

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie



Nikol Krejčová

Mezidruhová hybridizace mezi *Pulsatilla pratensis* a *P. patens* – význam pro druhovou ochranu

Interspecific hybridization between *Pulsatilla pratensis* a *P. patens* – implications for species conservation

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Jan Suda, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 8. 5. 2011

Podpis: Nikol Krejčová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli Honzovi Sudovi za jeho velkou pomoc, vstřícnost a trpělivost.

Svůj další velký dík bych pak chtěla věnovat své rodině za její neustálou podporu.

Obsah

Abstrakt	5
Summary	5
1. Úvod.....	6
2. Mikroevoluční procesy.....	6
2.1. Hybridizace	6
2.1.1. Četnost.....	7
2.1.2. Ohrožení rodičovských druhů způsobené hybridizací	10
2.1.3. Hybridní speciace	10
2.2. Polyploidizace	11
2.3. Velikost genomu.....	12
3. Charakteristika rodu <i>Pulsatilla</i> (koniklec).....	14
3.1. Systematické zařazení rodu <i>Pulsatilla</i>	14
3.2. Morfologická charakteristika.....	14
3.3. Ekologie.....	15
3.4. Taxonomické členění rodu <i>Pulsatilla</i>	15
3.5. Karyologie.....	15
3.6. Geografické rozšíření	16
3.7. Variabilita	16
3.8. Hybridizace	19
3.9. Ohrožení.....	21
4. <i>Pulsatilla patens</i> (koniklec otevřený)	21
4.1. Popis	22
4.2. Variabilita	22
4.3. Taxonomické členění	22
4.4. Ekologie a cenologie	23
4.5. Ohrožení	24
4.6. Výskyt v ČR	25
5. <i>Pulsatilla pratensis</i> (koniklec luční)	25
5.1. Popis	25
5.2. Variabilita	26
5.3. Taxonomické členění	26
5.4. Ekologie a cenologie	27
5.5. Ohrožení	27
5.6. Výskyt v ČR	27
6. Hybridizace mezi <i>P. patens</i> a <i>P. pratensis</i>	27
6.1. <i>Pulsatilla ×hackelii</i> Pohl	28
6.1.1. Popis	28
6.1.2. Fertilita	29
6.1.3. Karyologie	29
6.1.4. Výskyt	29
7. Pilotní cytometrické výsledky	30
8. Otázky pro navazující diplomovou práci	32
9. Metodické přístupy	33
10. Použitá literatura	35
11. Přílohy	38

Abstrakt

Bakalářská práce shrnuje poznatky o evoluční historii, diverzitě, variabilitě a populačních procesech v rodu *Pulsatilla* (koniklec), s důrazem na problematiku mezidruhové hybridizace. Rod *Pulsatilla* (čeleď *Ranunculaceae*) zahrnuje celkem asi 30 zástupců vyskytujících se na celé severní polokouli. Zástupci rodu se vyznačují vysoká fenotypovou variabilitou, a to jak úrovni jednotlivých taxonů, tak populací. Významným zdrojem variability je polyploidizace a hybridizace. Navíc většina středoevropských druhů tvoří malé a nezářídka izolované populace (bez výjimky se jedná o rostliny vzácné a ohrožené), což může vést k rychlejším evolučním procesům. Těžiště bakalářské práce leží v hybridizaci mezi dvěma zástupci naší květeny *P. patens* a *P. pratensis*. Tyto druhy se často vyskytují na společných stanovištích a mohou se tak křížit za vzniku *P. ×hackelii*. Popsaná skupina tak představuje vhodný model pro studium mikroevolučních procesů probíhajících v malých populacích, včetně vlivu mezidruhové hybridizace na genofond ohrožených druhů. V závěrečné části jsou představeny otázky, které bude řešit navazující diplomová práce.

Klíčová slova: biosystematika, mezidruhová hybridizace, mikroevoluční procesy, *Pulsatilla*, ohrožené druhy, velikost genomu, speciace.

Summary

The thesis deals with evolution, diversity, variation and population processes in the genus *Pulsatilla* (pasque flower). The genus *Pulsatilla* (family *Ranunculaceae*) contains about 30 species occurring thorough the Northern hemisphere. High phenotypic variation was observed at inter- as well as intraspecific levels, and was triggered by genome duplication and hybridization. Most Central-European taxa form only small and spatially isolated populations, which may accelerate evolutionary processes in their populations. The main topic of the thesis is the frequency, dynamics and evolutionary consequences of interspecific hybridization between the two endangered species of the Czech flora, *P. patens* and *P. pratensis*. These species often grow in sympatry and may hybridize, resulting in a nothotaxon *P. ×hackelii*. The risk of a breakdown of species integrity due to interspecific hybridization needs to be assessed using modern cytogenetic and molecular techniques. Questions that will be addressed in the master's thesis are also presented.

Key words: biosystematics, endangered species, genom size, interspecific, hybridization, microevolution, *Pulsatilla*, speciation.

1. Úvod

Vzácné a ohrožené druhy rostlin tvoří významnou (a neustále narůstající) skupinu naší květeny. Pro stanovení optimální ochranné strategie je nutné získat detailní poznatky z jejich biologie, ekologie i evoluční historie. Navzdory tomu však zůstávají naše znalosti o většině ohrožených druhů pouze útržkovité. Výjimkou není ani rod *Pulsatilla* (koniklec), který představuje velice zajímavou skupinu čeledi *Ranunculaceae*. Rod byl v minulosti důkladně studován, jednalo se však téměř výhradně o studie morfologie s využitím observačních postupů, případně experimentální kultivace. Na základě těchto studií byl rod kvůli své vysoké variabilitě rozčleněn do mnoha - často značně podobných - druhů, poddruhů a variet. Předpokládána byla též existence hybridů a zpětných hybridů. Jen na území Evropy je odlišováno deset druhů s 25 poddruhy a mnoho varietami, a 15 kříženců. V naší květeně se vyskytuje pět druhů konikleců, všichni jsou vzácné a chráněné. Z nich dva jsou řazeny mezi kriticky ohrožené (*P. patens* a *P. vernalis*), dva mezi silně ohrožené, *P. grandis* a *P. pratensis*, a *P. scherfelii* patří mezi ohrožené druhy. Naši zástupci vytváří tři hybridy, přičemž nejčastěji je dokládána hybridizace mezi *P. pratensis* a *P. patens*. Tato skupina je tedy jeví jako vhodný model pro studium hybridizace s využitím moderních cytogenetických a molekulárních metod.

2. Mikroevoluční procesy

2.1. Hybridizace

Pojem hybridizace popisuje reprodukci mezi různými druhy organismů. Potomci vzniklí hybridizací jsou hybridi nebo-li kříženci. Hybridizace byla dlouho dobu považována za zřídka se vyskytující jev, který tudíž nemá žádný význam pro evoluci a je naopak jakousi evoluční chybou (Arnold 1997). Toto tvrzení bylo v souladu s obecně přijímanou biologickou definicí druhu, neboť ta křížení za málo časté předpokládá. Dle obecné biologie definujeme druh jako populaci, jejíž jedinci se mezi sebou mohou volně křížit a jejich potomstvo bývá plodné. Naopak křížení této populace s jedinci z populací jiných druhů není možné (nevede ke vzniku plodných potomků) (Mayr 1942).

Novější poznatky ale dokazují, že hybridizace je u mnoha skupin organismů naopak velmi častá, a její evoluční význam je proto značný. Bylo prokázáno, že hybridizace má dvě úrovně fungování. Zatímco na úrovni jedinců je její výskyt opravdu nízký, a to u méně jak 0,1% individuů za generaci v populaci typického druhu. Na úrovni druhů její význam narůstá, protože i málo hybridních jedinců může udržet genový tok mezi druhy (Mallet 2007; Rieseberg 1997; Seehausen 2004). Tyto poznatky jsou spíše v souladu s fylogenetickou definicí druhu, která druhy definuje jako populace odlišující se jedním nebo více fixovanými

rozdílnými znaky, alternativně pak jako nejmenší fylogenetické skupiny, které mohou být definovány společnými odvozenými znaky. Fylogenetická definice druhu tedy za znaky druhů považuje geneticky přenosné znaky a genetický (vnitrodruhový) tok je jejím předpokladem (Mallet 2005).

2.1.1. Četnost

Výzkumy posledních desetiletí jednoznačně potvrdily, že zejména u rostlin je hybridizace častým jevem. Do hybridizace je totiž jen mezi cévnatými rostlinami britské flóry zapojeno nejméně 25% druhů, což vzhledem k tomu, že britská flóra patří k druhově chudším, vybízí ke spekulacím, jak častá musí být hybridizace v druhově bohatších oblastech (Mallet 2005). Počet kříženců u rostlin dále rozšiřuje fakt, že většina rostlin je polyploidních a jedním z typů polyploidie je i allopolyploidie, která zahrnuje jak genomovou duplikaci, tak hybridizaci. U živočichů byla hybridizace dlouho považována za málo častou a nevýznamnou oproti situaci u rostlin, za jakousi reprodukční chybu. Bylo však zjištěno, že se objevuje u 10% z nich (Ellstrand et al. 1996; Mallet 2005). Ukázalo se, že význam křížení je různý u různých skupin živočichů. Stupeň křížení je vysoký například u ptáků, motýlů, a šestiprocentní hybridizace se vyskytuje i ve skupině evropských savců. Křížení bylo zjištěno i u největšího zvířete, které na Zemi v současnosti žije, plejtváka obrovského (*Balaenoptera musculus*), který se kříží s plejtvákem myšokem (*Balaenoptera physalus*) (Mallet 2008). Zjištěný počet hybridů nemusí být konečný, protože mnoho z nich nelze rozlišit na základě morfologických znaků, a budou odhaleni teprve pomocí moderních molekulárních nebo cytogenetických technik (Mallet 2008).

Zajímavou vlastností hybridů je jejich fitness, která se do značné míry odvíjí od jejich genových a genomových charakteristik. Vzhledem k tomu, že v hybridním genomu dochází ke kombinacím již ustanovených genomů jejich rodičů a pravděpodobně k mnoha přestavbám, mohou hybridizací vznikat jak jedinci s nízkou, tak i vysokou fitness (Arnold et Hodges 1995). Nižší fitness oproti rodičům byla zjištěna např. u vrby *Salix ×incubacea*, kříženec druhů *Salix repens* (vrba plazivá) a *Salix rosmarinifolia* (vrba rozmarýnolistá), naproti tomu vyšší fitness, než kterýkoli z rodičů, vykazuje např. křídlatka *Reynoutria ×bohemica*, kříženec *Reynoutria japonica* (křídlatka česká) a *Reynoutria sachalinensis* (křídlatka sachalinská).

S fitness jedince je úzce spojena jeho fertilita. Fertilita hybridů je dokumentována a analyzována dlouhou dobu (Darwin 1859). Bylo zjištěno, že plodnost kříženců často nedosahuje plodnosti rodičů, někdy jsou kříženci dokonce naprosto sterilní. Právě dlouho

známá snížená fertilita hybridů byla považována za jednu z hlavních překážek v evoluční uplatnitelnosti hybridů (Grant 1963).

Poznatky poslední doby ale vysvětlují, že i pokud hybridy vznikají zřídka a mají nízkou fertilitu, mohou produkovat další generace potomků poměrně často, pokud se příležitost pro jejich vznik stále opakuje. Příkladem takovéto situace je křížení slunečnic *Helianthus annuus* (slunečnice roční) a *H. petiolaris* (slunečnice řapíkatá), jejichž první generace hybridů má fertilitu 14% pylu, zpětní kříženci a F2 generace pak mají pouze 1-2% původního množství semen, a přesto z těchto rodičovských druhů vzniká několik generací hybridů (Heiser 1947; Heiser et al. 1969).

Hlavním důvodem pro sníženou fertilitu hybridů je nekompatibilita na úrovni chromozómů, která je jednou z prvních postzygotických bariér. Vzniká jako důsledek velkého množství mutací a genomových přestaveb a projevuje se poruchami při segregaci chromozómů během meiózy. Dalším důvodem snížené fertility hybridů je pak nekompatibilita na úrovni genů, neboť dojde k rozpadu komplexů genů, které byly funkční v rodičovských genomech, a geny nemohou spolupracovat stejně jako u rodičů. Nekompatibilita na úrovni genů se nemusí projevit v první generaci kříženců, ale až za několik generací (Flegr 2007).

Zajímavým fenoménem je postižení sníženou fertilitou či životaschopností příslušníků pouze jednoho pohlaví. Vysvětlení tohoto fenoménu poskytuje tzv. Haldaneovo pravidlo, které říká, že takto více postižené pohlaví bývá pohlaví heterogametické (Flegr 2007; Mallet 2005).

Fertilita a fitness hybridů dále rozhoduje o tom, zda jsou hybridy schopni se křížit zpětně s rodičovskými druhy. Zpětnou hybridizací dochází k postupnému vnášení genů jednoho druhu do genomu druhého druhu, tedy ději nazývanému introgrese (Grant et Grant 1992). Introgresí může následně vznikat několik typů hybridů (Mallet 2008). Bylo zjištěno, že výskyt introgrese je velmi častý, u rostlin se introgrese vyskytuje např.: u rodu *Cercocarpus* (ohaňkovník, čeleď *Rosaceae*), mezi druhy *Cercocarpus traskia* a *C. betuloides*, u rodu *Pinus* (borovice), mezi dvěma českými druhy borovic, *Pinus uncinata* subsp. *uliginosa* (borovice blatka) a *P. sylvestris* (borovice lesní), a dále u rodu *Helianthus* (slunečnice), a to mezi vzácnějšími druhy slunečnic a častým druhem *H. annuus*. (slunečnice roční).

U živočichů známe také mnoho příkladů introgrese, např.: u rodu *Oxyura* (kachnice), mezi druhy *Oxyura jamaicensis* (kachnice kaštanová) a *O. leucocephala* (kachnice bělohlavá), u rodu *Streptopelia* (hrdlička), mezi druhy *Streptopelia picturata rostrata* a *S. p. picturata* na Seychelských ostrovech, nebo u rodu *Canis* (vlk), mezi *Canis lupus* (vlk obecný) a *C. familiaris* (pes domácí) (Avice 2001; Seehausen 2004; Rhymer et Simberloff 1996).

Tok genů může mít na rodičovské druhy různý vliv, pozitivní spočívá ve zvyšování jejich adaptability na podmínky prostředí neustálým obohacováním genomu (Arnold 1997). Negativní následek toku genů pro rodičovské druhy může být potlačování genů jednoho druhu geny druhého druhu (viz kapitola ohrožení hybridizací) (Seehausen 2004).

Na místech styku areálů dvou allopatrických druhů, tedy druhů vyskytujících se na odlišných areálech, existují tzv. kontaktní zóny druhů. Pokud v kontaktních zónách dochází k hybridizaci druhů, vznikají zóny nazývané jako hybridní. Hybridní zóny mohou umožňovat tok genů i mezi druhy geograficky oddělenými. Allopatrické druhy mezi sebou mohou mít slabší genetické bariéry než druhy sympatrické, proto vytváření takovýchto hybridních zón u nich může být jednoduché. V hybridních zónách může docházet k reprodukci hybridů mezi sebou nebo ke zpětné hybridizaci s rodičovskými druhy. Může tak vzniknout nestejnorodá hybridní populace, složená z hybridů s různou evoluční historií (Seehausen 2004).

Většina hybridních zón je dlouhodobě stabilních, což je dosti zajímavé a existuje několik teorií tuto stabilitu vysvětlující (Genovart 2009).

První z těchto teorií, jinak také nazývána jako „tension model“ neboli „model tlaku“ vysvětluje udržení hybridních zón díky vysoké selekci vůči hybridům. Tato selekce je způsobená vysokou kompeticí mezi hybridy a rodičovskými druhy, ve které jsou rodiče v převaze buď díky vyššímu fitness nebo díky vyšší hustotě populace. Vysoká selekce zabraňuje proniknutí hybridů do areálů rozšíření jejich rodičů (Barton et Hewitt 1985). Naopak na okrajích areálů, kde se vytváří hybridní zóny, je hustota jedinců rodičů nízká, a proto je zde i nízká selekce proti hybridům (Rieseberg 1997).

Další teorie, nazývaná „bounded hybrid superiority“, tedy něco jako „model ohraničené převahy hybrida“, uvažuje, že hybridy jsou lépe přizpůsobeni ekologickým podmínkám charakteristickým pro místa hybridních zón a mají v těchto podmínkách větší fitness než kdekoli jinde (Moore 1977).

V hybridních zónách se vyskytují různé příbuzné genotypy a fenotypy a rychleji než v běžných populacích zde proto může probíhat specializace a speciace. Hybridní zóny jsou součástí teorie klinální variability. Ta vysvětluje fenotypové změny v rámci druhu podél geografického rozšíření adaptací na abiotické podmínky. Variabilita druhu způsobená adaptací je pak podporována právě hybridizací a introgresí spojenou s hybridními zónami (Flegr 2006). Druhy, obzvláště příbuzné, mohou být hybridními zónami propojené a vytvářet tak fenotypové kontinuum (Zimmermann 1964).

2.1.2 Ohrožení rodičovských druhů způsobené hybridizací

Hybridizace může populace rodičovských druhů ovlivňovat i negativně tím, že vede ke snížení jejich hustoty a případně až k jejich extinkci (Wolf et al. 2000).

Snížování hustoty populací rodičů může být způsobováno vysilováním rodičů. Rodičovské populace mohou být vysíleny kompeticí s hybridy, která je pro rodiče o to náročnější, o co je vyšší fitness hybridů (Rhymer et Simberloff 1996). Mezidruhová hybridizace také vysiluje reprodukční schopnosti a možnosti rodičů, kdy na úkor potomků daného druhu vznikají kříženci (Levin 1996).

Zásadní negativní vliv může mít na rodičovské populace intenzivní genový tok způsobený introgresí. Genový tok může vést k narušení genotypu druhů a postupně až k potlačení genotypu jednoho z druhů a převládnutí druhého druhu na lokalitě. Genový tok také může vést ke genetické fúzi druhů a tím vlastně k zániku jednotlivých druhů či některých méně častých genomů nebo alel (Seehausen et al. 1997).

Negativní vliv hybridizace a tím i riziko extinkce se zvyšuje, pokud jsou populace rodičů malé, popřípadě pokud je populace jednoho z rodičů malá. V dnešní době je mnoho druhů negativně ovlivňováno lidskou aktivitou. Populace druhů jsou naší činností často zmenšovány, v důsledku čehož se mohou výrazněji projevovat některé evoluční jevy, včetně hybridizace (Burgman et al. 1993). Kromě zmenšování populací zvyšujeme vliv hybridizace na druhy také narušením stanovišť nebo antropogenním přenos druhů (Anderson 1948), křížení tak nově probíhá např. mezi druhy: *Geum rivale* (kuklík potoční) a *G. urbanum* (kuklík městský), nebo mezi druhy *Typha latifolia* (orobinec širokolistý) a *T. angustifolia* (orobinec úzkolistý). U invazních druhů často dochází k hybridizaci s druhy původními, což je způsobeno slabými reprodukčními bariérami mezi těmito druhy. Slabé reprodukční bariéry jsou výsledkem izolovaného vývoje těchto druhů, které by se bez našeho zásahu nikdy nedostaly do styku. Snadná hybridizace však lehce může vést k potlačení genomu jednoho z druhů nebo jejich fúzi (Wolf et al. 2000).

Hybridizace je v každém případě jedním z významných témat ochranné biologie, ať už se jedná o ochranu vzácných druhů ohrožených hybridizací, druhů ohrožených masivní hybridizací vlivem člověka, nebo záchranné programy, kdy může dojít k hybridizaci příliš si geneticky vzdálených populací (Rhymer et Simberloff 1996; Genovart 2008).

2.1.3. Hybridní speciace

Pokud jsou hybridy schopni se křížit mezi sebou a mají dostatečnou fitness, může hybridizace vést až ke speciaci a vzniku nového druhu (Anderson et Stebbins 1954). Hybridní speciace může probíhat jen při sympatrickém výskytu rodičovských druhů nebo při existenci

hybridních zón. Při speciaci pak musí dojít mezi kříženci a rodičovskými druhy ke vzniku reprodukčních bariér (Robertson et al. 2010).

Reprodukční bariéry vznikají speciací ekologickou nebo genetickou. Ekologickou speciací se hybridní specializují na ekologické podmínky niky, která je volná, nebo ve které mohou díky svým vlastnostem uspět v kompetici. Hybrid se tak může specializovat na část niky jednoho z rodičů, či může zaujmout i celou niku jednoho z rodičů (Anderson 1948). Genetická speciace se vyznačuje vznikem velkého množství mutací chromozómů i genů, včetně tak významných jako jsou polyploidizace nebo chromozómové přestavby. (Grant 1963; Barton et Hawitt 1985). Pro genetickou speciaci, respektive udržení mutací, je tedy výhodné, pokud jsou populace rodičů malé a je u nich časté příbuzenské křížení (Barton et Hawitt 1985).

U dlouhotrvající speciace se většinou ustanoví oba typy bariér, ekologické i genetické (Rieseberg 1997). Na to, který typ speciace proběhne dříve jsou různé názory. Za prvotní vymezení oproti rodičům ekologické a pozdější genetické považuje Seehausen (2004).

Naopak Templeton (1981) považuje bariéry genetické za prvotní a ekologické za sekundární.

Většina z druhů, u kterých nacházíme hybridy, patří mezi evolučně mladé druhy. Z tohoto faktu vychází teorie tvrdící, že právě v období po vzniku druhu je možné, aby vznikali hybridy a docházelo k introgresi. Postupnou speciací pak dochází ke vzniku reprodukčních bariér, jejichž vytváření může být regulováno silou genového toku mezi druhy, čím je silnější hybridizace a introgrese, tím je silnější tlak na vznik reprodukčních bariér a tím silnější tyto bariéry jsou (Turelli 2001). Některé teorie však nepovažují reprodukční bariéry za hlavní, ale pouze za vedlejší produkt selekce. (Coyne et Orr 2004) Vytvořené reprodukční bariéry jsou jeden ze znaků druhu. (Mayr 1942) Zda speciace hybridizací probíhá takto postupně nebo skokově (saltačně) není jasné, modelováním však bylo zjištěno, že hybridní speciace může proběhnout již během 25 generací (Ungerer 1998).

2. 2. Polyploidizace

Polyploidizace je dalším evolučním mechanismem, který umožňuje speciaci druhů a v poslední době je považován za stále významnější. Při polyploidizaci dochází ke znásobení kopií genomu organismů. Polyploidie jsou dvou základních typů, autopolyploidie a allopolyploidie (Robertson et al. 2010). Autopolyploidie vznikají duplikací vlastního genomu, jejich nejpravděpodobnější způsob vzniku je spojení neredukované a redukované gamety jednoho jedince za vzniku triploida. Tento triploidní jedinec se dále může reprodukovat pomocí redukovaných i neredukovaných gamet a dát vzniknout evolučně stabilnějšímu tetraploidovi (Husband 2000). Mezi příklady autopolyploidů patří *Solanum tuberosum* (lilek brambor), *Medicago sativa* (tolice setá), *Zea perennis* (divoký druh kukuřice) nebo *Dactylis*

glomerata (srha laločnatá) (Leitch et Leitch 2011; Soltis et Soltis 1993).

Allopolyploidi vznikají hybridizací dvou rozdílných druhů a následnou polyploidizací genomu. Mezi allopolyploidy patří například *Brassica juncea* (brukev sítinovitá) nebo *Antennaria dioica* (kociánek dvoudomý). (Rauh-L. 2003)

Polyploidizace se vyskytuje u mnoha druhů eukaryotních organismů. Přestože panovalo přesvědčení, že polyploidie u živočichů není možná, byla u některých objevena, například u hmyzu, *Bombyx mori* (bourec morušový), měkkýšů, *Bulinus truncatus* (čeled' Planorbidae – okružákovití) i obojživelníků, *Hyla versicolor* (rosnička měnivá) (Soltis et Soltis 1999).

U rostlin se polyploidie považuje za velmi častou, ku příkladu u skupiny krytosemenných prošly polyploidizací všechny druhy kromě bazálního druhu *Amborella trichopoda* (Soltis et al. 2009), velmi častý výskyt je i u kaprad'orostů (Leitch et Letch 2011). Dokonce je známo mnoho druhů, které byly tradičně považovány za diploidní, avšak molekulární analýzy u nich odhalily duplikované geny a tedy starobylou polyploidizací, např. *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní), *Zea mays* (kukuřice setá). Genom se může jevit jako diploidní i krátce po polyploidizaci, neboť hned po polyploidizaci dochází k velmi rychlé a extenzivní restrukturalizaci genomu a může dojít i k tzv. utišení genů (Soltis et Soltis 1997).

Původně existoval názor, že polyploidizace může v rámci taxonu vzniknout jen jednou, ale podle novějších poznatků víme, že polyploidizace probíhala ve většině případů několikrát v jeho evoluční historii (Soltis et Soltis 1995). Polyploidi se tedy mohou geneticky, morfologicky i ekologicky odlišovat, nezávisle podléhat speciaci a posléze se vzájemně křížit (Soltis et Soltis 1997).

Polyploidizace se nápadně často objevuje před významnými evolučními změnami jako jsou radiace, např. před radiací dvouděložných. Polyploidizace je proto často považována za mechanismus, který tyto velké evoluční změny umožňuje (Vision 2000). Polyploidizace ovlivňuje i fenotypové, fyziologické či reprodukční projevy a chování na úrovni jedinců (Soltis et Soltis 1993).

Polyploidizace tímto nepřímo ovlivňuje i interakce druhů s jinými organismy, například interakce rostlin a hmyzu (včetně opylovačů) (Thompson et al 1997).

2.3. Velikost genomu

S polyploidii (zmnožením genomových sad) je logicky svázána velikost genomu, tedy celkové množství jaderné DNA organismu.

Velikosti genomů se liší mezi jednotlivými skupinami organismů, často i mezi jednotlivými druhy. Proto specifická velikost genomu může být jedním z druhově-specifických znaků v mnoha skupinách eukaryotních organismů. Velikost genomu je dědičná (Gregory 2005), mění

se v závislosti na evolučních procesech, a proto by podle některých studií měla být považována za legitimní biologickou úroveň (Gregory 2004). V rámci druhu je velikost genomu většinou stabilizovaná interními mechanismy a variabilita ve velikosti genomu v rámci druhu je řídká, i když existují výjimky (Loureiro 2010). Velikost genomu se proto v určitých případech používá jako jeden z molekulárních znaků pro rozlišení jednotlivých druhů, popřípadě kříženců (Lysák 2009).

Velikost genomu je množství jaderné DNA charakteristické pro určitý genotyp a je označovaná jako C-hodnota (v angličtině jako C-value, kde C je zkratkou pro Constant), udává se v pikogramech DNA (pg) nebo počtu párů bází (Swift 1950; Greilhuber et al. 2005). Pro vyjádření velikosti monoploidní sady chromozómů byla v nedávné době zavedena ještě tzv. Cx-hodnota (Greilhuber et al. 2005).

Navzdory původním předpokladům o vztahu mezi množstvím jaderné DNA a komplexností organismů, se tyto teorie ukázaly být mylné a absence vztahu byla souhrnně označována jako paradox C-hodnoty. Podstatou tohoto paradoxu je fakt, že velikost genomu není úměrná tomu, kam ve vývojovém stromu je druh řazen. Velikost genomu tedy rozhodně není největší u druhů stojících na konci fylogeneze, z našeho pohledu „nejdokonalejších.“ Tato základní část paradoxu byla vysvětlena, když bylo zjištěno, že velkou část genomu zaujímají nekódující sekvence, i když nám stále není zcela jasné, jakou úlohu tyto nekódující sekvence mají (Gregory 2001). Nekódující části DNA jsou většinou tvořeny rozdílným množstvím repetitivních sekvencí DNA, které jsou tvořeny transposony, satelity, introny a pseudogeny (Bennett and Leitch 2005), případně znásobeným genomem vzniklým polyploidizací. Ztráty DNA jsou způsobovány nestejnou rekombinací homologů, nelegitimní rekombinací a vyšší rychlostí delece nukleotidů, než je jejich inserce (Bennetzen et al. 2005).

Další součástí paradoxu jsou příčiny změn ve velikosti genomu, které jsme stále nezjistili, i když už známe jejich mechanismy. Mechanismy určující velikost genomu (transkripce transpozónů) mohou být ovlivněny např. podmínkami stanoviště (Kalendar et al. 2000).

Velikost genomu je výsledek dynamické rovnováhy mezi zvětšováním a zmenšováním (Bennet et Leitch 2005). Poslední částí paradoxu je vztah mezi velikostí genomu a fenotypem organismu. Velikost genomu je pozitivně korelována s velikostí buňky a negativně s rychlostí jejího dělení. Existuje však i vztah mezi velikostí genomu a vývojem celého organismu, nejen jeho rychlostí, ale také jeho průběhem. Korelace existuje i mezi velikostí genomu a životní formou. Genom se redukuje například u krátce žijících rostlin, jednoletek (Gregory 2002).

Jednou z rostlinných skupin, v jejíž evoluční historii se setkáváme s genovou duplikací, diferenciací v obsahu jaderné DNA i mezidruhovou hybridizací, je rod koniklec (*Pulsatilla*).

3. Charakteristika rodu *Pulsatilla* (koniklec)

3.1. Systematické zařazení rodu *Pulsatilla*

(Skalický 1997; Kubát 2002)

Říše: Plantae (rostliny)

Oddělení: Magnoliophyta (dvouděložné)

Třída: Rosopsida (vyšší dvouděložné)

Řád: Ranunculales (pryskyřníkotvaré)

Čeleď: *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité)

Rod: *Pulsatilla* L. (koniklec)

3.2. Morfologická charakteristika

Koniklece jsou vytrvalé trsnaté byliny, které jsou často oděny chlupy. Jejich kořen je kůlovitého nebo větvenitého tvaru, později vznikají adventivní kořeny. Hlavní kořen stárnutím dřevnatí a tmavne až do černohněda. Hypokotyl rostliny se přeměňuje na oddenek, který se stářím rostliny stává vícehlavým (Hegi et Weber 1975).

Listové pupeny jsou obaleny šupinami a na bázi srůstají. Na každé hlavě oddenku vyrůstá přízemní růžice zpeřeně dělených nebo složených listů. V růžici jsou listy v počtu 1-12, často jsou chlupaté, obzvláště v mládí. Stonek také může být pokryt oděním. Stonek nese brakteol, což je přeslenovitý útvar srostlý z listenů (zpravidla tří), který obaluje květní pupen jediného květu neseného stonkem. Stonek můžeme rozdělovat na stvol a květní stopku. V době květu a hlavně pak v době plodu se celá lodyha, zejména květní stopka velmi prodlužuje (Goliašová 1982).

Květ je tvořen 6 okvětními lístky, uspořádanými ve dvou kruzích. Okvětní lístky jsou všechny stejně barevné. Vyskytují se barva modrá, fialová, bílá a žlutá. Barviva jsou tvořena hlavně delphinidinovými glykosidy. Okvětní lístky jsou vně chlupaté.

Květy jsou oboupohlavné, v každém květu je mnoho tyčinek a pestíků (většinou 100-300), jsou uspořádány spirálovitě. Vnější tyčinky bývají většinou přeměněny na staminodální nektaria. U některých druhů, např. *Pulsatilla vernalis* se vyskytuje androdiece.

Plodem je nažka s několik centimetrů dlouhým chlupatým přívěskem (Skalický 1997).

Všichni zástupci rodu jsou jedovatí, protože obsahují glykosidický lakton ranunkulin.

Pokud ranunkulin požití živočichové, je v jejich tělech enzymaticky štěpen na jedovatý protoanemonin a glukosu. Sušením se ranunkulin mění na inaktivní dimer anemonin (Skalický 1997).

3.3. Ekologie

Koniklece jsou světlomilné, teplomilné rostliny. Rostou na suchých trávnících a ve světlých lesích (Hegi et Weber 1975). U konikleců je častá mykorhizní symbióza, která pravděpodobně značně ovlivňuje jejich růst (Zimmermann 1958, Pilt et Kukk 2002).

3.4. Taxonomické členění rodu *Pulsatilla*

1) podrod *Pulsatilla* (Skalický 1997)

Listeny tvořící brakteol jsou redukované, dřípené v čárkovité útvary a dolní třetinou až čtvrtinou srůstají. Listy mají řapík s vyvinutým velkým ventrálním cévním svazkem, jeho průřez je proto radiální, parenchymatická pochva řapíku není vytvořena. Květ je v naprosté většině případu tvořen šesti okvětními lístky, které jsou fialové, vzácně pak bělavé nebo žlutavé. Vnější tyčinky bývají přeměněné ve staminodální nektaria. Prašníky tyčinek jsou fialové a pylová zrna jsou trikolpátní nebo periporátní.

Do tohoto podrodu patří všichni naši zástupci kromě jedné výjimky:

Pulsatilla grandis (Wenderoth) Zamels

Pulsatilla vulgaris Miller

Pulsatilla patens (L.) Miller

Pulsatilla pratensis (L.) Miller

Pulsatilla vernalis (L.) Miller

2) podrod *Preonanthus* (Skalický 1997)

Listeny jsou řapíkaté, nesrostlé, podobné listům. Jejich počet je většinou tři. Listy mají řapík s parenchymatickou pochvou, ale bez velkého ventrálního cévního svazku. Okvětní lístky jsou bílé nebo žluté, mohou být nafialovělé. Tyčinky mají žluté prašníky a nebývají přeměněné ve staminodia. Pylová zrna jsou perikolpátní.

Jediný zástupce v české květeně:

Pulsatilla scherfelii (Ullepitsch) Skalický

3.5. Karyologie

Základní počet chromozómů u rodu *Pulsatilla* je $x = 8$. Do současné doby jsou známi pouze diploidi mající 16 chromozómů a tetraploidi mající 32 chromozómů. Chromozómy jsou podobné chromozómům příbuzného rodu *Anemone*, a to tvarem i velikostí. Diploidní jsou všichni zástupci podrodu *Preonanthus* a někteří zástupci podrodu *Pulsatilla* (skupiny *Vernales*, *Albae*, *Patentes*). Tetraploidi se vyskytují v podrodu *Pulsatilla* ve skupinách *Pratenses* a *Vulgares*. (Hegi et Weber 1975)

U nás původní druhy mají všechny počet chromozómů 16 (*P. patens*, *P. vernalis*, *P. scherfelii*, *P. pratensis*), kromě *Pulsatilla grandis*, který má chromozómové číslo 32. U *P. pratensis* uvádí většina prací chromozómové číslo 16, ale vyskytuje se i údaj 32 chromozómů

(Skalický 1997). Nepůvodní, ale v ČR se vyskytující druh *Pulsatilla vulgaris*, má 32 chromozómů (Javůrková-Jarolímová et Měsíček 1992).

Zajímavým údajem je pak počet chromozómů u *P. zimmermannii* (východopanonský endemit), který je $2n = 26$ (Skalický 1997).

3.6. Geografické rozšíření

Rod má asi 30 druhů, z nich se většina vyskytuje na severní polokouli, v mírném a mírně teplém pásmu. Koniklece se vyskytují na všech třech severních světadílech, přičemž jejich rozšíření na severní polokouli vymezuje 30. rovnoběžka a severní polární kruh.

Centrum diverzity konikleců leží ve střední a východní Asii, na území Ťan-Šanu (Aichele et Schweigler 1957).

Koniklece se vyskytují převážně ve vyšších polohách, v horách a pahorkatinách (Hegi et Weber 1975).

Druhy, respektive poddruhy, mají obvykle malé areály rozšíření, pravděpodobně hlavně kvůli postglaciálním klimatickým změnám a poměrně nízké odolnosti ke změně ekologických podmínek (Moore 1964).

3.7. Variabilita

Druhy rodu *Pulsatilla* byly vymezeny a oddělovány na základě morfologických rozdílů v listech a květech, a to včetně barvy květů. Avšak znaky, které jsou diakritické na malém území, nemusí platit na větších areálech.

V rodu koniklec je navíc velmi vysoká fenotypová variabilita v rámci jednotlivých druhů, poddruhů, populací i jedinců (Skalický 1997; Lindell 1998).

Variabilita často neodpovídá geografickému rozdělení poddruhů, například některé populace *P. grandis* ze střední Evropy se nezdají být morfologicky odlišitelné od *P. vulgaris* ze severo-západní Evropy, ačkoli se obě populace výrazně liší od populací *P. vulgaris* z Francie (Moore 1964).

V Evropě se vyskytuje 10 druhů a 25 poddruhů (Moore 1964; Hegi et Weber 1975).

Tab.1: Druhy rodu *Pulsatilla* rostoucí v Evropě (Moore 1964; Hegi et Weber 1975; Zimmermann 1958; Aichele et Schweigler 1957)

druh	poddruhy
<i>Pulsatilla alpina</i> (L.) Delarbre	subsp. <i>alpina</i> subsp. <i>apiifolia</i> (Scop.) Nyman
<i>Pulsatilla alba</i> Reichenb.	
<i>Pulsatilla vernalis</i> (L.) Miller	

<i>Pulsatilla pratensis</i> (L.) Miller	subsp. <i>nigricans</i> (Störck) Zamels subsp. <i>hungarica</i> Soó subsp. <i>pratensis</i>
<i>Pulsatilla montana</i> (Hoppe) Reichenb.	subsp. <i>montana</i> Aichele and Schwegler subsp. <i>australis</i> (Heuffel) Zamels subsp. <i>balkana</i> (Vel.) Zamels subsp. <i>bulgarica</i> (Rosenthalnon.) Vel.
<i>Pulsatilla rubra</i> (Lam.) Delarbre	subsp. <i>hispanica</i> Zimm. ex Aichele and Schwegler subsp. <i>rubra</i>
<i>Pulsatilla vulgaris</i> Miller	subsp. <i>vulgaris</i> subsp. <i>gotlandica</i> (K. Joh.) Zamels and Paegle
<i>P. grandis</i> (Wenderoth) Zamels	subsp. <i>grandis</i> subsp. <i>polonica</i> (Blocki) Aichele et Schwagler subsp. <i>velezensis</i> (Beck) Winkler
<i>Pulsatilla halleri</i> (All.) Wild.	subsp. <i>rhodopaea</i> K.Krause subsp. <i>taurica</i> (Juz.) K.Krause subsp. <i>slavica</i> (G. Reuss) Zamels subsp. <i>halleri</i> subsp. <i>styarica</i> (G. A. Pritzel) Zamels
<i>Pulsatilla patens</i> (L.) Miller	subsp. <i>patens</i> subsp. <i>teklae</i> (Zamels) Zamels subsp. <i>multifida</i> (Pritzel) Zamels subsp. <i>flavescens</i> (Zucc.) Zamels

3.8. Hybridizace

Hybridizace v rodu *Pulsatilla* je považována za velmi častou, některé známé příklady hybridizace nás vedou k závěrům, že v rodu existují pouze velmi slabé reprodukční bariéry, některé studie dokonce navrhují i teorii neexistence reprodukčních bariér v rodu koniklec (Krause 1958).

Přes množství popsaných případů hybridizace v rodu koniklec existují rozdíly mezi možnostmi, eventuelně častostí vzniku a udržení hybridů, dle kompatibilitosti jejich rodičů. Vzájemně geneticky nejrozdílnější jsou si zástupci obou podrodů rodu *Pulsatilla*. Ti jsou pravděpodobně opravdu geneticky nekompatibilní a záznamy o výskytu hybridů mezi podrody v přírodě jsou považovány za pochybné, a experimentálně nebyli takoví hybridy nikdy získáni (Hegi et Weber 1975).

Často je hybridizace dokládána v rámci podrodu *Pulsatilla*. Přestože jsou si zástupci tohoto podrodu pravděpodobně hodně příbuzní, objevuje se v podrodu významný genetický rozdíl, a tím je různá ploidie jeho zástupců, konkrétně diploidie a tetraploidie. Kříženci mezi heteroplodními rodiči jsou popisováni, ale pravděpodobnost jejich vzniku je považována za hodně nízkou. Navíc jsou tito kříženci považováni za sterilní, protože by měli být triploidy. Mezi homoploidními druhy podrodu *Pulsatilla* je pravděpodobnost hybridizace vyšší. Kříženci diploidních rodičů jsou z přírody popisováni velmi často, oproti tomu tetraploidní kříženci popisováni z přírody téměř nejsou. Experimentálně však byly vytvořeny téměř všechny možné hybridní kombinace, jak u druhů diploidních, tak tetraploidních. Pokud se nám daří hybridizovat tetraploidní druhy uměle, jeví se nám jejich nízký výskyt v přírodě opravdu zvláštním. Nejpravděpodobnějším vysvětlením jsou nedostatečné znalosti skupiny v *in-situ* podmínkách a problematické odhalení hybridů na základě morfologie (kříženci pak mohou snadno unikat pozornosti). U konikleců je i velmi často popisována introgresivní hybridizace (Hegi et Weber 1975).

K prohlubování našich znalostí o hybridizaci značně přispívají pokusná křížení.

Jedním z nejrozsáhlejších takovýchto experimentů bylo pětileté pokusné křížení mezi diploidním druhem *P. patens* a tetraploidním druhem *P. vulgaris*, a dále pak mezi poddruhy *P. vulgaris*, subsp. *pulsatilla*, subsp. *grandis*, subsp. *gotlandica*, a mezi dvěma populacemi *P. patens* subsp. *patens*. Autoři studie se mimo hybridizace zabývali i možností samosprášení u konikleců (Lindell 1998).

Křížení mezi *P. patens* a *P. vulgaris* subsp. *pulsatilla* bylo úspěšné, procento opylených vajíček a procento dobře vyvinutých nažek oproti samooplození u křížení pokleslo, ale počet vyklíčených semen se naopak u hybridizace zvýšilo.

U různých rodičovských kombinací, včetně samoopylení, byly v rámci *P. patens* a *P. vulgaris* rozdílné výsledky úspěšnosti vzniku potomků.

Při tomto experimentu se potvrdilo, že i v rámci poddruhů jednoho druhu směr křížení neboli identita rodičů ovlivňuje průběh a úspěšnost této reprodukce. Byl-li mateřským rodičem *P. pulsatilla* subsp. *gotlandica* byla úspěšnost křížení největší u otcovského rodiče subsp. *pulsatilla* (populace Vitemölla). U mateřského rodiče *P. vulgaris* subsp. *pulsatilla* byla nejúspěšnější reprodukce s pylem subsp. *pulsatilla* (populace Virserum), nejméně od subsp. *gotlandica*.

Vitalita/klíčivost pylu se u první generace potomků F1 vzniklých samosprášením nebo křížením oproti rodičovské generaci snížila bez rozdílů původu těchto jedinců. U druhé generace potomků F2 byla nejvyšší vitalita pylu u kříženců vzniklých křížením mezi druhy nebo populacemi, oproti samoopylení. (Lindell 1998).

Podle další studie pojednávající o *Pulsatilla vulgaris*, poddruzích *pulsatilla* a *grandis*, nebyly zaznamenány žádné rozdíly mezi množstvím semen vzniklých z rodičů stejného poddruhu či poddruhů rozdílných. V porovnávání úspěšnosti mezipoddruhového křížení a samoopylení, byla větší úspěšnost reprodukce u mezipoddruhového křížení. Pozorování potomků v této studii ale ukázalo, že rostliny vzniklé samosprášením byly i po 3-4 letech menší, náchylnější k parazitům a byl u nich vyšší počet abnormálních rostlin než u kříženců (Zimmermann 1935).

Někteří odborníci se v případě rodu *Pulsatilla* přiklánějí k teorii klinální variability. Tedy, že některé druhy a jejich vnitrodruhové taxony jsou spojeny plynulou řadou přechodů (Zimmermann 1964). Tato teorie by ukazovala, že rod *Pulsatilla* právě prochází bouřlivým obdobím vývoje, které se vyznačuje mimo jiné neúplnými reprodukčními bariérami mezi jednotlivými druhy (Briggs et Walters 2001).

V souvislosti s mezidruhovou hybridizací, sekundární hybridizací a klinální variabilitou se u rodu *Pulsatilla* často popisují hybridní zóny mezi jednotlivými druhy, jež by měly být výsledkem dlouhotrvajícího křížení a zpětného křížení. V těchto hybridních zónách je možné pozorovat postupný přechod fenotypu jednoho druhu přes fenotyp intermediární až k fenotypu dalšího druhu (např. zmenšující se šířka listových úkrojků od severu k jihu v hybridní zóně *P. halleri* subsp. *slavica* a *P. grandis*, tj. od širokoukrojkových zástupců *P. halleri* subsp. *slavica* v Karpatech směrem k typům s užšími úkrojky druhu *P. grandis* rostoucími na jihu (Zimmermann 1964).

Tab.2: Přechodné zóny mezi druhy konikleců (Zimmermann 1964)

jižní předhoří slovenských Karpat	<i>P. halleri</i> subsp. <i>slavica</i> a <i>P. grandis</i>
východní Alpy	<i>P. halleri</i> subsp. <i>styria</i> a <i>P. grandis</i>
Německo	<i>P. grandis</i> a <i>P. vulgaris</i>
Francie	<i>P. vulgaris</i> a <i>P. rubra</i>
jih Balkánského poloostrov	<i>P. grandis</i> a několik dalších druhů

Situaci v rodu *Pulsatilla* můžeme ilustrovat počtem druhů a jejich kříženců.

Ve střední Evropě se vyskytuje 9 druhů, mezi nimiž je popsáno celkem 11 kříženců (Hegi et Weber 1975). V České republice roste 6 zástupců a 3 kříženci (Skalický 1997). Na Slovensku je pak 9 druhů, 4 kříženci a 1 očekávaný kříženec (Goliasova 1982).

Tab.3: Popsání hybridů rodu *Pulsatilla* v Evropě (Hegi et Weber 1975; Skalický 1997; Aichele et Schwagler 1957).

* jsou označeni hybridy vyskytující se v naší květeně

hybrid	rodiče
<i>Pulsatilla</i> × <i>hackelii</i> Pohl*	<i>Pulsatilla patens</i> <i>Pulsatilla pratensis</i> subsp. <i>pratensis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>vilnensis</i> Gorski.	<i>P. patens</i> <i>P. pratensis</i> subsp. <i>nigricans</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>intermedia</i> Lsch.	<i>Pulsatilla patens</i> <i>Pulsatilla vernalis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>valentiana</i> Wagner	<i>Pulsatilla patens</i> <i>Pulsatilla grandis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>celakovskyana</i> Domin*	<i>Pulsatilla pratensis</i> subsp. <i>bohemica</i> <i>Pulsatilla vernalis</i> (var. <i>vernalis</i> ?)
<i>Pulsatilla</i> × <i>spuria</i> Camus	<i>Pulsatilla pratensis</i> <i>Pulsatilla vernalis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>gayeri</i> Smk.	<i>Pulsatilla montana</i> <i>Pulsatilla patens</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>bolzanensis</i> Murr.	<i>Pulsatilla montana</i> <i>Pulsatilla vernalis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>ochroleuca</i> (Brügg.) Torre et Sarnthem	<i>Pulsatilla alpina</i> subsp. <i>alpina</i> <i>Pulsatilla apifolia</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>affinis</i> Lasch	<i>Pulsatilla vulgaris</i> <i>Pulsatilla pratensis</i> subsp. <i>pratensis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>mixta</i> Halácsy*	<i>Pulsatilla grandis</i> <i>Pulsatilla pratensis</i> subsp. <i>bohemica</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>holubyana</i> Domin	<i>Pulsatilla grandis</i> <i>Pulsatilla slavica</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>propinqua</i> Lasch	<i>Pulsatilla vulgaris</i> <i>Pulsatilla vernalis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>weberi</i> (Widder) Janchen	<i>Pulsatilla halleri</i> subsp. <i>styarica</i> <i>Pulsatilla pratensis</i> subsp. <i>nigricans</i> ?
<i>Anemone</i> × <i>emiliana</i> Wolf	<i>Pulsatilla halleri</i> subsp. <i>halleri</i> <i>Pulsatilla vernalis</i>

3.9. Ohrožení

Koniklece jsou rostliny, jejichž populace se v poslední době obecně snižují, a většina druhů je proto považována za ohrožené. Důvodem ohrožení je pravděpodobně hlavně jejich úzká ekologická amplituda a na to navazující nízká tolerance ke změně podmínek stanoviště.

Většina konikleců jsou druhy raných sukcesních stádií, a proto nepřežijí zarůstání způsobené postupnou sukcesí, která začne probíhat, pokud dojde na lokalitě k zastavení disturbancí způsobovaných pastvou, kosením nebo vypalováním. Sukcese také velmi rychle probíhá, pokud je stanoviště eutrofizováno, což bývá v současné době častý jev, ať už se tak stane hnojením nebo emisemi sloučeninami dusíku.

I pro koniklece, stejně jako pro ostatní organismy, představuje nebezpečí i fragmentace stanovišť a izolace populací. Ohrožení tak představují i běžné lidské činnosti jako je obdělávání půdy a s tím spojená orba a používání pesticidů, zástavba, nebo intenzivní turistika. Jelikož jsou koniklece velmi dekorativní rostliny, jsou tyto rostliny obzvláště na některých územích velmi ohroženy otrháváním květů a vykopáváním za účelem pěstování na zahradách (Hegi et Weber 1975; Zimmermann 1964).

Všech pět našich původních zástupců je chráněno. Dva jsou řazeni mezi kriticky ohrožené, *P. patens* a *P. vernalis*, dva mezi silně ohrožené, *P. grandis* a *P. pratensis*, a *P. scherfelii* patří mezi ohrožené.

4. *Pulsatilla patens* (koniklec otevřený)

Koniklec otevřený popsal Miller roku 1768 v Gard. Dict. Ed. 8, no 4.

Synonyma jsou *Anemone patens* L., *Pulsatilla latifolia* Rupr., *P. teklae* Zamels, *P. bauhini* Tausch.

4.1. Popis

V ČR roste pouze poddruh subsp. *patens*. Koniklec otevřený má silný, vícehlavý, vystoupavý oddenek, který bývá tmavě hnědý. Mladé listy jsou kryty eliptickými šupinami. Stonek je vysoký 5-15 cm, v době plodu se prodlužuje až na 45 cm. Listy se vyvíjí až v době květu a plně vyvinuté jsou až za plodu (Skalický 1997). Listy vyrůstají z přízemní růžice v počtu 2-5, v mládí jsou pokryty chlupy, vytvářející hedvábný vzhled, stářím se tyto chlupy ztrácí a listy jsou olysalé až lysé. Spodní listy jsou děleny do laloků, kterých je obvykle 17-30 a jsou široké 5-12 mm (Moore 1964). Ostatní listy mají dlouhé, přímo odstálé řapíky. Jejich čepel je zhruba stejně široká jako dlouhá a je téměř kolmá k řapíku, trojsečná nebo trojčetná. Lístky těchto složených listů jsou přisedlé, většinou bez řapíčků, dlanitodílné nebo dlanitosečné, mají 15-30 úkrojků délky 4-12 mm, průměrně 8 mm.

Brakteol vzniká srůstem 3 listenů, je tvořen 14-20 úkrojky o šířce asi 1 mm. Brakteol vyrůstá pod květem a za květu se tedy nachází v horní části stonku. Po odkvětu se prodlužuje květní stopka a brakteol se tak ocitá ve spodní části stonku. Květy jsou vzpřímené nebo polovzpřímené, zvonkovitého tvaru (Goliašová 1982). Okvětní lístky jsou podlouhlé (asi třikrát delší jak široké), dlouhé 25-36 mm, široké 7-17 mm, na vrcholu mohou být tupé i

špičaté. Průměr květů je 5,5 až 8,5 cm, jejich barva je modro-fialová až světle fialová. Vnitřní tyčinky bývají 2-3 krát kratší než okvětní lístky, žluté. Čnělky jsou víceméně rovné.

Přívěšek u nažek bývá obvykle dlouhý 3-4,5 cm. Koniklec otevřený kvete v dubnu až květnu (Skalický 1997).

Koniklec otevřený je diploidní druh, $2n=16$ (IPCN).

4.2. Variabilita

Druh je poměrně málo individuálně variabilní, výjimečně se vyskytují bělokvěté aberace (*f. lactiflora* Domin), olysalé morfotypy (*f. glabrescens* Preuss) nebo plnokvěté monstrozity (Skalický 1997).

4.3. Taxonomické členění (Moore 1964; Aichele et Schwagler 1957; Skalický 1997)

Subsp. *patens*

Popis: Barva květů je modro-fialová, zřídka růžová nebo bílá. Listy mají pouze malý počet úkrojků, a to okolo 15-30 podlouhlých kopinatých úkrojků. Šířka úkrojků je okolo 0,7 cm. Lístky jsou jen nezřetelně řapíkaté. Listy vyrůstají později, než květy. Listeny v zákrovu srostlé asi 1 cm.

Výskyt v Evropě: Pobaltské státy, evropská část Ruska, Bělorusko, Ukrajina, Polsko, jz. Finsko, stř. Švédsko včetně Gotlandu, Maďarsko, Rumunsko, Bulharsko, ČR, Německo – okolí Řezna a Mnichova, Slovensko – Záhorie, Spišská kotlina, Slovenský kras.

Subsp. *teklae* (Zamels) Zamels

Popis: Květy jsou modro-fialové. Listy mají hodně úkrojků, jejich počet je okolo 30-90. Úkrojky jsou širší a kopinaté, šířky 1-4 mm.

Výskyt: Polsko, Litva, Lotyšsko.

Subsp. *multifida* (Pritzel) Zamels

Popis: Květy jsou modro-fialové, nebo růžové a uvnitř bílé. Listy s hodně úkrojky, poslední segment je zhruba stejně dlouhý jako řapík. Lístky většinou zřetelně řapíkaté.

Úkrojků je 30-80, jsou úzké a kopinaté, šířky asi 0,4 cm. Listy se objevují před květy. Listeny v brakteolu jsou srostlé asi po 0,75 cm své délky.

Výskyt: Rusko - Sibiř.

Subsp. *flavescens* (Zucc) Zamels

Popis: Květy jsou žluté, zřídka slabě fialově. Listy s velkým množstvím úkrojků, 30-80 úkrojků, širokých okolo 0,3 cm. Listy se objevují během kvetení. Listeny srůstají asi v délce 1,3 cm.

Výskyt: Rusko (severní Asie).

4.4. Ekologie a cenologie

Koniklec otevřený roste na stanovištích se suchým, hl. subkontinentálním klimatem, nejčastěji na severních a západních expozičních. Je tak součástí ekosystémů suchých až mírně vlhkých travinných porostů, ale i lemů a světlin lesů, křovin a reliktních borů. Nejčastěji se jedná o společenstva řádu Festucetalia valesiaca, svazů Koelerio-Phleion phleoidis a Erico-Pinion, méně často pak řádu Trifolio arvensi-Festucetalia ovinae. Půdy na stanovištích koniklece otevřeného bývají hlubší, humusovité, odvápněné i mělké minerální (písčité nebo kamenité), především typu ranker. Matečné horniny půd bývají silikátové nebo neutrální, např. trachyt, nefelinit, čedič, břidlice, vápnité pískovce, ale i váté písky nebo odvápněné půdy na vápenci. Půdy jsou tak většinou kyselé s pH mezi 4 a 6 (Skalický 1997). Druh vykazuje výraznou symbiózu s mykorhizními houbami, jak dokládá studie Moora (2004). Pro získání informací o vlivu mykorhizy byl proveden experiment srovnávající reakci semen *P. patens* a *P. pratensis* na výsev do půdy se spory arbuskulárních mykorhizních hub. Pokus prokázal, že oba druhy konikleců rostou výrazně lépe v zemině se spory těchto hub, než v prostředí bez spor. Ukázal se však rozdíl mezi reakcí druhů na inokulum travnatých společenstev a inokulum lesa. Zatímco *P. patens* rostl trochu lépe na inokulu travnatých společenstev, *P. pratensis* rostl výrazně lépe na lesním inokulu. Autoři experimentu na základě výsledků vytvořili hypotézu, podle které jsou koniklece jako druhy narušených stanovišť obzvláště v prvních fázích života velmi závislé na mykorhizní symbióze. Druhové složení spor mykorhizních hub pak může vysvětlit distribuci konikleců, která je i přes jejich podobné ekologické nároky značně rozdílná, neboť *P. pratensis* je v Estonsku více rozšířen (Moora 2004).

4.5. Ohrožení

Počet i velikost populací koniklece otevřeného se u nás dlouhodobě výrazně snižuje. Během posledních dvaceti let zanikly všechny málo početné populace a početné populace velmi zesláblly (Macková 2004). Populací je u nás tedy dnes už jen zlomek, a to celkem 17 s přibližně 3 tisíci rostlin (Ondříček et Turoňová 2010). Ústup druhu se ale netýká jen České republiky, ale je hlášen i z Německa, Estonska, Finska a Polska. V Německu existuje v současné době poslední populace *P. patens*, na které bylo v roce 2003 provedeno sčítání a výsledky porovnány s mapováním z roku 1991. Bylo zaznamenáno značné snížení populace z 27000 jedinců v roce 1991 na 9700 jedinců v roce 2003 (Röder et Kiehl 2006). V Polsku byla v roce 2010 publikována studie porovnávající současný stav *P. patens* se záznamy z minulosti. Do studie bylo zahrnuto 16 přírodních rezervací v severo-východní části země, kde se nachází většina popsanych lokalit *P. patens* v Polsku. Studie zjistila vymizení *P. patens* v 11 přírodních rezervacích zahrnutých do studie a na 5 zbývajících pak zdokumentovala

pokles většinou na několika jedinců (Juśkiewicz-Swaczyna 2010). V Estonsku je nyní zaznamenáno 27 izolovaných populací, u některých z nich se počet jedinců dále snižuje (Pilt et Kuk 2002). Ve Finsku je situace obdobná, dochází k celkovému snižování populace, které pokračuje i na některých místech, kde se provádí management na ochranu druhu (Uotila 1996). U ostatních států nejsou dostupné přesné informace, ale předpokládá se podobný stav, obzvláště na hranicích areálu (Ondříček et Turoňová 2010).

Koniklec otevřený je ohrožen zejména změnou hospodaření na lokalitách, nesnese zarůstání a zastínění, ať už je způsobené sukcesí, invazními rostlinami, hnojením, spadem dusíkatých látek nebo zalesněním. Koniklec je otevřený je velmi dekorativní druh, a proto je ohrožován i trháním nebo vyrýpáváním pro zahradnické účely. V České republice byl zaznamenán značný okus mladých květů zvěří (Juśkiewicz-Swaczyna 2010; Kubát 1997).

Koniklec otevřený je řazen podle IUCN do skupiny kriticky ohrožených druhů (C1). Druh je zařazen do seznamu příslušejícího k „Nařízení Evropské unie číslo 92/43/EEC/1992: dodatku 2“ („Regulation of the European Community No. 92/43/EEC/1992: Appendix 2“), a v „Bernské úmluvě z roku 1998, části A, dodatku 1“ („Bern Convention, from 1998, part A, Appendix 1“).

Druh je chráněn legislativou České republiky dle vyhlášky 395/92 Sb. jako kriticky ohrožený (Procházka 2001).

Způsoby managementu na ohrožených lokalitách v ČR jsou různé (Čeřovský 1999; Lorber 1997). Nejčastěji je na lokalitách koniklece snaha zabránit zarůstání, a proto jsou místa sečena a jsou zde vyřezávány křoviny (Humnický vrch, Líšnice, Bělá). Vzácně se uplatňuje pastva, například na Holém vrchu. Na lokalitách přímo ohrožených vyrýpáváním lidmi se rostliny oplocují a označují (lokalita v Podkrušnohoří u Krásné Lípy). Na lokalitách s hodně sníženou populací se druh dosévá nebo dosazuje, což se ovšem potýká s mnoha problémy, jako je rychle se snižující klíčivost semen, špatné přežívání semenáčků atd.

4.6. Výskyt v ČR (Skalický 1997; Kubát 1997)

Česká republika je blízko západní hranicí areálu koniklece otevřeného. Lokality se nacházejí v Českém termofytiku a Českomoravském mezofytiku v kolinním a suprakolinním stupni.

P. patens byl hlášen z: Doupovských hor, Českého středohoří (Lounsko – labského středohoří, Milešovského středohoří, Lovečského středohoří), Podkrušnohorské pánve, středního Povltaví, Dolního Povltaví, Pražské kotliny, Dolního Pojizeří, Ralsko-bezděžské tabule a Českého krasu-

5. *Pulsatilla pratensis* (koniklec luční)

Koniklec luční byl popsán Millerem v roce 1768 v Gard. Dict., ed. 8, no 4. Synonyma jsou *P. nigricans* Störck, *Anemone pratensis* L. nebo *Pulsatilla Zimmermannii* Soó, *Pulsatilla montana* Reichenb., *Anemone intermedia* Schultes.

5.1. Popis

V ČR se vyskytuje pouze subsp. *bohemica*, tedy koniklec luční český. Koniklec luční český má vícehlavý oddenek, který bývá téměř kolmo dolů rostoucí. Barva oddenku je černá a přizemní šupiny na něm vyrůstající jsou vejčitého tvaru. Bělavé chlupy pokrývají všechny vegetativní a některé generativní části rostliny. Stonek je za květu vysoký 8-15 cm, v horní části nící, za plodu se prodlužuje do výšky 22 cm, a je vzpřímený. Listy jsou většinou v době květu dobře vyvinuté, vyrůstají z přizemní růžice v počtu 3-5. Bazální listy řapíkaté, trojdílné s úzkými laloky. Listy jsou řapíkaté. Řapíky jsou zakřivené, později odstálé nebo šikmé, kratší nebo stejně dlouhé jako čepel. Čepel bývá vejčitá až vejčitě kopinatá. V mládí má čepel asi 30 úkrojků, později je jednou až dvakrát lichozpeřená s 3-5 jařmy s lístky, popřípadě lístečky jednou až dvakrát peřenosečnými. Úkrojků je 100-200, podlouhlého tvaru, špičatých, širokých 1-3 mm.

Brakteol má 4-31 úkrojků, které jsou dlouhé 0,9-2,8 cm, široké zhruba 6 mm (úkrojky listenů a listů jsou téměř stejně široké). Květy jsou válcovitého tvaru, při dokvétání až zvonkovité, skloněné dolů (nící). Okvětní lístky jsou tvaru eliptického, 15-30 mm dlouhé, 7-12 mm široké. Na vrcholu se okvětní lístky ohýbají zpět směrem ven, 3 vnější jsou někdy kratší než 3 vnitřní. Průměr květů je 3-4 cm. Jejich barva je od tmavě fialové po světle fialovou, vzácně až žlutou nebo bílou. Tyčinky jsou dlouhé jako tři čtvrtiny okvětních lístků. Čnělky jsou sytě fialové, chlupaté, na konci lysé. Nažky mívají přívěšek o délce 4-4,5 cm. Období květu koniklece lučního českého je v březnu až v květnu (Skalický 1997).

Druh je diploidní, $2n=16$ (IPCN) i když existuje i údaj o počtu chromozómů 32 (Skalický 1997).

5.2. Variabilita

V ČR se vyskytují se objevují rostliny tří morfotypů.

První typ roste v Čechách a vyznačuje se nícími květy i za plného květu a jejich tvar je válcovitý. Listeny jsou uzavřeně zvonkovité, mající většinou 20 úkrojků.

Druhý typ se vyskytuje na jižní Moravě, u Vídně a u Bratislavy, má mírně skloněné květy, které jsou zvonkovité. Listeny mívají průměrně 26 úkrojků. První a druhý typ mají klinální charakter, postupně tedy přechází jeden ve druhý.

Třetím typem je varieta *albida* (Domin) Skalický, která roste v okolí Bělé pod Bezdězem. Jejím stanovištěm jsou místní bory. Vyznačuje se menšími listy, jež se plně vyvíjí až po odkvětu. Okvětní lístky jsou podlouhlé až eliptické, vně světle fialové, uvnitř bělavé až světle fialové, zřídka nažloutlé až narůžovělé. Čnělky bývají světle fialové, na konci mírně zakřivené.

Popsáno je také mnoho individuálních odchylek, které jsou někdy považovány za formy či variety, například var. *angustisecta* Čelak., var. *latisecta* Čelak., var. *ochroleuca* Tausch, var. *alba* Tausch.

5.3. Taxonomické členění (Moore 1964, Aichel et Schwegler 1957, Skalický 1997)

Subsp. *bohemica* Skalický

Popis: Listy s mnoha úkrojky, stonek vystoupavý. Květy jsou válcovité, stárnutím až zvonkovité, skloněné dolů (nící). Na vrcholu se okvětní lístky ohýbají zpět směrem ven, 3 vnější mohou být kratší než 3 vnitřní. Barva květu je od tmavě fialové po světle fialovou, vzácně může být i žlutá nebo bílá.

Výskyt: střední Evropa (východní Německo, Rakousko, ČR, SR, Polsko, Maďarsko).

Subsp. *ucrainica* Ugr.

Výskyt: Ukrajina a střední Povolží

Subsp. *hungarica* Soó

Výskyt: Maďarsko a jižní Slovensko

Subsp. *pratensis*

Popis: Listy a stonek podobné subsp. *bohemica*. Květ je nící, tvaru cylindrického až úzkého uzavřeného zvonku, horní část okvětních lístků se otáčí směrem ven. Barva květu je světle fialová až fialová, zřídka žlutavá nebo růžová, vnitřní lístky jsou často bílé, žluté nebo růžové.

Výskyt: Pobaltí

5.4. Ekologie a cenologie

Koniklec luční český roste na xerothermních trávnících, skalách, okrajích lesa, vzácně potom na písčinách a ve světlých lesích. Nejčastěji je součástí společenstev svazu Koelerio-Phleion phleoidis a řádu Festucetalia valesiaca, ale můžeme ho najít i ve společenstvech třídy Sedo-Scleranthetea, vzácněji ve společenstvech svazů Quercion pubescenti-petraeae, Erico-Pinion, Geranion sanguinei. Půdy na stanovištích jsou suché a vysychavé, mělké, minerální – hlavně kamenité a písčité. Matečná hornina bývá vápnitá nebo silikátová.

5.5. Ochrana

Populace koniklece lučního českého se sice významně snižuje, ale nehrozí mu bezprostřední nebezpečí. Ohrožen je zejména zástavbou a zarůstáním.

Druh je řazen podle IUCN do skupiny rostlin C2, jedná se tedy o silně ohrožený druh. Je chráněn vyhláškou 395/1992 (Macková 2004, Procházka 2001).

5.6. Výskyt v ČR

Dvě oddělené arely, česká (severní, střední a východní Čechy) a moravská (jižní Morava). Roste v planárním až suprakolinním stupni, těžiště v termofytiku a přilehlém mezofytiku

Rozšíření v ČR:

Čechy – Doupovské hory, Střední Poohří, Podkrušnohorská pánev, České středohoří - Lounsko-labské středohoří, Milešovské středohoří, Lovečské středohoří, Středočeská tabule, Český kras, Dolní Povltaví, Střední Povltaví, Pražská plošina, Dolní Pojizeří, Pardubické Polabí, Rakovnická kotlina, Křivoklátsko, Příbramsko Podbrdsko, Střední Povltaví, Ralsko-bezděžská tabule, Železné hory, Českodubská pahorkatina, Kutnohorská pahorkatina, Morava – Znojensko-brněnská pahorkatina, Jihomoravské úvaly, Jihomoravská pahorkatina, moravské podhoří Vysočiny.

6. Hybridizace mezi *P. patens* a *P. pratensis*

Ze všech našich zástupců rodu *Pulsatilla* je u nás nejvíce rozšířen *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Naším druhým nejčastějším koniklecem je pak *P. patens*. Oba tyto druhy vytváří hybridy s jinými druhy konikleců. Druh *Pulsatilla pratensis* tvoří hybridy např. s *P. vernalis*, *P. vulgaris*, *P. grandis*, *P. halleri*, *P. zimmermanni*. Druh *P. patens* se kříží např. s *P. vernalis*, *P. montana*. *P. patens* subsp. *patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica* mají na našem území značně podobné ekologické nároky, a tak se u nás jejich arely rozšíření do značné míry překrývají. Vytváří proto na našem území vůbec nejčastěji udávaného hybrida konikleců, *Pulsatilla ×hackelii* (Skalický 1997; Hegi et Weber 1975).

Kříženec druhů *P. patens* a *P. pratensis* byl však popsán několikrát, např. jako *Pulsatilla ×hybrida* Mikan, *Pulsatilla ×bohemica* Pritz. Několik popisů se týká jiných poddruhů rodičovských druhů. Byly popsány pod následujícími jmény, jakkoliv prioritní by i pro ně mělo být označení *Pulsatilla ×hackelii*:

Pulsatilla ×vilnensis Gorski

Jedná se o křížence *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *pratensis*. Popsán byl Gorskim roku 1826. Na rozdíl od *P. pratensis* má méně listů, které jsou širší. Květy jsou vzpřímenější, fialové. Několikrát byl udáván z Pruska a Slezska a též potvrzen experimentálně (Hegi et Weber 1975).

Pulsatilla ×borosiana J. Wagner

Rodiči jsou *P. patens* a *P. pratensis* var. *zichyi*. Hybrid roste Maďarsku (Moore 1964).

Vliv hybrida *Pulsatilla ×hackelii* na rodičovské populace

Oba rodiče hybrida *Pulsatilla ×hackelii* jsou chráněné vzácné druhy, jejichž populace se stále snižují. Areály výskytu těchto druhů se z velké části překrývají, a proto se často vyskytují na lokalitách společně. Hybrid tedy může populace rodičů významně ovlivňovat.

6.1. *Pulsatilla ×hackelii* Pohl

Poprvé byl popsán jako *Pulsatilla hackelli* Pohlem roku 1815 z vrchu Hradiště u Litoměřic v Českém středohoří (Holub, 1978)

Jedná se o křížence mezi *P. patens* subsp. *patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*.

6.1.2. Popis

Pulsatilla ×hackelii se vyznačuje intermediární podobou vůči rodičovským druhům. Jednotný popis tohoto křížence nelze podat, neboť existují jeho různé popisy od různých autorů, které naznačují, že vzhled tohoto hybrida je značně variabilní.

Uvádím několik existujících nejúplnějších popisů.

Čelakovský (1865): Morfologické znaky jsou intermediární vzhledem k rodičům, obzvláště vzhled květu, u některých jedinců jsou však některé znaky více podobné *P. patens*, u jiných *P. pratensis*. Ve většině případů je rostlina celkově vyšší a slabší, podobně jako *P. pratensis*.

Velikost květů je vyloženě intermediární k velikosti květů rodičů. Barva květů je fialovo-modrá, což je také intermediární vůči lila a purpurově fialové barvě rodičů.

(Skalický 1997): Rostliny mají červenofialové, pouze mírně níčí květy. Listy široké, podobné *P. pratensis*, ale na rozdíl od *P. pratensis* zkrácené vřeteno mezi jařmy lístků. Kříženec je sterilní.

Holub (1978): Zabývá se rozeznáváním sterilních rostlin. Listy obou rodičovských druhů se odlišují především v počtu, šířce úkrojků a poměru šířky k délce. Listy křížence bývají ve většině případů podobnější listům druhu *P. patens*, jsou tedy dlanitě dělené do širokých úkrojků. Tvar listů křížence je v podstatě okrouhlý, protože stejně jako u *P. patens* jeho délka téměř odpovídá jeho šířce. Podstatným rozdílem oproti *P. patens* je růst jařem opravdu blízko sebe a umístění posledního jařma blízko vrcholu listu.

Presl (1819): Kříženec uveden pod nesprávným označením *P. halleri*.

Popis: Listy pernaté, ostře vykrajované, složené ze tří částí. Květ vzpřímený.

6.1.3. Fertilita

Na fertilitu hybrida existují různé názory. Za sterilního ho považuje Skalický (1997). Holub (1978) uvádí, že semena křížence nejsou schopna vyklíčit, a proto vzniká pouze stále novým a novým křížením nebo vegetativním rozmnožováním. Vznik křížence při experimentálním křížení a jeho pěstování uvádí např. Hegi et Weber (1975). Některé nálezy pak vytváří spekulace, že by se mohly existovat potomci vzniklí introgresí.

6.1.4. Karyologie

Počet chromozómů u křížence není znám. Očekávaný počet je 16, protože oba rodičovské druhy mají 16 chromozómů.

6.1.5. Výskyt

Byl několikrát udáván z Čech, Slezska i Pruska, Slovenska (Moore 1964; Goliašová 1982).

Hlášené lokality na Slovensku: (Goliašová 1982)

Plavecký Štvrtok, Lozorno (Valenta 1939), Šajdíkové Humence (Scheffer 1923)

Hlášené lokality v ČR: (Skalický 1997, Kubát 1997)

České středohoří:

Lounské středohoří: Tobiášův vrch, Třešňovec, Dobřice, Skalka,

Labské středohoří: Hradiště, Kamýk, Hlinná, Holý vrch, Zálezly, Mariánský vrch

Lovečské středohoří: Stříbrníky

Střední Povltaví: Závist u Zbraslavi

Doupovské hory: Dubový vrch, Humnický vrch, Prostřední vrch u Kadaně, mezi Maleší a Jindřichovem

Ralsko-bezděžská tabule: Bělá pod Bezdězem

7. Pilotní cytometrické výsledky

Úvod

Druhy *P. patens* a *P. pratensis*, jejichž hybridizace je tématem mé práce, mají stejný počet chromozómů, ale rozdílnou velikost genomu: u *P. patens* je průměrná 2C-hodnota 11,5 pg DNA, zatímco *P. pratensis* vykazuje průměrnou 2C-hodnotu 13,8 pg (Suda nepubl.).

Proto je pravděpodobné, že velikost genomu jejich křížence bude intermediární vzhledem k velikostem genomů rodičů (Loureiro et al. 2010).

Metodika

Na základě srovnání historických i současných popsanych lokalit *P. patens*, *P. pratensis* a *Pulsatilla ×hackelii* byly vybrány lokality, kde je výskyt křížence nejpravděpodobnější.

Jedná se o lokality, kde byl v minulosti udáván *Pulsatilla ×hackelii* a stále se tam vyskytují oba rodičovské druhy, a dále pak ty, kde se společně vyskytují oba rodičovské druhy.

Současně byla ještě vytipována jedna kontrolní lokalita, kde roste pouze populace běžnějšího *P. pratensis*.

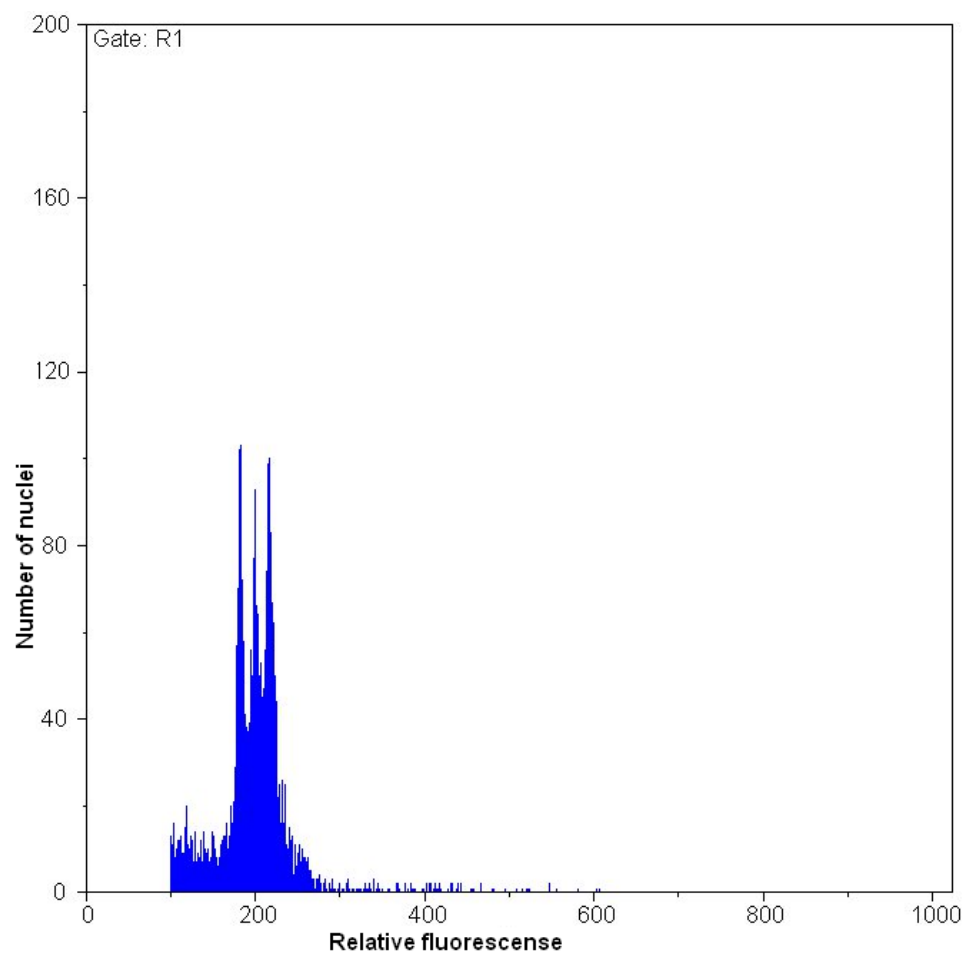
Na vytipovaných lokalitách byl proveden sběr rostlinného materiálu. Následně byla provedena analýza tohoto materiálu metodou průtokové cytometrie.

Postup analýzy: V Petriho misce obsahující 1 ml pufru Otto I byl žiletkou rozsekán jeden nebo několik vzorků (vzorek je přibližně 0,5 cm² listu koniklece) společně s odpovídajícím množstvím listu *Pisum sativum* (standard měření, 2C = 8,84 pg). Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes nylonovou síť a bylo k ní přidáno 100 µl pufru Otto I. Po promíchání bylo přidáno 1 ml roztoku obsahující pufr Otto II, propidium jodid (50 µg/ml), RNAsu (50 µg/ml) a β-merkapt ethanol (2µ/ml). Vzorek byl znovu promíchán a poté analyzován na průtokovém cytometru Partec CyFlow.

Výsledky

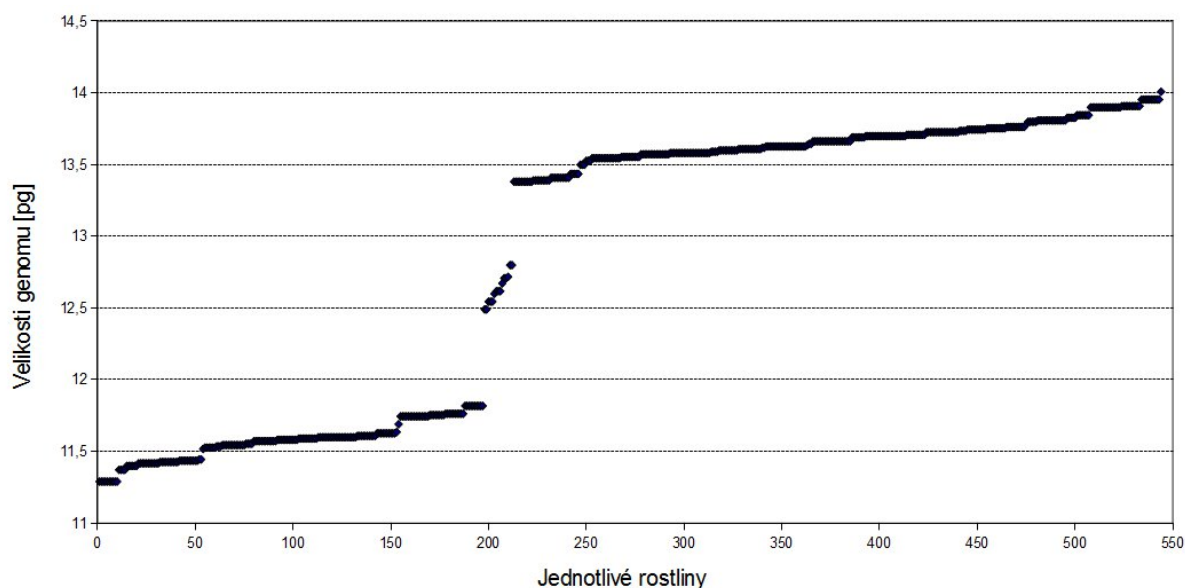
Při analýze bylo nalezeno několik jedinců s velikostí genomu intermediární vzhledem k *P. patens* a *P. pratensis*.

Jednoznačné rozlišení velikosti genomů *P. patens*, *P. pratensis* a *Pulsatilla ×hackelii*



Obr. 1: Společná cytometrická analýza druhů *P. patens*, *P. pratensis* a jejich křížence *Pulsatilla ×hackelii*. První pík odpovídá *P. patens*, druhý hybridnímu jedinci *Pulsatilla ×hackelii* a třetí pík představuje *P. pratensis*.

Rozlišení všech zkoumaných rostlin na základě velikostí genomu



Obr. 2: Graf znázorňující velikosti genomu všech prověřovaných rostlin.

Diskuse

Analýza byla provedena na čtyřech vytipovaných lokalitách. Vzhledem k tomu, že výskyt křížence byl v minulosti celkově udáván na sedmi lokalitách, byla prověřena více jak polovina historických lokalit. Navíc se tyto čtyři lokality dle zvolených kritérií (hlášený výskyt *Pulsatilla ×hackelii*, současný výskyt obou druhů *P. patens* a *P. pratensis*) jeví jako nejdůležitější.

Byla zjištěna intermediární hodnota velikosti genomu vzhledem k velikostem genomů *P. patens* a *P. pratensis*. Tato hodnota (průměrná $2C = 12,6$ pg) byla nalezena u 16 rostlin. Rozptyl v hodnotách velikosti genomu existuje, ale je omezený a pohybuje se jen v rámci rozmezí hodnot charakteristických pro rodičovské druhy a křížence; velikosti rodičovských i intermediárního genomu jsou dobře ohraničené.

Zjištěnou intermediární velikost genomu proto můžeme považovat za potvrzení existence křížence *Pulsatilla ×hackelii*.

Provedené analýzy nepotvrdily existenci zpětných kříženců. Vzhledem k omezenému počtu analyzovaných jedinců však takovou možnost nelze ani vyloučit.

Kříženec byl nalezena u rostlin na třech lokalitách ze čtyř prověřovaných, a to v různé početnosti. Důvodů pro různou početnost křížence může být několik a musí být prověřeny. Může se jednat například o různou velikost populací rodičovských druhů, o různý poměr rodičovských populací nebo různou míru disturbance na lokalitách.

Závěr

Existence hybrida *Pulsatilla ×hackelii*, druhů *P. patens* a *P. pratensis*, byla na karyologické úrovni (velikost genomu) potvrzena.

8. Otázky pro navazující diplomovou práci

Ve své diplomové práci se budu zabývat hybridizací v rodu *Pulsatilla*, a to především mezi druhy *Pulsatilla patens* a *Pulsatilla pratensis*. Budu sledovat dynamiku tohoto křížení a mým cílem bude pochopit procesy, které v těchto smíšených populacích probíhají, a jejich dopad na populace chráněných rodičovských druhů.

Při řešení diplomové práce si budu klást především tyto otázky:

1) Jaká je struktura smíšených populací druhů (zastoupení rodičovských druhů a jejich křížence)?

Provést screening velikosti genomu všech vytipovaných populací, cytometrické techniky budou v případě potřeby doplněny molekulárními metodami.

2) Jakými morfologickými znaky se hybridní jedinci vyznačují?

Pomocí klasické i geometrické morfometriky se pokusit najít charakteristické morfologické znaky kříženců.

3) Jaký je směr hybridizace?

Použít variabilitu chloroplastové DNA pro určení mateřského druhu u všech hybridních jedinců.

4) Jaká je fertilita hybrida?

Zjistit fertilitu pylu pomocí vitálního barvení pylu. Klíčivost semen ověřit jejich pokusným vyséváním.

9. Metodické přístupy

Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je založena na měření optických vlastností jednotlivých částic (např. buněk, buněčných jader nebo chromozómů), které jsou unášeny úzkým proudem kapaliny skrz laserový paprsek (Shapiro 2004). Tato metoda má řadu výhod, mezi něž patří jednoduchý postup přípravy vzorků, vysoká přesnost, umožnění analýzy směsných vzorků, nedestruktivnost a nízké náklady (Doležel et Bartoš 2005).

Jedná se o metodu využívanou pro různé účely širokým spektrem vědních disciplín, jako je imunologie, genetika, botanika, zoologie, ekologie, evoluční biologie (Kron et al. 2007).

Molekulární markery

Stanovení genetické diverzity, směru hybridizace, nezávislé ověření hybridního původu vybraných jedinců a hledání případných zpětných hybridů bude provedeno molekulárními metodami stanovujícími polymorfismus na úrovni celého genomu (zejména AFLP). Mnohé techniky studující genetickou diverzitu vychází z metody PCR, tedy řízené polymerace DNA. Jedná se například o metodu AFLP (zjišťující polymorfismus v délce amplifikovaných fragmentů), RFLP (ověřující polymorfismus v délce restrikčních fragmentů) a další. Metody se využívají například pro studium fylogeneze, variability nebo hybridizace (ncbi).

Morfometrika

Morfometrické postupy jsou využívány k objektivnímu popisu fenotypu organismů. S použitím matematických a statistických postupů pomáhá morfometrika najít charakteristickou podobu morfologických znaků druhů. Pomáhá i k objasnění vývoje těchto znaků.

Tato metoda se používá při výzkumu v evoluční biologii, botanice, zoologii, ekologii, medicíně i dalších biologických oborech (Neustupa 2006).

10. Použitá literatura

- Aichele, D.; Schwegler H. W. Die Taxonomie der Gattung Pulsatilla. *Feddes Rep. spec. nov. regni vegetabilis*. 1957, 60, 1-230
- Anderson, E. Introgressive hybridization. *Biol. Rev.* 1953, 3, 280-307
- Anderson, E., Stebbins, G. L. Jr. Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution*. 1954, 8, 378-388
- Arnold, M. L.; Hodges S. A. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Tree*. 1995, 2, 110
- Arnold, M. L. Natural Hybridization and Evolution. *Oxford Univ. Press*. 1997, 23, 237-261
- Avise, J. C. Cytonuclear genetic signatures of hybridization phenomena: rationale, utility and empirical examples from fishes and other aquatic animals. *Rev. Fis Biol. Fish.* 2001, 10, 253-263
- Barton, N. H.; Hewitt, G. M. Analysis of hybrid zones. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1995, 16, 113-148
- Bennett, M. D.; Leitch, I. J. Plant Genome Size Research: A Field In Focus. *Annals of Botany*. 2005, 95, 1-6
- Bennetzen, J. L. et al. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann. Bot.* 2005, 95, 127-132
- Briggs, D.; Walters, S. M. Proměnlivost a evoluce rostlin. Olomouc: Vydavatelství UP, 2001, 531 s.
- Burgman, M. A. et al. *Risk assessment in conservation biology*. Londýn: Chapman and Hall, 328 s. 1993 Převzato z: (Levin 1996)
- Coyne, J. A.; Orr, H. A. Speciation. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 82 s. Převzato z: (Mallet 2005)
- Čelakovský L. Ist *Pulsatilla hackelii* Pohl ein Bastard? *Lotos*. 1865, 15, 8-11
- Čeřovský, J. et al. Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů ČR a SR. Vyšší rostliny. Bratislava: Příroda, 1999. 453 s.
- Darwin, Ch. *O vzniku druhů přírodním výběrem*. Praha: Academia, 2007 (1859). 584 s.
- Doležel J.; Bartoš J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.* 2005, 95, 99-110
- Ellstrand, N. C. et al. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996, 93, 5090-5093
- Flegr, J. Zamrzlá evoluce aneb je to jinak pane Darwin. Praha: Academia, 2006. 328 s.
- Flegr, J. *Úvod do evoluční biologie*. Praha: Academia, 2007. 544 s.
- Genovart, M. Natural hybridization and conservation. *Biodiv. Cons.* 2009, 18, 1435-1439
- Grant, V. *The Origin of Adaptations*. USA: Columbia University Press, 1963. 606 s. citace převzata z:
- Grant, P. R.; Grant, B. R. Hybridization of bird species. *Science*. 1992, 256, 193-197
- Gregory, T. R. Genome size and developmental complexity. *Kluwer Acad. Pub.* 2001, 115, 131-146
- Gregory, T. R. Genome size and developmental complexity. *Genetica*. 2002, 115, 131-146
- Gregory, T. R. The C-value Enigma in Plants and Animals: A Review of Parallels and an Appeal for Partnership. *Annals of Botany*. 2005, 95, 133-146
- Gregory, T. R. Macroevolution, hierarchy theory, and the C-value enigma. *Paleobiology*. 2004, 30, 179-202
- Greilhuber, J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Ann. Bot.* 2005, 95, 91-98 Převzato z: (Loureiro 2010)
- Goliašová K. (ed.) *Flóra Slovenska 3*, Bratislava: Veda, 1982. 605s.
- Hegi G., Weber H. *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*, Band III, Teil 2. Berlin: Payer, 1975. 504 s.

- Heiser, C.B. et al. The north american sunflowers (*Helianthus*). *Mem. Torrey Club*. 1969, 22, 1-218 Převzato z: (Arnold et Hodges 1995)
- Heiser, C. B. Natural hybridization with particular reference to introgression. *Evolution*. 1947, 1, 249-262 1947 Převzato z : (Arnold et Hodges 1995)
- Holub, J. *Pulsatilla ×hackelii* Pohl. Severočes. Přír. 1978, 8-9, 132-135
- Husband, B.C. Constraints on polyploid evolution: a test of the minority cytotype exclusion principle. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 2000, 217-223
- IPCN, Index of Plant Chromosome Numbers, <http://www.tropicos.org/>
- Javůrková - Jarolímová, V.; Měsíček, J. *List of Chromosome Numbers of the Czech Vascular Plants*. Praha: Academia, 1992. 144 s.
- Juśkiewicz–Swaczyna, B. Distribution and abundance of *Pulsatilla patens* populations in nature reserves in north – eastern Poland. *Polish journal of natural sciences*. 2010, 25, 376-386
- Kalendar, R. et al. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimate divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000, 97, 6603-6607
- Krause, K. Zur Taxonomischen Gliederung, Verbreitung und Genetik der *Pulsatilla halleri* (All.) Willd. *Bot. Jb.* 1958, 78, 1-68
- Kron, P. et al. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2007, 38, 847-876
- Kubát, K. *Pulsatilla patens* (L.) Mill. V České republice. *Severočes. Přír.* 1997, 30, 5-10
- Kubát, K. *Klíč ke květeně České republiky*. Praha: Academia, 2002. 927 s.
- Leitch, A. R.; Leitch, I. J. Genomic Plasticity and Diversity of Polyploidy Plants. *Science*. 2008, 320, 481-483 et leitch 2011
- Levin, D.A. et al. Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conserv. Biol.* 1996, 10, 10-16
- Lindell T. Breeding systems and crossing experiments in *Anemone patens* and in the *Anemone pulsatilla* group. *Nord Journal of Botany*. 1998, 18, 549-561
- Lorber, J. Historie jedné lokality, *Pulsatilla patens* u Krásné Lípy, okr. Chomutov. *Severoč. Přír.*, 1997, 30, 1-4
- Loureiro, J. et al. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia*. 2010, 82, 3-21
- Lysak, M. A. et al. The Dynamic Ups and downs of Genome Size Evolution in Brassicaceae. *Mol. Biol. Evol.*, 2009, 26, 85-98
- Macková, I.; Kubát, K. *Zvláště chráněné a ohrožené druhy rostlin Ústecka*. Praha: Academia, 2004. 224 s.
- Mallet, J. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*. 2005, 20, 5
- Mallet, J. Hybrid speciation. *Nature*. 2007, 446, 279-283
- Mallet J., Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2008, 363, 2971-2986
- Mayr, E., Systematics and the origin of species. New York: Columbia University Press. 1942. Převzato z: (Mallet 2008)
- Moora, M. et al. Native arbuscular mycorrhizal fungal communities differentially influence the seedlings performance of rare and common *Pulsatilla* species. *Functional Ecology*. 2004, 18, 554-562
- Moore, D., *Flora Europaea I*. Cambridge: Cambridge University Press. 1964. 486 s.
- Moore, W. S., An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Q. Rev. Biol.* 1977, 52, 263-277
- Neustupa, J. Co to je geometrická morfometrika aneb morfologie znovu na scéně. *Živa*. 2006, 2, 54-58
- NCBI, National Centre for Bioinformation, USA, www.ncbi.nlm.nih.gov

- Ondráček, Č.; Turoňová, D. Metodika monitoringu cévnatých rostlin významných z hlediska legislativy EU, *Pulsatilla patens* (L.) Mill. – koniklec otevřený, Pilt, I.; Kukk, Ü. *Pulsatilla patens* and *Pulsatilla pratensis* (Ranunculaceae) in Estonia: distribution and ecology. Proceedings of the Estonian Academy of Sciences: Biology, Ecology. 2002, 51, 242-256
- Presl, J. S.; Presl, C. B. *Flora čechica. Kwětena česká*. Praha: In com. apud. J. G. Calve, 1819. 230 s.
- Procházka, F. Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). Praha: Příroda, 2001. 1-166
- Rieseberg L.H. Hybrid origins of plant species. *Annu. Rev. Ecol.* 1997, 28, 359-389
- Rhymer J.M.; Simberloff D. Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1996, 27, 83-100
- Rauh-Loewerton, A. Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. *Mol. Phyl. And Evol.* 2003, 29, 396-409
- Robertson, A. et al. Hybridization and polyploidy as drivers of continuing evolution and speciation in *Sorbus*. *Mol. Ecol.* 2010, 19, 1675-1690
- Röder, D.; Kiehl, K. Population structure and population dynamic of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. in relation to vegetation characteristics. *Flora*. 2006, 201, 499-507
- Seehausen, O. Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science*. 1997, 227, 1808-1811
- Seehausen, O. Hybridization and adaptive radiation. *Trends Ecol. Evol.* 2004, 19, 198-207
- Shapiro, H. *Practical flow cytometry*. New York: Wiley-Liss, 2004. 681 s. Převzato z: (Loureiro 2010)
- Soltis, D. E.; Soltis, P. S. Molecular Data and the Dynamic Nature of Polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1993, 12, 243-273
- Soltis, D.E.; Soltis, P.S. The dynamic nature of polyploid genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, 92, 8089-8091
- Soltis, D. E. et Soltis, P. S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Tree*. 1997, 14, 348-353
- Soltis, D. E. et al. Polyploidy and angiosperm diversification. *Am. Jour. of Bot.* 2009, 96, 336-348
- Skalický, V., Dostál, J. *Květena České republiky*, 1, Praha: Academia, 1997. 557 s.
- Swift, H. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1950, 36, 643-654 Převzato z: (Loureiro 2010)
- Templeton, A. R. Mechanisms of speciation – a population genetic approach. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1981, 12, 23-48
- Thompson, J.N. et al. Plant polyploidy and insect/plant interactions. *Am. Nat.* 1997, 150, 730-743
- Turelli, M. et al. Theory and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 2001, 16, 330-343
- Ungerer, M. C. et al. Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998, 95, 11757-11762
- Uotila, P. Decline of *Anemone patens* (Ranunculaceae) in Finland. *Acta universitatia Upsalinsia*. 1996, 31, 205-210
- Vision, T. et al. The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science*. 2000, 290, 2114-2117
- Wolf, D. E. et al. Predicting the Risk of Extinction through Hybridization. *Conserv. Biol.* 2000, 15, 1039-1053
- Zimmermann, W. Genetische Untersuchungen an *Pulsatilla*. *Flora*. 1935, 133, 417-792
- Zimmermann, W. Zur Taxonomie der Gattung *Pulsatilla* Miller I. *Feddes Rep. spec. Nov. Regni vegetabilis*. 1958, 61, 94-100
- Zimmermann, W. Koniklece ČSSR a jejich zvláštnosti. *Ochrana přírody*. 1964, 19, 44-47

11. Přílohy

Obr. 3: *Pulsatilla patens*



Foto: Suda J

Obr. 4: *Pulsatilla pratensis*



Foto: Suda J.

Obr. 5: *Pulsatilla ×hackelii*.



Foto: Suda J.