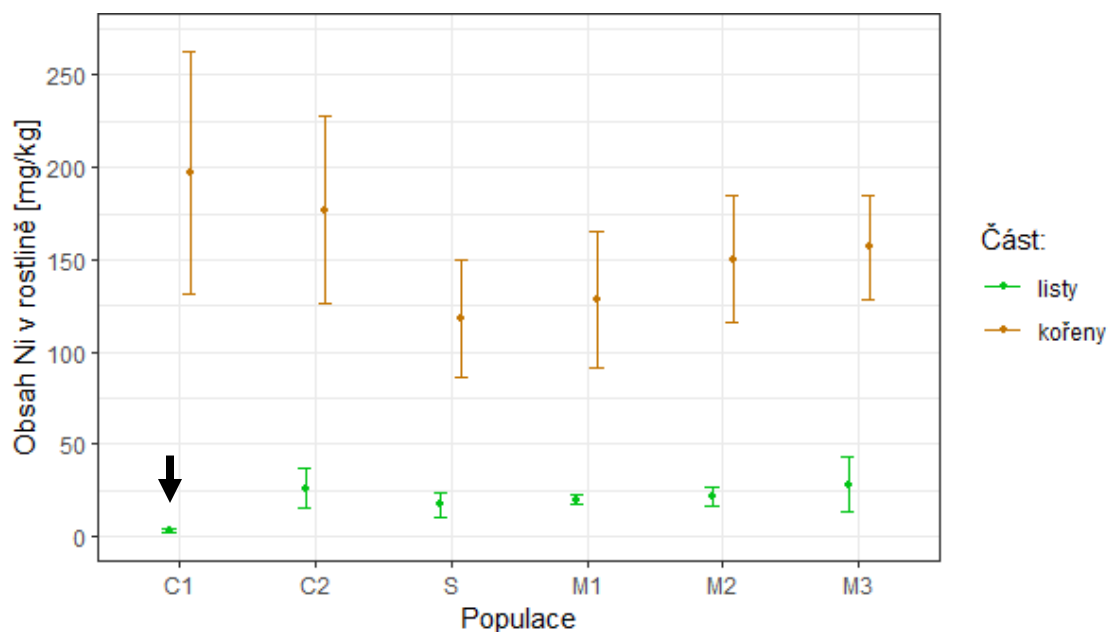
Tabulka 17: Odlišnosti obsahu Ni v kořenech a listech na základě t-testu. Hvězdičky udávají prokazatelně vyšší obsah Ni v kořenech nežli v listech, počet hvězdiček udává signifikanci. V případě, že se obsahy průkazně neliší, je uvedeno “neliší se”.

	Půda S	Půda M1	Půda M2	Půda M3
Populace C1	***	***	neliší se	***
Populace C2	***	***	***	***
Populace S	***	***	*	***
Populace M1	***	***	***	***
Populace M2	***	***	neliší se	neliší se
Populace M3	***	***	*	***

Analýza variance prokázala, že na obsah Ni v listech i v kořenech je závislý jak na typu půdy, tak na původu populace, průkazný je i vliv interakce mezi populací a půdou (Tabulka 18). Blíže byly analyzovány rostliny pěstované v hadcové půdě. Signifikantně menší obsah Ni v listech byl u populace C1 (Anova, $df = 5$, $\chi^2 = 17,8$, $p < 0,001$), obsahy Ni v kořenech se mezi populacemi nelišily (Obrázek 29).

Tabulka 18: Výsledky analýzy variance vlivu půdy, populace a jejich interakce na obsah Ni v listech a v kořenech.

kořeny					
	df	suma čtverců	F-hodnota	p-hodnota	
půda	3	298,88	1234,48	< 0,001	***
populace	5	7,06	17,51	< 0,001	***
půda:populace	15	5,14	4,24	< 0,001	***
residuály	96	7,75			
listy					
	df	suma čtverců	F-hodnota	p-hodnota	
půda	3	129,25	296,68	< 0,001	***
populace	5	2,80	3,50	0,006	**
půda:populace	15	31,29	13,06	< 0,001	***
residuály	96	15,34			



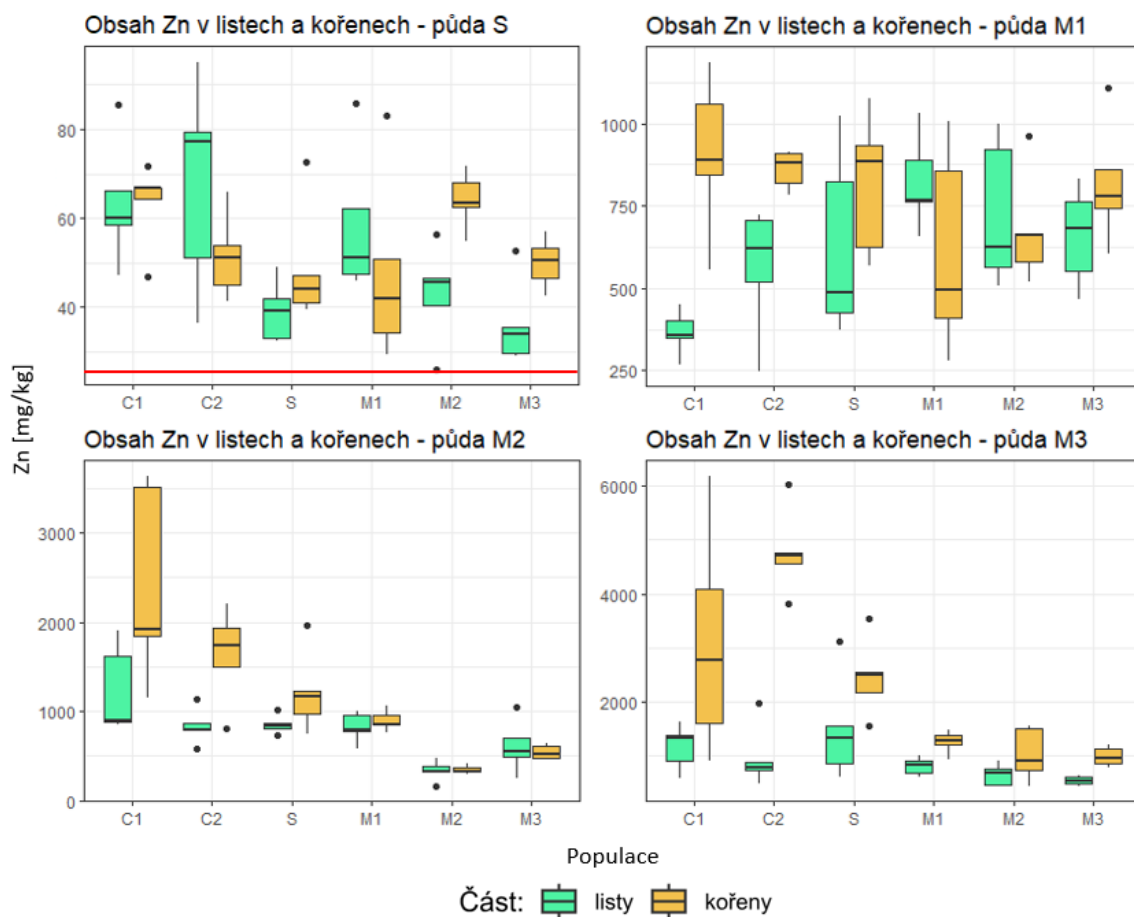
Obrázek 29: Porovnání obsahu Ni u populací pěstovaných v hadcové půdě. Body značí průměrnou hodnotu, zobrazen je 95% konfidenční interval. Pouze obsah Ni v listech populace C1 se významně lišil od obsahu kovu v litech jiných populací.

4.3.2 Zinek

Metalliferní půdy obsahovaly zvýšené množství Zn. Nejnižší koncentrace byla v půdě **M1** (téměř $3\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), vysoký obsah Zn měla půda **M2** (téměř $25\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nejvíc půda **M3** (přes $30\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). V hadcové půdě **S** rostliny obsahovaly nejnižší koncentrace Zn ve svých pletivech, avšak vždy se jednalo o vyšší koncentraci, než která byla naměřená v půdě (Obrázek 30). V ostatních půdách **M1**, **M2** a **M3** byly koncentrace Zn v pletivech nižší jak v půdách. Ve většině případech nebyl pozorován významný rozdíl množství Zn v kořenech a v listech (párový t-test, Příloha 2). V tabulce 19 jsou zaznamenány případy, kdy bylo v kořenech významně větší množství Zn než v listech.

Tabulka 19: Odlišnosti obsahu Zn v kořenech a listech na základě t-testu. Hvězdičky udávají prokazatelně vyšší obsah Zn v kořenech nežli v listech. V případě, že se obsahy průkazně neliší, je uvedeno "neliší se".

	Půda S	Půda M1	Půda M2	Půda M3
Populace C1	neliší se	***	neliší se	neliší se
Populace C2	neliší se	neliší se	*	**
Populace S	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se
Populace M1	neliší se	neliší se	neliší se	**
Populace M2	*	neliší se	neliší se	neliší se
Populace M3	*	neliší se	neliší se	***



Obrázek 30: Obsah Zn v různých částech rostliny (listy a kořeny, odlišeno pomocí barev) u populací pěstovaných ve stejném typu půdy A) hadcová **S**, B) metaliferní **M1**, C) metaliferní **M2**, D) metaliferní **M3**. Obsah kovu je znázorněn pomocí boxplotů. Obsah Zni v půdě **S** je znázorněn červenou linkou, v ostatních půdách jsou koncentrace mnohem vyšší jak v rostlině.

Analýza variance prokázala, že na obsah Zn v listech i v kořenech je závislý jak na typu půdy, tak na původu populace, průkazný je i vliv interakce mezi populací a půdou (Tabulka 20).

Tabulka 20: Výsledky analýzy variance vlivu půdy, populace a jejich interakce na obsah Zn v listech a v kořenech.

kořeny					
	df	suma čtverců	F-hodnota	p-hodnota	
půda	3	216,41	704,12	< 0,001	***
populace	5	12,14	23,70	< 0,001	***
půda:populace	15	11,44	7,44	< 0,001	***
residuály	96	9,84			

listy					
	df	suma čtverců	F-hodnota	p-hodnota	
půda	3	161,14	470,11	< 0,001	***
populace	5	3,58	6,27	< 0,001	***
půda:populace	15	7,94	4,63	< 0,001	***
residuály	96	10,97			

4.3.3 Olovo

Olovo je toxický prvek vyskytující se ve zvýšeném množství pouze v metaliferních půdách **M1**, **M2** a **M3**. U všech populací v metaliferních půdách byl prokázán signifikantně vyšší obsah Pb v kořenech nežli v listech (párový t-test, příloha 2, Tabulka 21). V hadcové půdě **S** byl obsah Pb v rostlinných pletivech podobný jako obsah kovu v půdě. Rostliny v metaliferních půdách měly obsah Pb nižší ve svých pletivech, než jaký byl obsah Pb v půdě, přičemž čím větší množství Pb bylo v půdě, tím víc jej rostlina přijala do svých pletiv (Obrázek 31).

Tabulka 21: Odlišnosti obsahu Pb v kořenech a listech na základě t-testu. Hvězdičky udávají prokazatelně vyšší obsah Pb v kořenech nežli v listech, počet hvězdiček udává signifikanci. V případě, že se obsahy průkazně neliší, je uvedeno “neliší se”.

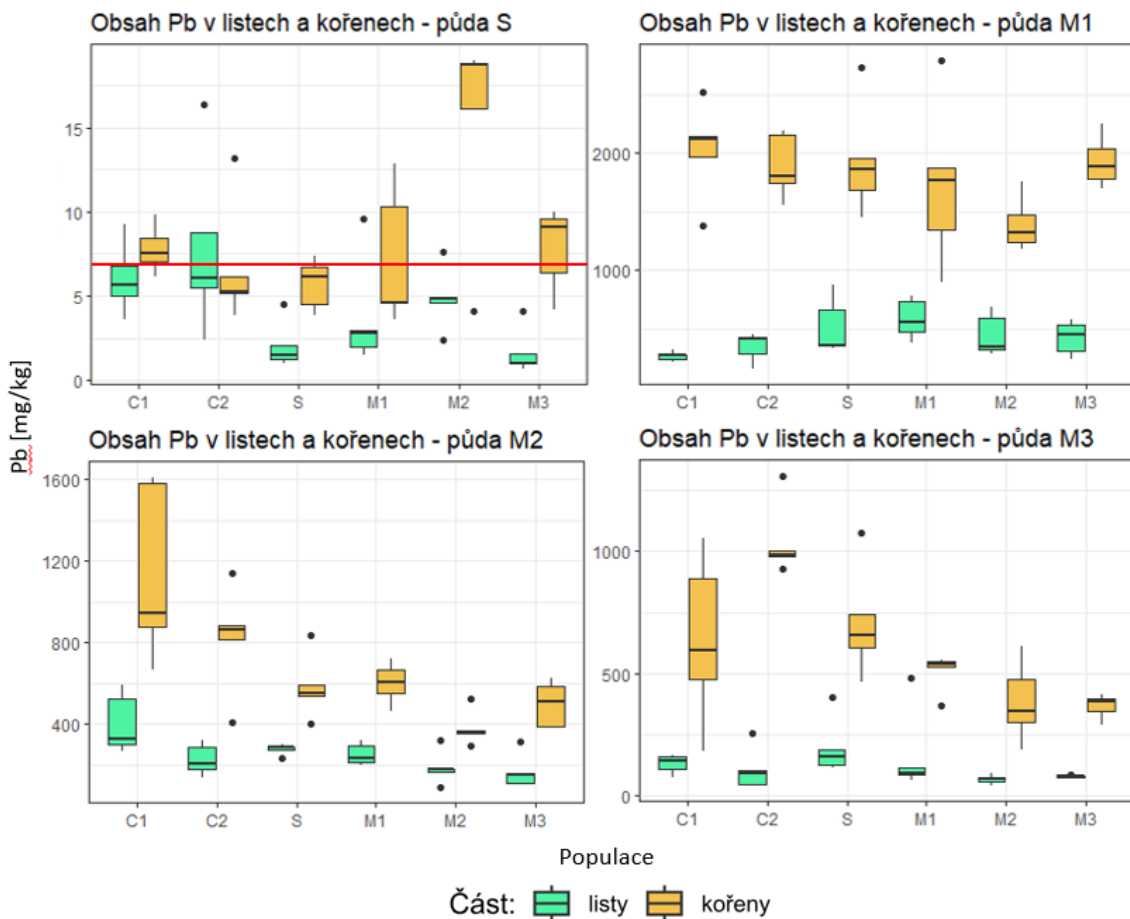
	Půda S	Půda M1	Půda M2	Půda M3
Populace C1	neliší se	***	**	**
Populace C2	neliší se	***	***	**
Populace S	**	***	**	**
Populace M1	neliší se	**	***	*
Populace M2	*	**	*	***
Populace M3	**	***	**	***

Analýza variance prokázala, že také obsah Pb v listech i v kořenech je závislý jak na typu půdy, původu populace, tak na interakci mezi populací a půdou (Tabulka 22).

Tabulka 22: Výsledky anovy vlivu půdy, populace a jejich interakce na obsah Zn v listech a v kořenech.

kořeny					
	df	suma čtverců	F-hodnota	p-hodnota	
půda	3	527,6	1456,64	< 0,001	***
populace	5	2,3	3,77	0,004	**
půda:populace	15	8,2	4,53	< 0,001	***
residuály	96	11,6			

listy					
	df	suma čtverců	F-hodnota	p-hodnota	
půda	3	418,3	633,25	< 0,001	***
populace	5	4,5	4,07	0,002	**
půda:populace	15	13,9	4,21	< 0,001	***
residuály	96	21,1			



Obrázek 31: Obsah Pb v různých částech rostliny (listy a kořeny, odlišeno pomocí barev) u populací pěstovaných ve stejném typu půdy A) hadcová S, B) metaliferní M1, C) metaliferní M2, D) metaliferní M3. Obsah kovu je znázorněn pomocí boxplotů. Obsah Pb v hadcové půdě je znázorněn červenou linkou, v ostatních případech je v půdě vyšší obsah Pb než v rostlinách.

5. Diskuze

5.1 Lokální adaptace okruhu *Minuartia verna*

Hlavním cílem recipročního experimentu bylo zjistit, zda jsou vybrané populace z okruhu *Minuartia verna* lokálně adaptované. Dále mě zajímalo, zda mají nemetaliferní populace predispozici růst také na metaliferní půdě, a jestli metaliferní populace dokážou růst v jiných nežli vlastních půdách.

Výsledky experimentu jasně ukazují, že nemetaliferní populace **C1**, **C2** a **S** nemají pre-adaptaci k vyrovnání se s ionty těžkých kovů jako je Zn, Pb a Cu v metaliferních půdách **M1**, **M2** a **M3**, všechny nemetaliferní rostliny v průběhu experimentu v metaliferních půdách zahynuly. Metaliferní populace dokážou růst ve všech typech metaliferních půd zahrnutých v experimentu. Nejzajímavějším zjištěním však je, že všechny populace prosperují v hadcové půdě **S**.

5.1.1 Vliv půdy na klíčení semen a přežívání semenáčků

Už během pozorování klíčení byl zaznamenán vliv specifického typu půdy na klíčení a vitalitu rostlin z různých populací. Samotná klíčivost semen nebyla výrazně ovlivněna typem půdy, jen u nemetaliferních populací byla mírně snížená klíčivost v půdě **M3**. Snížená klíčivost semen v přítomnosti Cu, Zn a Pb byla pozorována také u kukuřice a ječmene (Tomulescu et al., 2004) nebo u *Arabidopsis thaliana* (Li et al., 2005). Naopak vyšší klíčivost semen druhu *Elsholtzia argyi* byla zaznamenána s vyšší koncentrací Pb v hydroponickém roztoku (Islam et al., 2007). Zajímavá je také studie vlivu různých koncentrací Cu na klíčivost rostlin *Minuartia hirsuta*, *Silene compacta*, *Alyssum montanum* a *Thlaspi ochroleucum*. Zatímco u *T. ochroleucum* klíčivost klesá s rostoucí koncentrací Cu, u ostatních rostlin je nejvyšší klíčivost zaznamenána až při určitém obsahu Cu v roztoku, přičemž pouze *M. hirsuta* a *S. compacta* byly původně z lokalit obsahujících Cu v půdě (Ouzounidou, 1995).

Nemetaliferní půdy **C1**, **C2** a **S** a metaliferní půdy **M1** a **M2** neměly v průběhu klíčení vliv na přežívání semenáčků, pouze v půdě **M3** přežilo výrazně méně semenáčků. U populace **C1** nepřežila v **M3** půdě ani jedna rostlina, většina vyklíčených semen totiž po vyklíčení nedokázala zakořenit. Zajímavou studií je vliv (ne)přítomnosti Ca^{2+} společně s těžkými kovy (Pb, Zn, Hg) na růst embrya, kdy v přítomnosti Zn a Pb bez Ca^{2+} je pozorován horší růst než v přítomnosti Ca^{2+} , u Hg je lepší růst bez přítomnosti Ca^{2+} (Li

et al., 2005). V používaných metaliferních půdách je však obsah Ca podobný. Neschopnost zakořenění populace **C1** může být zaviněna tím, že půda **M3** byla jílovitého charakteru, špatně propustná pro vodu (Idu et al., 2003). Obsah ani jednoho z měřených těžkých kovů není nejvyšší a ani v jiných měřených parametrech půda zvlášť nevybočuje (Příloha 1). Semena z ostatních populací už dokázala v této půdě zakořenit, ale v průběhu klíčení nepřežilo průměrně také víc jak 80 % semenáčků z populace **C2** a z hadcové populace nepřežilo průměrně 20 % semenáčků. Metaliferní populace v půdě **M3** klíčily a přeživaly dobře, je tedy možné, že půda **M3** obsahuje ještě jiný neměřený těžký kov, na který jsou metaliferní populace pre-adaptované, ale nemetaliferní populace si s tímto kovem neumí poradit.

5.1.2 Vliv půdy na růst rostlin

Během kultivace byly skórovány další znaky rostlin, u kterých se projeví rozdíly způsobené typem půdy, ve kterých byly rostliny pěstovány. Už při porovnání biomasy rostlin bylo zřejmé, že nemetaliferní populace **C1**, **C2** a **S** špatně snáší metaliferní půdy. V půdě **M3** nepřežila žádná rostlina a v ostatních metaliferních půdách **M1** a **M2** byla váha biomasy oproti ostatním rostlinám téměř zanedbatelná. Nemetaliferní populace totiž v metaliferních půdách vyrostly pouze do stádia prvních pravých listů, které však často nebyly větší než děložní lístky. Tyto rostliny v průběhu kultivace zahynuly a nebyly na nich měřeny další znaky. Signifikantně nižší biomasa byla dále pozorovaná u populací **S**, **M2** a **M3** v půdě **C2**, což je zajímavé, protože se jedná o nemetaliferní půdu, u které se předpokládalo, že rostlinám bude všeobecně vyhovovat. Podobný trend byl pozorován také u procenta kvetoucích rostlin, kdy signifikantně menší množství rostlin kvetlo v půdě **C2** u populací **S**, **M2** a **M3**, pro tento měřený znak se ještě přidala populace **C1**.

Z porovnávaných znaků i z výsledných *fitness* hodnot rostlin je patrné, že nemetaliferní populace **C1**, **C2** a **S** nejsou pre-adaptované na půdy metaliferních populací rostoucích na výsypkách obsahujících těžké kovy jako je Zn, Pb a Cu. Je hned několik studií, které potvrzují negativní vliv těžkých kovů na rostliny, které k nim nejsou adaptované. Negativní vliv Zn na růst semenáčků byl zaznamenán u druhu *Cajanus cajan* (Sresty & Rao, 2000), přítomnost Cu měla efekt na snížení růstu kořene u rostlin *Alyssum montanum* a *Noccaea ochroleuca*, které nebyly adaptované na půdu obsahující Cu (Ouzounidou, 1995). Rostoucí koncentrace Pb měla negativní vliv na biomasu rostlin běžně pěstovaných jako zelenina (Barker, 1972).

Naopak metaliferní populace **M1**, **M2** a **M3** neměly problém s žádnou z použitých metaliferních půd. Metaliferní populace mohou pocházet z jedné populace, která byla adaptovaná na více těžkých kovů zároveň, a tato populace později kolonizovala nově vznikající stanoviště s těžkými kovy v důsledku těžby. Náhlé rozšíření areálu v důsledku těžby bylo zaznamenáno také například u druhu *Crepidiorhopalon tenuis*, který je odolný vůči Cu (Faucon et al. 2011). Stejně jako obsahy kovů na výsypkách, se mohou měnit typy hadců, rod *Streptanthus* postupně kolonizoval hadcové lokality o různém složení půdy a následně se na příslušné typy hadců adaptoval. Následná diferenciacce a izolace od rodičovských genotypů dala vzniknout několika hadcovým endemitům (Kruckeberg, 1954).

Populace **C1**, **S** a **M3** měly nejvyšší *fitness* právě ve svých vlastních půdách, v ostatních se jim dařilo méně. U těchto populací můžeme předpokládat, že jsou lokálně adaptované a na své prostředí si zvykly natolik, že jiné prostředí už pro ně není tolik výhodné (Kawecki & Ebert, 2004). Nejzajímavější je tato skutečnost u metaliferní populace **M3**. Hodnota *fitness* byla ve vlastní půdě jen o trochu větší jak v půdě **C1** (tato skutečnost se ovšem může lišit podle zvoleného postupu hodnocení *fitness* rostlin). Vysokou hodnotu *fitness* lze interpretovat několika způsoby, populace **M3** by mohla být na své lokalitě tak dlouho, že se k ní dokázala dokonale adaptovat. Těžba rud zde probíhala již ve středověku (Verkleij, Lugtenborg & Ernst, 1988). Tato domněnka ale odporuje pozorovaným hodnotám *Fst* s ostatními metaliferními populacemi, které jsou pro tento scénář nízké (Obrázek 9). Další možností je, že půda z této lokality není tak toxická jako ostatní metaliferní půdy **M1** a **M2**, to by potvrzovaly půdní analýzy, kde půda **M3** nemá nejvyšší obsah žádného měřeného kovu, to je však v rozporu se skutečností, že v této půdě nemetaliferní populace uhynuly jako nejdříve.

Nejvíce překvapivé zjištění je, že všechny populace dobře rostou v hadcové půdě **S**. Vypadá to tedy, že všechny populace jsou pre-adaptované na hadcovou půdu, což není běžná situace. Často populace z nehadcových lokalit neprospívají, když se pěstují v hadcové půdě, příkladem může být *Arabidopsis arenosa* (Konečná et al., 2022) nebo *Mimulus guttatus* (Selby & Willis, 2018). Jsou však známy i případy, kdy jsou nemetaliferní populace preadaptovány pro růst na hadcové půdě, mezi tyto rostliny patří například *Thlaspi montanum* var. *montanum* (Boyd & Martens, 1998). U druhu *Holcus lanatus* je známá dokonce i preadaptace nemetaliferních populací na přítomnost arsenu v půdě (Meharg & Cumbes, 1993). Jednou z možností, jak si v nehadcových populacích

zachovat hadcovou adaptaci, je genový tok mezi nehadcovými a hadcovými populacemi. Tento způsob byl prokázán využitím izozymů u druhu *Silene dioica* mezi blízkými hadcovými a nehadcovými populacemi (Westerbergh & Saura, 1992). V případě *M. verna* je však tok genů z hadcových populací nepravděpodobný, jelikož hadcové populace jsou ve střední Evropě velmi izolované, vzdálené od ostatních populací (Lipánová et al. 2023). Další možností je, že předek všech vybraných populací byl adaptovaný na hadcovou půdu a nehadcové populace si tuto adaptaci zachovávaly, jelikož jim přináší ještě další výhody než jen odolnost vůči vyššímu obsahu Ni a Mg v půdě, kterou oni sami na svých stanovištích nevyužijí. Rostliny akumulující Ni do svých pletiv i na nehadcových stanovištích pak mohou akumulovaný Ni využít v boji proti patogenům a herbivorům nebo proti ostatním rostlinám pomocí alelopatie (Boyd & Martens 1998).

5.2 Jak rostliny řeší přítomnost těžkých kovů

Analýza obsahu kovů v rostlinných pletivech byla provedena u rostlin pěstovaných v hadcové půdě **S** obsahující zvýšený obsah Ni, Cr a Co a v metaliferních půdách **M1**, **M2** a **M3**, které obsahovaly různé množství Zn, Pb a Cu. Byly provedeny separátní analýzy listů a kořenů. Specificky byly analyzovány obsahy Ni, Zn a Pb ve vzorcích rostlinných pletiv.

Rostliny pěstované v metaliferních půdách **M1**, **M2** a **M3** chudých na Zn absorbovaly pouze malé množství Zn, koncentrace v sušené biomase nebyla větší než $18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Rostliny nejspíše akumulovaly takový obsah Zn, který pro ně byl nezbytný. Zn se totiž řadí mezi esenciální prvky, které jsou nutné pro správné fungování rostlin. Hraje důležitou roli jako součást enzymů (Ermler et al., 1998). Příkladem může být ureáza, která se podílí na metabolismu dusíku (Dixon et al., 1975).

Naopak populace, které byly pěstované v hadcové půdě **S** měly zvýšený obsah Ni jak v kořenech (průměrné hodnoty se u populací pohybovaly mezi $100\text{--}200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), tak v listech (průměrné hodnoty se u populací pohybovaly mezi $15\text{--}30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Vybočovala pouze populace **C1**, která v listech měla obsah Ni pouze $2,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Z výsledků plyne, že se *M. verna* neřadí mezi hyperakumulátory Ni, protože hranice pro hyperakumulaci Ni je $1\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v biomase rostliny (Reeves et al., 2018), naopak se jedná o vylučovače (*excluder*), jelikož obsah kovu v kořenech je větší jak v nadzemní části (Baker, 1981), do které je přísun většího množství Ni omezen. Mezi Ni vylučovače se dále řadí například *Silene vulgaris* (Wenzel et al., 2003), *Triticum aestivum* (Massoura et al., 2004) nebo

Thlaspi perfoliatum (Seregin et al., 2007). Obsah kovu v kořenech je mezi všemi populacemi srovnatelný, stejně tak jako v listech (až na populaci **C1**), to by mohlo poukazovat na stejný mechanismus nakládání s ionty Ni v rostlině a podporuje to teorii o stejném genetickém základu adaptace na hadec, který by mohla sdílet celá genetická linie středoevropských nížinných populací.

Podobně jako Ni, tak i Zn se řadí mezi esenciální prvky nezbytné pro život rostlin. Zinek slouží jako kofaktor pro širokou škálu enzymů zapojených do různých metabolických procesů. Tyto enzymy jsou nezbytné pro růst rostlin, včetně procesů jako je syntéza DNA, syntéza proteinů, fotosyntéza a hormonální regulace (Brown, Cakmak & Zhang, 1993).

Pouze v hadcové půdě **S** byl obsah Zn v rostlinách vyšší než obsah Zn v půdě, což bude způsobeno právě tím, že rostlina pro své správné fungování Zn potřebuje a z půdy chudé na Zn si tento kov vychytává. V metaliferních půdách **M1**, **M2** a **M3** byla koncentrace zinku vyšší než v rostlinách, které na nich byly pěstovány, obsah Zn v rostlinách však byl několikanásobně vyšší než u rostlin pěstovaných v hadcové půdě **S**. Obsah Zn v kořenech a listech se často nelišil, v opačném případě byl větší obsah Zn v kořenech nežli v listech. Tato skutečnost je v rozporu s dříve publikovanými články, které zmiňují, že více Zn bývá v listech nežli v kořenech (alpské populace – Sieghardt, 1990; anglické populace – Hajar, 1987). Nejpravděpodobnějším vysvětlením bude, že analyzované rostliny byly nejdříve předpěstovány v zahradním substrátu a poté až přesazeny do metaliferních půd. Dalším vysvětlením může být, že alpské populace si nezávisle od nížinných populací vyvinuly vlastní odlišnou adaptaci na přítomnost Zn. U anglických populací se předpokládá, že jsou s nížinnými populacemi blíže příbuzné.

V půdě **M1** měly populace podobný obsah Zn ve svých pletivech, což však nenaznačuje jejich adaptaci, jelikož nemetaliferní populace v experimentu I v metaliferních půdách nepřežily. Nemetaliferní populace v půdách **M2** a **M3**, které obsahovaly vysoké množství Zn měly vyšší obsah Zn v kořenech (až $6\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) než metaliferní populace (ty měly obsah Zn v kořenech u všech metaliferních půd podobný $250\text{--}1\,500\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). To naznačuje, že by metaliferní populace mohly mít mechanismy zabraňující vstupu nadměrného množství Zn do kořenů nebo mechanismy vylučující přebytečný Zn z kořenů zpět do půdy (Chaney, 1993). Žádná z metaliferních populací nedosáhla hranice pro hyperakumulaci, která u Zn je $> 3\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Reeves et al., 2018), hyperakumulaci však byla prokázána u některých rostlin *M. verna* sebraných přímo

z metaliferních lokalit (Johnston, 1977; Kelepertsis & Andrulakis, 1983; Wenzel & Jockwer, 1998).

Oproti dříve diskutovaným prvkům je olovo (Pb) pro rostlinu toxické už v malém množství, a proto se ho rostliny snaží spíše vyvarovat. Vypovídá o tom i velmi malý počet druhů, které Pb hyperakumulují (Reeves et al., 2018). V metaliferních půdách **M1**, **M2** a **M3**, které obsahují Pb, je signifikantně vyšší obsah tohoto kovu v kořenech nežli v listech, *M. verna* se tedy řadí mezi vylučovače Pb (Baker, 1981), podobně jako tomu bylo v případě Ni v hadcové půdě **S**. Podobné výsledky odlišnosti obsahu Pb v kořenech a listech byly pro tento druh pozorovány u anglických i alpských populací (Hajar, 1987, Sieghardt, 1990). Zajímavé je, že i nemetaliferní populace se v případě Pb chovaly dost podobně jako metaliferní populace. Možným vysvětlením může být, že tyto populace jsou adaptovány na přítomnost olova, to je ale nejspíš nepravděpodobné. Analýza obsahu prvků v rostlinné biomase udává pouze informaci o množství určitého prvku v určitém množství biomasy, nevypovídá o tom, v jaké formě se tento prvek v pletivech vyskytuje. U metaliferních populací může docházet k chelataci Pb, v chelatované formě už nemusí být pro rostlinu toxický a může být skladován ve vakuolách (Kumar, Narasimha & Prasad, 2018). Naproti tomu v nemetaliferních populacích nemusí být Pb v pletivech vychytáváno a inaktivováno, může se tedy vázat na enzymy a tím poškozovat metabolické dráhy.

6. Závěr

Tato práce přinesla nové poznatky ve studiu (pre-)adaptace populací *Minuartia verna*, jejichž přirozená stanoviště zahrnují netoxické substráty, hadcové lokality i důlní výsypky obsahující zvýšené množství těžkých kovů. Informace, které byly získány pomocí recipročního experimentu, nám umožní lépe porozumět ekologicko-evolučním procesům, které stojí za adaptací rostlin na extrémní prostředí, a poskytují nám cenné náhledy do funkčních strategií, které si rostliny vyvinuly pro přežití na toxických stanovištích.

Výsledky ukazují, že populace v okruhu *M. verna* vykazují různou míru adaptace na odlišné typy půd obsahujících těžké kovy. Nemetalierní populace nejsou (pre-)adaptovány na metaliferní půdy obsahující ve vyšší míře především zinek, olovo a měď. Na druhou stranu, metaliferní populace vykazovaly schopnost prosperovat na různých metaliferních půdách, což naznačuje jejich (pre-)adaptaci na široké spektrum důlních půd. Pozoruhodně úspěšný růst všech populací v hadcové půdě však ukázal genetickou predispozici pro růst v tomto substrátu. Tato adaptace ukazuje schopnost určitých rostlinných druhů prospívat na zdánlivě drsných stanovištích.

Analýza akumulace těžkých kovů v rostlinách poskytuje důležité informace o strategiích, které rostliny využívají k regulaci a eliminaci těchto toxických prvků. Některé populace mají schopnost selektivně akumulovat kovy jako nikl a olovo v kořenech, což může sloužit k minimalizaci jejich škodlivého účinku v nadzemních částech rostliny. Zkoumání příjmu zinku rostlinami poskytlo pohled do složité struktury adaptace. Rozdíl v příjmu Zn mezi nemetaliferními a metaliferními populacemi v půdách s vysokým obsahem Zn naznačuje nedostatečnou či žádnou adaptaci na přítomnost vysoké koncentrace tohoto kovu u nemetaliferních populací.

Ze získaných informací lze odhadovat historický kontext procesu adaptací v této skupině. Pre-adaptace nížinných střeoevropských populací *M. verna* na hadec mohou naznačovat starou linii adaptace. Následná kolonizace důlních půd metaliferními populacemi ukazuje na schopnost rostlin rychle se přizpůsobit novým podmínkám měnícího se prostředí v průběhu času.

Schopnost rostlin rychle se adaptovat na nové prostředí hraje důležitou roli ve stále rychleji se měnícím světě. Skupina *M. verna*, díky své schopnosti osídlit mnoho různých typů substrátů, je vhodným kandidátem pro podrobnější studium adaptací na

drsné podmínky prostředí. V budoucnu by další studie této skupiny mohly prozkoumat genetické a molekulární mechanismy, které stojí za adaptacemi na toxické prostředí, a rozšířit tak naše znalosti o evoluci rostlin přizpůsobených na život v náročných podmínkách.



7. Literatura

- Antonovics, J., Bradshaw, A.D., and Turner, R.G. 1971. Heavy Metal Tolerance in Plants. *In* Advances in Ecological Research. *Edited by* J.B. Cragg. Academic Press. pp. 1–85. doi:10.1016/S0065-2504(08)60202-0.
- Aravind, J., Vimala Devi, S., Radhamani, J., Jacob, S.R., and Srinivasan, K. 2022. The germinationmetrics Package: A Brief Introduction. ICAR-National Bureau of Plant Genetic Resources.
- Assunção, A.G.L., Schat, H., and Aarts, M.G.M. 2003. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **159**(2): 351–360. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00820.x.
- Babst-Kostecka, A., Waldmann, P., Frérot, H., and Vollenweider, P. 2016. Plant adaptation to metal polluted environments—Physiological, morphological, and evolutionary insights from *Biscutella laevigata*. *Environmental and Experimental Botany* **127**: 1–13. doi:10.1016/j.envexpbot.2016.03.001.
- Baker, A.J.M. 1981. Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* **3**(1–4): 643–654. Taylor & Francis. doi:10.1080/01904168109362867.
- Baker, A.J.M., and Brooks, R.R. 1989. Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements. A Review of Their Distribution, Ecology and Phytochemistry. *Biorecovery* (1): 81–126.
- Baker, A.J.M., and Proctor, J. 1990. The influence of cadmium, copper, lead, and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles. *Pl Syst Evol* **173**(1): 91–108. doi:10.1007/BF00937765.
- Barker, W.G. 1972. Toxicity levels of mercury, lead, copper, and zinc in tissue culture systems of cauliflower, lettuce, potato, and carrot. *Canadian Journal of Botany* **50**(5): 973–976. NRC Research Press Ottawa, Canada.
- Barry, S. a. S., and Clark, S.C. 1978. Problems of Interpreting the Relationship Between the Amounts of Lead and Zinc in Plants and Soil on Metalliferous Wastes. *New Phytologist* **81**(3): 773–783. doi:10.1111/j.1469-8137.1978.tb01652.x.
- Bates, D., Kliegl, R., Vasisht, S., and Baayen, H. 2015. Parsimonious mixed models. arXiv preprint arXiv:1506.04967.
- Becher, M., Talke, I.N., Krall, L., and Krämer, U. 2004. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J* **37**(2): 251–268. doi:10.1046/j.1365-313x.2003.01959.x.
- Becker, R.A., Chambers, J. M., and Wilks, A. R. 1988. *The New S. Language*.
- Bert, V., Bonnin, I., Saumitou-Laprade, P., De Laguérie, P., and Petit, D. 2002. Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist* **155**(1): 47–57. doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00432.x.
- Birks, H.J.B., and Willis, K.J. 2008. Alpines, trees, and refugia in Europe. *Plant Ecology & Diversity* **1**(2): 147–160. Taylor & Francis. doi:10.1080/17550870802349146.
- Bisschop, K., Mortier, F., Etienne, R.S., and Bonte, D. 2019. Transient local adaptation and source–sink dynamics in experimental populations experiencing spatially heterogeneous environments. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286**(1905): 20190738. Royal Society. doi:10.1098/rspb.2019.0738.
- Bothe, H. 2011. Plants in Heavy Metal Soils. *In* Detoxification of Heavy Metals. *Edited by* I. Sherameti and A. Varma. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 35–57. doi:10.1007/978-3-642-21408-0_2.

- Boyd, R.S., and Martens, S.N. 1998. Nickel hyperaccumulation by *Thlaspi montanum* var. *montanum* (Brassicaceae): a constitutive trait. *American journal of botany* **85**(2): 259–265. Wiley Online Library.
- Bradshaw, A.D. 1965. Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity in Plants. *In* *Advances in Genetics*. Edited by E.W. Caspari and J.M. Thoday. Academic Press. pp. 115–155. doi:10.1016/S0065-2660(08)60048-6.
- Brady, K.U., Kruckeberg, A.R., and Bradshaw Jr., H.D. 2005. Evolutionary Ecology of Plant Adaptation to Serpentine Soils. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**(1): 243–266. doi:10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105730.
- Bringezu, K., Lichtenberger, O., Leopold, I., and Neumann, D. 1999. Heavy Metal Tolerance of *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* **154**(4): 536–546. doi:10.1016/S0176-1617(99)80295-8.
- Brochmann, C., Bryusting, A.K., Alsos, I.G., Borgen, L., Grundt, H.H., Scheen, A.-C., and Elven, R. 2004. Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**(4): 521–536. doi:10.1111/j.1095-8312.2004.00337.x.
- Brooks, R.R., Chambers, M.F., Nicks, L.J., and Robinson, B.H. 1998. Phytomining. *Trends in Plant Science* **3**(9): 359–362. Elsevier. doi:10.1016/S1360-1385(98)01283-7.
- Brooks, R.R., Holzbecher, J., and Ryan, D.E. 1981. Horsetails (equisetum) as indirect indicators of gold mineralization. *Journal of Geochemical Exploration* **16**(1): 21–26. doi:10.1016/0375-6742(81)90122-9.
- Brown, P.H., Cakmak, I., and Zhang, Q. 1993. Form and function of zinc plants. *In* *Zinc in Soils and Plants: Proceedings of the International Symposium on ‘Zinc in Soils and Plants’ held at The University of Western Australia, 27–28 September, 1993*. Springer. pp. 93–106.
- Cabot, C., Martos, S., Llugany, M., Gallego, B., Tolrà, R., and Poschenrieder, C. 2019. A Role for Zinc in Plant Defense Against Pathogens and Herbivores. *Frontiers in Plant Science* **10**. Available from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01171> [accessed 19 July 2023].
- Chaney, R. 1993. Zinc phytotoxicity. *In* *Zinc in Soils and Plants: Proceedings of the International Symposium on ‘Zinc in Soils and Plants’ held at The University of Western Australia, 27–28 September, 1993*. Springer. pp. 135–150.
- Courbot, M., Willems, G., Motte, P., Arvidsson, S., Roosens, N., Saumitou-Laprade, P., and Verbruggen, N. 2007. A Major Quantitative Trait Locus for Cadmium Tolerance in *Arabidopsis halleri* Colocalizes with HMA4, a Gene Encoding a Heavy Metal ATPase. *Plant Physiology* **144**(2): 1052–1065. doi:10.1104/pp.106.095133.
- Dahmani-Muller, H., van Oort, F., Gélie, B., and Balabane, M. 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution* **109**(2): 231–238. doi:10.1016/S0269-7491(99)00262-6.
- D’Amico, M.E., Freppaz, M., Leonelli, G., Bonifacio, E., and Zanini, E. 2015. Early stages of soil development on serpentinite: the proglacial area of the Verra Grande Glacier, Western Italian Alps. *J Soils Sediments* **15**(6): 1292–1310. doi:10.1007/s11368-014-0893-5.
- Davis, M.B., Shaw, R.G., and Etterson, J.R. 2005. Evolutionary Responses to Changing Climate. *Ecology* **86**(7): 1704–1714. doi:10.1890/03-0788.
- Dillenberger, M.S., and Kadereit, J.W. 2014. Maximum polyphyly: Multiple origins and delimitation with plesiomorphic characters require a new circumscription of *Minuartia* (Caryophyllaceae). *TAXON* **63**(1): 64–88. doi:10.12705/631.5.
- Dixon, N.E., Gazzola, C., Blakeley, R.L., and Zerner, B. 1975. Jack bean urease (EC 3.5. 1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical Society* **97**(14): 4131–4133. ACS Publications.
- Dräger, D.B., Desbrosses-Fonrouge, A.-G., Krach, C., Chardonnens, A.N., Meyer, R.C., Saumitou-Laprade, P., and Krämer, U. 2004. Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport

- proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels. *The Plant Journal* **39**(3): 425–439. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02143.x.
- Duruibe, J., C. O., and Egwurugwu, J. 2007. Heavy Metal Pollution and Human Biotoxic Effects. *Int. J. Phys. Sci.* **2**: 112–118.
- Dvořáková, M. 2000. Taxonomický přehled evropských druhů rodu *Minuartia* ze sekce *Polymechana* Mattf. (Taxonomic treatment of *Minuartia* sect. *Polymechana* in Europe). PhD Thesis, Masaryk University, Brno.
- Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M., and Thauer, R.K. 1998. Active sites of transition-metal enzymes with a focus on nickel. *Current opinion in structural biology* **8**(6): 749–758. Elsevier.
- Ernst, W.H.O. 2006. Evolution of metal tolerance in higher plants. *Snow Landsc. Res.* **80**(3): 251–274.
- Eshel, G., Shaked, R., Kazachkova, Y., Khan, A., Eppel, A., Cisneros, A., Acuna, T., Gutterman, Y., Tel-Zur, N., Rachmilevitch, S., Fait, A., and Barak, S. 2017. *Anastatica hierochuntica*, an *Arabidopsis* Desert Relative, Is Tolerant to Multiple Abiotic Stresses and Exhibits Species-Specific and Common Stress Tolerance Strategies with Its Halophytic Relative, *Eutrema* (*Thellungiella*) *salsugineum*. *Frontiers in Plant Science* **7**. doi:10.3389/fpls.2016.01992.
- Evans, B.W., Hattori, K., and Baronnet, A. 2013. Serpentinite: What, Why, Where? *Elements* **9**(2): 99–106. doi:10.2113/gselements.9.2.99.
- Faucon, M.-P., Parmentier, I., Colinet, G., Mahy, G., Ngongo Luhembwe, M., and Meerts, P. 2011. May rare metallophytes benefit from disturbed soils following mining activity? The case of the *Crepidiorhopalon tenuis* in Katanga (DR Congo). *Restoration ecology* **19**(3): 333–343. Wiley Online Library.
- Fernandes, C. 2010, December. Characterization of NcHMA4 and NcZTP1 for Metal Tolerance and Accumulation in *Noccaea Caerulescens*. Wageningen University, The Netherlands.
- Flowers, T.J., and Colmer, T.D. 2015. Plant salt tolerance: adaptations in halophytes. *Annals of Botany* **115**(3): 327–331. doi:10.1093/aob/mcu267.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., and White, M.C. 1978. The Physiology of Metal Toxicity in Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **29**(1): 511–566. doi:10.1146/annurev.pp.29.060178.002455.
- Galli, U., Schüepp, H., and Brunold, C. 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* **92**(2): 364–368. doi:10.1111/j.1399-3054.1994.tb05349.x.
- Giménez-Benavides, L., Escudero, A., and Iriondo, J.M. 2007. Local Adaptation Enhances Seedling Recruitment Along an Altitudinal Gradient in a High Mountain Mediterranean Plant. *Annals of Botany* **99**(4): 723–734. doi:10.1093/aob/mcm007.
- Graves, S., Piepho, H.-P., and Selzer, M.L. 2015. Package ‘multcompView.’ Visualizations of paired comparisons.
- Griffith, M., Timonin, M., Wong, A.C.E., Gray, G.R., Akhter, S.R., Saldanha, M., Rogers, M.A., Weretilnyk, E.A., and Moffatt, B. 2007. *Thellungiella*: an *Arabidopsis*-related model plant adapted to cold temperatures. *Plant, Cell & Environment* **30**(5): 529–538. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01653.x.
- Guo, W.-J., Bundithya, W., and Goldsbrough, P.B. 2003. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol* **159**(2): 369–381. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00813.x.
- Hajar, A.S.M. 1987. The comparative ecology of *Minuartia verna* (L.) Hiern and *Thlaspi alpestre* L. in the southern pennines, with special reference to heavy metal tolerance. PhD Thesis, University of Sheffield, Sheffield. Available from <https://etheses.whiterose.ac.uk/1829/> [accessed 19 July 2023].
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**(366): 1–11. doi:10.1093/jexbot/53.366.1.

- Hanikenne, M., Talke, I.N., Haydon, M.J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D., and Krämer, U. 2008. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature* **453**(7193): 391–395. doi:10.1038/nature06877.
- Harflett, C. 2012. Zinc accumulation and its effects on herbivory and competitive ability, in metallicolous populations of *Rumex acetosa* L. Ph.D., University of Sussex. Available from <http://sro.sussex.ac.uk/id/eprint/39635/> [accessed 27 October 2021].
- Harrison, S., and Rajakaruna, N. 2011. *Serpentine: The Evolution and Ecology of a Model System*. University of California Press.
- Hayek, A. 1922. Versuch einer natürlichen Gliederung des Formenkreises der *Minuartia verna* (L.) Hiern. *Österreichische Botanische Zeitschrift* **71**: 89–116.
- Hereford, J. 2009. A Quantitative Survey of Local Adaptation and Fitness Trade-Offs. *The American Naturalist* **173**(5): 579–588. The University of Chicago Press. doi:10.1086/597611.
- Hildebrandt, U., Kaldorf, M., and Bothe, H. 1999. The Zinc Violet and its Colonization by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Journal of Plant Physiology* **154**(5): 709–717. doi:10.1016/S0176-1617(99)80249-1.
- van Hoof, N.A.L.M., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W.J., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O., Karenlampi, S.O., and Tervahauta, A.I. 2001. Enhanced Copper Tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke Populations from Copper Mines Is Associated with Increased Transcript Levels of a 2b-Type Metallothionein Gene. *Plant Physiology* **126**(4): 1519–1526. doi:10.1104/pp.126.4.1519.
- Hossain, M.A., Piyatida, P., Teixeira da Silva, J., and Fujita, M. 2012. Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *Journal of Botany* **2012**: 1–37. doi:10.1155/2012/872875.
- Huang, S.S., Liao, Q.L., Hua, M., Wu, X.M., Bi, K.S., Yan, C.Y., Chen, B., and Zhang, X.Y. 2007. Survey of heavy metal pollution and assessment of agricultural soil in Yangzhong district, Jiangsu Province, China. *Chemosphere* **67**(11): 2148–2155. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.043.
- Huaranca Reyes, T., Esparza, E., Crestani, G., Limonchi, F., Cruz, R., Salinas, N., Scartazza, A., Guglielminetti, L., and Cosio, E. 2020. Physiological responses of maca (*Lepidium meyenii* Walp.) plants to UV radiation in its high-altitude mountain ecosystem. *Sci Rep* **10**(1): 2654. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41598-020-59638-4.
- Idu, M., Ogboghodo, A.I., and Omonhinmin, C. 2003. Effect of soil types on the seed germination of *Helianthus annuus* L. *Agricultural Science Digest* **23**(2): 101–103.
- Islam, E., Yang, X., Li, T., Liu, D., Jin, X., and Meng, F. 2007. Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials* **147**(3): 806–816. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.01.117.
- Islam, M.S., Kormoker, T., Idris, A.M., Proshad, R., Kabir, M.H., Ustaoglu, F., Islam, M.S., Kormoker, T., Idris, A.M., Proshad, R., Kabir, M.H., and Ustaoglu, F. 2021. Plant–microbe–metal interactions for heavy metal bioremediation: a review. *Crop Pasture Sci.* CSIRO PUBLISHING. doi:10.1071/CP21322.
- Jaffe, B.D., Ketterer, M.E., and Shuster, S.M. 2018. Elemental allelopathy by an arsenic hyperaccumulating fern, *Pteris vittata* L. *Journal of Plant Ecology* **11**(4): 553–559. doi:10.1093/jpe/rtx020.
- Jenny, H. 1980. *The Soil Resource: Origin and Behavior*. Springer-Verlag.
- Johnston, W.R., and Proctor, J. 1977a. Metal concentrations in plants and soils from two British serpentine sites. *Plant Soil* **46**(1): 275–278. doi:10.1007/BF00693136.
- Johnston, W.R., and Proctor, J. 1977b. A comparative study of metal levels in plants from two contrasting lead-mine sites. *Plant Soil* **46**(1): 251–257. doi:10.1007/BF00693131.

- Kawecki, T.J., and Ebert, D. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* **7**(12): 1225–1241. doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x.
- Kelepertsis, A.E., and Andrulakis, I. 1983. Geobotany-biogeochemistry for mineral exploration of sulphide deposits in northern Greece — Heavy metal accumulation by *Rumex acetosella* L. and *Minuartia verna* (L.) Hiern. *Journal of Geochemical Exploration* **18**(3): 267–274. doi:10.1016/0375-6742(83)90072-9.
- Kidd, P.S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunsé, B., and Barceló, J. 2001. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* **52**(359): 1339–1352. doi:10.1093/jexbot/52.359.1339.
- Knight, C.A., Vogel, H., Kroymann, J., Shumate, A., Witsenboer, H., and Mitchell-Olds, T. 2006. Expression profiling and local adaptation of *Boechera holboellii* populations for water use efficiency across a naturally occurring water stress gradient. *Molecular Ecology* **15**(5): 1229–1237. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02818.x.
- Konečná, V., Bray, S., Vlček, J., Bohutínská, M., Požárová, D., Choudhury, R.R., Bollmann-Giolai, A., Flis, P., Salt, D.E., Parisod, C., Yant, L., and Kolář, F. 2021. Parallel adaptation in autopolyploid *Arabidopsis arenosa* is dominated by repeated recruitment of shared alleles. *Nat Commun* **12**(1): 4979. doi:10.1038/s41467-021-25256-5.
- Konečná, V., Šustr, M., Požárová, D., Čertner, M., Krejčová, A., Tylová, E., and Kolář, F. 2022. Genomic basis and phenotypic manifestation of (non-) parallel serpentine adaptation in *Arabidopsis arenosa*. *Evolution* **76**(10): 2315–2331. Blackwell Publishing Ltd.
- Krämer, U. 2010. Metal hyperaccumulation in plants. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 517–534. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112156.
- Kruckeberg, A.R. 1954. The ecology of serpentine soils. III. Plant species in relation to serpentine soils. *Ecology* (35): 267–274.
- Kumar, A., and Prasad, M.N.V. 2018. Plant-lead interactions: transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. *Ecotoxicology and environmental safety* **166**: 401–418. Elsevier.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.-J., and McGrath, S.P. 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* **212**(1): 75–84. doi:10.1007/s004250000366.
- Leblanc, M., Petit, D., Deram, A., Robinson, B.H., and Brooks, R.R. 1999. The phytomining and environmental significance of hyperaccumulation of thallium by *Iberis intermedia* from southern France. *Economic Geology* **94**(1): 109–113. doi:10.2113/gsecongeo.94.1.109.
- Li, W., Khan, M.A., Yamaguchi, S., and Kamiya, Y. 2005. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant growth regulation* **46**: 45–50. Springer.
- Li, Y., Iqbal, M., Zhang, Q., Spelt, C., Bliet, M., Hakvoort, H.W.J., Quattrocchio, F.M., Koes, R., and Schat, H. 2017. Two *Silene vulgaris* copper transporters residing in different cellular compartments confer copper hypertolerance by distinct mechanisms when expressed in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **215**(3): 1102–1114. doi:10.1111/nph.14647.
- Lipánová, V., Nunvářová-Kabátová, K., Zeisek, V., Kolář, F., and Chrtěk J. 2023. major revisions in *Molecular Phylogenetics and Evolution*
- Lochlainn, S.Ó., Bowen, H.C., Fray, R.G., Hammond, J.P., King, G.J., White, P.J., Graham, N.S., and Broadley, M.R. 2011. Tandem Quadruplication of HMA4 in the Zinc (Zn) and Cadmium (Cd) Hyperaccumulator *Noccaea caerulea*. *PLOS ONE* **6**(3): e17814. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.pone.0017814.
- MacNair, M.R. 1983. The genetic control of copper tolerance in the yellow monkey flower, *Mimulus guttatus*. *Heredity* **50**(3): 283–293. Nature Publishing Group. doi:10.1038/hdy.1983.30.
- Mangiafico, S., and Mangiafico, M.S. 2017. Package ‘rcompanion.’ *Cran Repos* **20**: 1–71.

- Massoura, S.T., Echevarria, G., Leclerc-Cessac, E., and Morel, J.L. 2004. Response of excluder, indicator, and hyperaccumulator plants to nickel availability in soils. *Soil Research* **42**(8): 933–938. CSIRO Publishing.
- Meharg, A.A., Cumbes, Q.J., and Macnair, M.R. 1993. Pre-adaptation of Yorkshire fog, *Holcus lanatus* L.(Poaceae) to arsenate tolerance. *Evolution*: 313–316. JSTOR.
- Mengoni, A., Gonnelli, C., Hakvoort, H.W.J., Galardi, F., Bazzicalupo, M., Gabbrielli, R., and Schat, H. 2003. Evolution of copper-tolerance and increased expression of a 2b-type metallothionein gene in *Silene paradoxa* L. populations. *Plant and Soil* **257**(2): 451–457. doi:10.1023/A:1027325907996.
- Millard, S.P. 2013. *EnvStats: an R package for environmental statistics*. Springer, New York.
- Monterroso, C., Rodríguez, F., Chaves, R., Diez, J., Becerra-Castro, C., Kidd, P., and Macias-Vázquez, I.F. 2014. Heavy metal distribution in mine-soils and plants growing in a Pb/Zn-mining area in NW Spain. *Applied Geochemistry* **44**: 3–11. doi:10.1016/j.apgeochem.2013.09.001.
- Moody, J.B. 1976. Serpentinization: a review. *Lithos* **9**(2): 125–138. doi:10.1016/0024-4937(76)90030-X.
- Mosyakin, S., and Fedoronchuk, M. 2015. New combinations for East European species of *Sabulina* (Caryophyllaceae). *Phytotaxa* **231**: 95–98. doi:10.11646/phytotaxa.231.1.10.
- Muszyńska, E., Labudda, M., Róžańska, E., Hanus-Fajerska, E., and Koszelnik-Leszek, A. 2019. Structural, physiological and genetic diversification of *Silene vulgaris* ecotypes from heavy metal-contaminated areas and their synchronous in vitro cultivation. *Planta* **249**(6): 1761–1778. doi:10.1007/s00425-019-03123-4.
- Neumann, D., zur Nieden, U., Schwieger, W., Leopold, I., and Lichtenberger, O. 1997. Heavy metal tolerance of *Minuartia verna*. *Journal of Plant Physiology* **151**(1): 101–108. doi:10.1016/S0176-1617(97)80044-2.
- Nunvářová Kabátová, K., Kolář, F., Jarolímová, V., Krak, K., and Chrtek, J. 2019. Does geography, evolutionary history or ecology drive ploidy and genome size variation in the *Minuartia verna* group (Caryophyllaceae) across Europe? *Plant Syst Evol* **305**(10): 1019–1040. doi:10.1007/s00606-019-01621-2.
- Ouzounidou, G. 1995. Effect of copper on germination and seedling growth of *Minuartia*, *Silene*, *Alyssum* and *Thlaspi*. *Biologia plantarum* **37**: 411–416. Springer.
- Oze, C., Fendorf, S., Bird, D.K., and Coleman, R.G. 2004. Chromium Geochemistry of Serpentine Soils. *International Geology Review* **46**(2): 97–126. Taylor & Francis. doi:10.2747/0020-6814.46.2.97.
- Papadopulos, A.S.T., Helmstetter, A.J., Osborne, O.G., Comeault, A.A., Wood, D.P., Straw, E.A., Mason, L., Fay, M.F., Parker, J., Dunning, L.T., Foote, A.D., Smith, R.J., and Lighten, J. 2021. Rapid Parallel Adaptation to Anthropogenic Heavy Metal Pollution. *Molecular Biology and Evolution* **38**(9): 3724–3736. doi:10.1093/molbev/msab141.
- Peer, W.A., Mahmoudian, M., Freeman, J.L., Lahner, B., Richards, E.L., Reeves, R.D., Murphy, A.S., and Salt, D.E. 2006. Assessment of plants from the Brassicaceae family as genetic models for the study of nickel and zinc hyperaccumulation. *New Phytologist* **172**(2): 248–260. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01820.x.
- Peng, B., Song, Z., Tu, X., Xiao, M., Wu, F., and Lv, H. 2004. Release of heavy metals during weathering of the Lower Cambrian Black Shales in western Hunan, China. *Env Geol* **45**(8): 1137–1147. doi:10.1007/s00254-004-0974-7.
- Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., and Gardea-Torresdey, J. 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**(8): 1665–1677. doi:10.1016/j.biocel.2009.03.005.
- Proctor, J., and Woodell, S.R.J. 1975. The Ecology of Serpentine Soils. *In Advances in Ecological Research*. Edited by A. MacFadyen. Academic Press. pp. 255–366. doi:10.1016/S0065-2504(08)60291-3.

- Rajakaruna, N. 2018. Lessons on Evolution from the Study of Edaphic Specialization. *Bot. Rev.* **84**(1): 39–78. doi:10.1007/s12229-017-9193-2.
- Rascio, N., and Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* **180**(2): 169–181. doi:10.1016/j.plantsci.2010.08.016.
- Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Jaffré, T., Erskine, P.D., Echevarria, G., and Ent, A. van der. 2018. A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloids trace elements. *The New Phytologist* **218**(2): 407–411. [Wiley, New Phytologist Trust].
- Roberts, B.A., and Proctor, J. (*Editors*). 1992. *The Ecology of Areas with Serpentinized Rocks: A World View*. Springer Dordrecht. Available from <https://doi.org/10.1007/978-94-011-3722-5>.
- Robinson, B.H., Chiarucci, A., Brooks, R.R., Petit, D., Kirkman, J.H., Gregg, P.E.H., and De Dominicis, V. 1997. The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *Journal of Geochemical Exploration* **59**(2): 75–86. doi:10.1016/S0375-6742(97)00010-1.
- Rune, O. 1953. *Plant Life on Serpentes and Related Rocks in the North of Sweden*. Almqvist & Wiksells boktryckeri, Uppsala.
- Rüther, F. 1967. Vergleichende physiologische Untersuchungen über die Resistenz von Schwermetallpflanzen. *Protoplasma* **64**(4): 400–425. doi:10.1007/BF01666540.
- Schlichting, C.D., and Levin, D.A. 1986. Phenotypic plasticity: an evolving plant character. *Biological Journal of the Linnean Society* **29**(1): 37–47. doi:10.1111/j.1095-8312.1986.tb01769.x.
- Schubert, R. 1954. Die Pflanzengesellschaften der Bottendorfer Höhe. *Math.-Naturwiss.* (4): 99–120.
- Selby, J.P., and Willis, J.H. 2018. Major QTL controls adaptation to serpentine soils in *Mimulus guttatus*. *Molecular Ecology* **27**(24): 5073–5087. Wiley Online Library.
- Shimizu-Inatsugi, R., Milosavljevic, S., Shimizu, K.K., Schaepman-Strub, G., Tanoi, K., and Sato, Y. 2021. Metal accumulation and its effect on leaf herbivory in an allopolyploid species *Arabidopsis kamchatica* inherited from a diploid hyperaccumulator *A. halleri*. *Plant Species Biology* **36**(2): 208–217. doi:10.1111/1442-1984.12304.
- Sieghardt, H. 1990. Heavy-metal uptake and distribution in *Silene vulgaris* and *Minuartia verna* growing on mining-dump material containing lead and zinc. *Plant and Soil* **123**(1): 107–111. Springer.
- Singh, A., Kumar, C.S., and Agarwal, A. 2013. Effect of lead and cadmium on aquatic plant *Hydrilla verticillata*. *J Environ Biol* **34**(6): 1027–1031.
- Sresty, T.V.S., and Rao, K.M. 2000. Organ compartmentation of zinc and nickel in pigeonpea seedlings in relation to cultivar tolerance. *Journal of plant nutrition* **23**(10): 1421–1434. Taylor & Francis.
- Stewart, J.R., Lister, A.M., Barnes, I., and Dalén, L. 2010. Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proc Biol Sci* **277**(1682): 661–671. doi:10.1098/rspb.2009.1272.
- Stojanova, B., Šurinová, M., Zeisek, V., Münzbergová, Z., and Pánková, H. 2020. Low genetic differentiation despite high fragmentation in the endemic serpentinophyte *Minuartia smejkalii* (*M. verna* agg., Caryophyllaceae) revealed by RADSeq SNP markers. *Conserv Genet* **21**(2): 187–198. doi:10.1007/s10592-019-01239-4.
- Talke, I.N., Hanikenne, M., and Krämer, U. 2006. Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol* **142**(1): 148–167. doi:10.1104/pp.105.076232.
- Teptina, A., Paukov, A., and Rajakaruna, N. 2018. Ultramafic vegetation and soils in the circumboreal region of the Northern Hemisphere. *Ecol Res* **33**(3): 609–628. doi:10.1007/s11284-018-1577-1.
- Therneau, T.M., and Lumley, T. 2015. Package ‘survival.’ *R Top Doc* **128**(10): 28–33.

- Tomulescu, I.M., Radovicu, E.M., Merca, V.V., and Tuduce, A.D. 2004. Effect of Copper, Zinc and Lead and Their Combinations on the Germination Capacity of Two Cereals. *Acta Agraria Debreceniensis* (15): 39–42. doi:10.34101/actaagrar/15/3355.
- Verkleij, J.A.C., Lugtenborg, T.F., and Ernst, W.H.O. 1988. The effect of geographical isolation on enzyme polymorphism of heavy-metal tolerant populations of *Minuartia verna* (L) Hiern. *Genetica* **78**(2): 133–143. doi:10.1007/BF00058845.
- Walker, R.B., Walker, H.M., and Ashworth, P.R. 1955. Calcium-Magnesium Nutrition with Special Reference to Serpentine Soils 1. *Plant Physiol* **30**(3): 214–221.
- Wang, J., Jiang, Y., Sun, J., She, J., Yin, M., Fang, F., Xiao, T., Song, G., and Liu, J. 2020. Geochemical transfer of cadmium in river sediments near a lead-zinc smelter. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **196**: 110529. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110529.
- Wang, T., Wang, Z., Xia, F., and Su, Y. 2016. Local adaptation to temperature and precipitation in naturally fragmented populations of *Cephalotaxus oliveri*, an endangered conifer endemic to China. *Sci Rep* **6**(1): 25031. Nature Publishing Group. doi:10.1038/srep25031.
- Wei, S., Zhou, Q., and Wang, X. 2005. Identification of weed plants excluding the uptake of heavy metals. *Environment International* **31**(6): 829–834. doi:10.1016/j.envint.2005.05.045.
- Wei, T., and Simko, V.R. 2021. Package “Corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92). Package Corrplot for R Software.
- Weiss-Schneeweiss, H., Emadzade, K., Jang, T.-S., and Schneeweiss, G.M. 2013. Evolutionary Consequences, Constraints and Potential of Polyploidy in Plants. *CGR* **140**(2–4): 137–150. Karger Publishers. doi:10.1159/000351727.
- Wenzel, W.W., Bunkowski, M., Puschenreiter, M., and Horak, O. 2003. Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution* **123**(1): 131–138. Elsevier.
- Wenzel, W.W., and Jockwer, F. 1999. Accumulation of heavy metals in plants grown on mineralised soils of the Austrian Alps. *Environmental Pollution* **104**(1): 145–155. doi:10.1016/S0269-7491(98)00139-0.
- Westerbergh, A., and Saura, A. 1992. The effect of serpentine on the population structure of *Silene dioica* (Caryophyllaceae). *Evolution* **46**(5): 1537–1548. Wiley Online Library.
- Whittaker, R.H. 1954. The Ecology of Serpentine Soils. *Ecology* **35**(2): 258–288. Ecological Society of America. doi:10.2307/1931126.
- Wickham, H. 2016. Programming with ggplot2. In *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Edited by H. Wickham. Springer International Publishing, Cham. pp. 241–253. doi:10.1007/978-3-319-24277-4_12.
- Zhu, X.F., Zheng, C., Hu, Y.T., Jiang, T., Liu, Y., Dong, N.Y., Yang, J.L., and Zheng, S.J. 2011. Cadmium-induced oxalate secretion from root apex is associated with cadmium exclusion and resistance in *Lycopersicon esulentum*. *Plant, Cell & Environment* **34**(7): 1055–1064. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02304.x.

8. Přílohy

Příloha 1: Kompletní přehled analýzy půd

Kód vzorku	sušina %	pH akt. H ₂ O	pH vým. KCl	N tot %	C tot %	Ca ava. mg/kg	Mg ava. mg/kg	K ava. mg/kg
M2	99,07	6,95	7,13	0,15	2,33	733,32	40,17	16,45
M3	98,72	6,93	6,65	0,13	1,62	1294,57	55,76	75,86
M1	98,88	6,7	6,54	0,27	4,01	991,61	209,45	83,93
C2a	98,93	8,52	8,45	0,14	8,96	31759,83	3990,70	48,53
C1	99,73	7,38	7,23	0,08	0,75	878,87	13,66	13,54
S	96,41	7,29	6,99	0,41	5,19	1079,24	3956,44	87,59
C2b	98,52	7,64	7,48	0,31	13,15	5274,87	399,67	55,62

Kód vzorku	Cu ava. mg/kg	Zn ava. mg/kg	Pb ava. mg/kg	Co ava. mg/kg	Ni ava. mg/kg	Cr ava. mg/kg	P ava. mg/kg	P tot. mg/kg
M2	163,92	31068,94	2550,72	0,53	11,23	0,22	2,41	375,97
M3	3,64	24675,85	1518,44	1,20	7,20	0,16	16,11	698,44
M1	6,87	2995,55	3472,90	0,71	3,30	0,21	10,70	273,32
C2a	1,27	44,81	30,16	0,19	0,61	0,09	16,27	698,35
C1	0,55	4,14	6,78	0,17	0,36	0,15	9,06	84,65
S	1,96	6,17	4,09	6,71	79,66	0,87	14,81	444,53
C2b	1,81	26,23	10,53	0,85	1,48	pod 0,01	13,26	692,45

Kód vzorku	Ca tot. mg/kg	Mg tot. mg/kg	K tot. mg/kg	Cu tot. mg/kg	Zn tot. mg/kg	Pb tot. mg/kg	Co tot. mg/kg	Ni tot. mg/kg
M2	9245,14	1485,79	2347,15	2210,43	88106,68	29829,23	17,84	48,28
M3	3528,07	1932,09	5183,28	47,61	78093,34	11207,39	28,99	59,83
M1	18158,37	9239,99	5849,51	97,25	14617,72	17978,02	101,09	71,09
C2a	217964,09	93532,29	1241,03	9,29	270,84	109,61	4,09	14,16
C1	2012,53	239,30	202,31	1,43	19,48	13,34	0,10	1,05
S	4512,48	135960,86	720,83	14,91	116,37	23,63	127,40	1819,26
C2b	224099,14	105447,96	966,58	7,02	70,86	18,12	2,77	12,16

Kód vzorku	Cr tot. mg/kg	Ca mmol/kg	Mg mmol/kg	K mmol/kg	Na mmol/kg	Al+H mmol/kg	CEC mmol/kg
M2	7,89	21,22	0,49	0,49	0,16	0,49	22,85
M3	23,26	61,92	3,36	1,89	0,57	0,98	68,72
M1	20,90	44,67	20,77	1,93	0,34	1,47	69,18
C2a	10,88	40,10	72,66	1,10	0,37	0,00	114,23
C1	1,34	42,03	0,77	0,32	0,35	0,49	43,95
S	653,49	65,22	296,51	1,64	1,14	0,00	364,51
C2b	9,72	179,18	34,90	1,03	0,55	0,00	215,65

Příloha 2: Výsledky t-testů analyzujících rozdíl mezi obsahem kovů v kořenech a listech.

Prvek	Půda	Populace	t	df	p-honota	
Ni	S	C1	16,16	7,97	< 0,001	***
Ni	S	C2	6,17	6,15	< 0,001	***
Ni	S	S	6,39	5,76	< 0,001	***
Ni	S	M1	10,69	5,53	< 0,001	***
Ni	S	M2	10,91	7,68	< 0,001	***
Ni	S	M3	7,35	5,25	< 0,001	***
Ni	M1	C1	8,66	8,00	< 0,001	***
Ni	M1	C2	4,99	4,12	0,007	**
Ni	M1	S	5,02	6,01	0,002	**
Ni	M1	M1	7,64	7,67	< 0,001	***
Ni	M1	M2	5,40	7,98	< 0,001	***
Ni	M1	M3	13,77	8,00	< 0,001	***
Ni	M2	C1	2,32	6,67	0,056	
Ni	M2	C2	6,86	5,69	< 0,001	***
Ni	M2	S	3,18	4,98	0,025	*
Ni	M2	M1	9,61	6,06	< 0,001	***
Ni	M2	M2	1,88	4,37	0,127	
Ni	M2	M3	3,46	5,01	0,018	*
Ni	M3	C1	6,01	7,13	< 0,001	***
Ni	M3	C2	12,93	5,76	< 0,001	***
Ni	M3	S	6,74	6,03	< 0,001	***
Ni	M3	M1	6,59	6,53	< 0,001	***
Ni	M3	M2	1,55	7,71	0,162	
Ni	M3	M3	25,58	7,96	< 0,001	***
Zn	S	C1	0,04	7,53	0,970	
Zn	S	C2	-1,23	5,66	0,269	
Zn	S	S	1,54	7,17	0,166	
Zn	S	M1	-1,12	6,83	0,302	
Zn	S	M2	3,11	4,94	0,027	*
Zn	S	M3	2,90	5,73	0,029	*
Zn	M1	C1	5,73	6,93	< 0,001	***
Zn	M1	C2	2,44	4,19	0,068	
Zn	M1	S	1,37	6,71	0,215	
Zn	M1	M1	-1,59	4,84	0,174	
Zn	M1	M2	-0,30	7,51	0,771	
Zn	M1	M3	1,51	7,96	0,171	
Zn	M2	C1	2,32	7,58	0,051	
Zn	M2	C2	3,14	6,69	0,017	*
Zn	M2	S	1,84	4,89	0,127	
Zn	M2	M1	0,89	6,48	0,406	
Zn	M2	M2	0,40	4,90	0,705	
Zn	M2	M3	-0,06	4,54	0,956	
Zn	M3	C1	2,16	6,22	0,072	
Zn	M3	C2	7,01	4,77	0,001	**

Prvek	Půda	Populace	t	df	p-honota	
Zn	M3	S	2,05	5,75	0,089	
Zn	M3	M1	3,65	7,77	0,007	**
Zn	M3	M2	1,43	6,53	0,198	
Zn	M3	M3	5,70	7,76	< 0,001	***
Pb	S	C1	1,64	5,90	0,154	
Pb	S	C2	-0,16	6,90	0,879	
Pb	S	S	3,94	5,59	0,009	**
Pb	S	M1	1,85	7,60	0,103	
Pb	S	M2	3,09	6,67	0,019	*
Pb	S	M3	4,90	6,09	0,003	**
Pb	M1	C1	17,16	6,81	< 0,001	***
Pb	M1	C2	8,21	4,81	< 0,001	***
Pb	M1	S	6,20	6,08	< 0,001	***
Pb	M1	M1	4,57	7,26	0,002	**
Pb	M1	M2	6,30	5,24	0,001	**
Pb	M1	M3	8,82	4,67	< 0,001	***
Pb	M2	C1	4,40	7,95	0,002	**
Pb	M2	C2	5,51	7,91	< 0,001	***
Pb	M2	S	5,72	5,02	0,002	**
Pb	M2	M1	7,29	7,69	< 0,001	***
Pb	M2	M2	3,43	5,57	0,016	*
Pb	M2	M3	5,21	5,92	0,002	**
Pb	M3	C1	4,27	5,82	0,006	**
Pb	M3	C2	7,63	4,29	0,001	**
Pb	M3	S	5,16	6,64	0,002	**
Pb	M3	M1	3,84	4,38	0,016	*
Pb	M3	M2	6,89	7,19	< 0,001	***
Pb	M3	M3	21,69	5,45	< 0,001	***