

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky

Studijní program: Biologie (bakalářské studium)

Studijní obor: Biologie



Bakalářská práce

**Evoluční historie polyploidního komplexu *Galium***

***pumilum* agg.**

**Evolutionary history of polyploid complex *Galium pumilum* agg.**

**Adam Knotek**

**Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Filip Kolář**

**Praha 2012**

## **Prohlášení**

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

V Praze dne \_\_\_\_\_ 2012

.....

podpis

## **Poděkování**

Můj největší dík patří mému školiteli Filipu Kolářovi. Za jeho trpělivost, dobrou náladu, výborné připomínky a rady a za poskytnutí různých studijních materiálů, které bych sám nikdy nenašel. Další dík patří obyvatelům růžové cytolaborky, kteří mi byli vždy nápomocni. Děkuji kamarádům z herbáře cévnatých rostlin za odbornou i jinou podporu v okamžicích, kdy nic nedávalo smysl. Děkuji Martinovi Hanzlovi za rady a za spolupráci při objevování svízele sudetského v Krkonoších. Anně Potůčkové a Jaroslavovi Horáčkovi za pomoc při korekturách. Kateřině Kmecové za číslování stránek. Děkuji všem přátelům, kteří to se mnou vydrželi. A samozřejmě děkuji také svým rodičům, kteří mi umožnili studovat to, co mě zajímá a baví.

## Abstract

The thesis summarizes current knowledge about the polyploid complex of *Galium pumilum* agg. in Central Europe. This work should provide a theoretical background for a following diploma thesis. Most species of the aggregate are difficult to be determined due to considerable morphological variability and a complex evolutionary history probably involving recurrent polyploidization and hybridization events. Currently, new molecular methods are changing our opinion on the taxonomical classification within the group. Except for *G. pumilum* MURRAY, the other species show rather disjunctive distribution and are found on relict habitats. This could be caused by postglacial migration and subsequent area fragmentation. Most of the previous studies focused on *Galium* were published by Friedrich Ehrendorfer, who since the 50th defined division of the complex on the basis of chorological, karyological and morphological data. With new molecular methods, his hypotheses are now exposed to verification.

*Galium sudeticum* TAUSCH. represents an enigmatic and vulnerable taxon of the Czech flora, that raises various interesting questions from both evolutionary and conservation points of view. It has a remarkable disjunct distribution in the Giant mountains (Krkonoše) and in one serpentine area in western Bohemia (Slavkovský les). The close relationship between the mountain and serpentine populations has not yet been conclusively proven and it is possible that each of them belongs to different closely related species such as *G. valdepilosum* H. BRAUN and *G. anisophyllum* VILL. Final conclusions, however, could not be drawn solely on the basis of differences in habitat preferences and morphological plasticity. For this reason, my thesis also contains a brief overview of molecular methods that I want to use for resolving the position of *G. sudeticum* in my following diploma thesis.

Key words: *Galium sudeticum*, *G. pumilum* agg., hybridization, polyploidization, reticulate evolution

## Abstrakt

Práce shrnuje dosavadní poznatky o polyploidním komplexu *Galium pumilum* agg. ve střední Evropě a vytváří tak teoretický základ pro navazující diplomovou práci. Většina druhů v rámci agregátu je obtížně determinovatelná, kvůli značné morfologické variabilitě, a pravděpodobně i komplikované evoluční historii zahrnující (opakované) polyploidizace i hybridizace, což vedlo ke značně nejisté taxonomii v rámci tohoto komplexu. Názory na taxonomické členění se v současnosti mění také díky přispění molekulárních metod. Druhy tohoto agregátu se v ČR vyskytují převážně na reliktních stanovištích v ostrůvkovitých areálech, které zřejmě představují pozůstatky poledových migrací a následných fragmentací příhodných biotopů (výjimkou je pouze vysoký polyploid *G. pumilum* MURRAY). Studium rodu *Galium* včetně detailnějších studií zaměřených na problematiku *G. pumilum* agg., se nejvíce zabývá Friedrich Ehrendorfer, který již od 50. let definoval na základě chorologie, morfologie a karyologie členění komplexu a jehož teorie mohou být dnes, ve světle nových metod, vystaveny ověřování.

*Galium sudeticum* TAUSCH je velmi zajímavý a v ČR zákonem chráněný taxon české flóry, který vyvolává otázky z hlediska evolučního i z hlediska ochrany. Vykazuje pozoruhodný disjunktní výskyt v Krkonoších a na hadcích v západních Čechách (Slavkovský les). Příbuzenské vztahy jeho horských a hadcových populací však doposud nebyly přesvědčivě vyřešeny a je možné, že se jedná o příslušníky odlišných blízce příbuzných taxonů jako je *G. valdepiosum* H. BRAUN a *G. anisophyllum* VILL. K vyvození takovýchto závěrů nám však rozdíly ve stanovištních vazbách a morfologické plasticitě nestačí. Proto také v práci uvádím krátký přehled molekulárních metod, kterými bych chtěl postavení druhu *G. sudeticum* v navazující diplomové práci vyřešit.

Klíčová slova: *Galium sudeticum*, *G. pumilum* agg., hybridizace, polyploidizace, retikulátní evoluce

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| Obsah .....   | 1  |
| 1. Úvod .....   | 2  |
| 2. Stručná charakteristika rodu <i>Galium</i> L. – svízel .....                                   | 3  |
| 2.1 Taxonomické zařazení .....  | 3  |
| 2.2. Popis rodu <i>Galium</i> .....   | 3  |
| 2.3. Vnitřní členění rodu <i>Galium</i> .....   | 4  |
| 3. Popis sekce <i>Leptogalium</i> LANGE .....   | 4  |
| 4. Charakteristiky středoevropských zástupců sekce <i>Leptogalium</i> .....                       | 4  |
| 4.1. <i>Galium anisophyllum</i> VILL. – svízel nestejnolistý .....                                | 4  |
| 4.2. <i>Galium austriacum</i> JACQ. – svízel rakouský .....                                       | 5  |
| 4.3. <i>Galium sudeticum</i> TAUSCH. – svízel sudetský .....                                      | 7  |
| 4.4. <i>Galium pumilum</i> MURRAY. – svízel nízký .....   | 8  |
| 4.5. <i>Galium valdepilosum</i> H. BRAUN. – svízel moravský .....                                 | 9  |
| 4.6. <i>Galium cracoviense</i> EHRENDF. ....  | 10 |
| 5. Srovnávací tabulka znaků .....   | 12 |
| 6. Mikroevoluční mechanismy účastníci se na diferenciaci komplexu <i>Galium pumilum</i> agg. .... | 13 |
| 6.1. Hybridizace .....  | 13 |
| 6.2. Polyploidizace .....   | 14 |
| 6.3. Alopatriká diferenciacie .....   | 16 |
| 7. Evoluční historie komplexu .....   | 16 |
| 7.1. Evoluční historie celého komplexu a jeho šíření v poledové době .....                        | 16 |
| 7.2. Taxonomické zařazení populací <i>Galium sudeticum</i> .....                                  | 19 |
| 8. Otázky pro navazující diplomovou práci .....   | 21 |
| 9. Metody v diplomové práci .....   | 22 |
| 9.1. Průtoková cytometrie (FCM) .....   | 22 |
| 9.2. Dominantní (binární) molekulární marker - AFLP .....   | 23 |
| 9.3. Sekvenování DNA .....  | 24 |
| 9.4. Morfometrická analýza .....  | 26 |
| 10. Závěr .....   | 26 |
| 11. Seznam literatury .....   | 27 |
| 12. Přílohy .....   | 32 |

## 1. Úvod

Cílem této práce je shrnout základní poznatky a historii středoevropských druhů patřících do agregátu *Galium pumilum* sekce *Leptogalium*, kam se u nás v České Republice řadí druhy *G. austriacum* JACQ., *G. pumilum* MURRAY., *G. sudeticum* TAUSCH a *G. valdepilosum* H. BRAUN. Vzhledem k zaměření na středoevropský region, jsem ještě přidal druh *G. anisophyllum* VILL., které se nejbližší vyskytuje např. na Slovensku a v Rakousku a polské endemické *G. cracoviense* Ehrend. Někdy rozlišované taxony *G. bellatulum* KLOKOV a neplatně publikované *G. fatrense* EHREND. ET ŠÍPOŠOVÁ (Šípošová 1987) v práci považuji za cytotypy *G. anisophyllum*. Pojímáním druhů vycházím z Květeny ČR (Štěpánková 2000) a Flora Europaea (Ehrendorfer 1976).

Studiem rodu se nejvíce zabývá Ehrendorfer (např. 1949, 1956, 1958, 1960, 1962, 1996) a u nás v poslední době např. Krahulcová a Štěpánková (Krahulcová & Štěpánková 1998, Štěpánková 1997). Rostliny z tohoto agregátu jsou nenápadné a v přírodě snadno přehlédnutelné. Jejich determinace je obtížná a často dochází k záměnám (Štěpánková 2000). Vhodné znaky jsou velmi drobné a variabilní, včetně znaků na generativních orgánech, což je důsledek jejich blízké příbuznosti a opakující se kombinace hybridizace a polyploidizace, spojené s vysokou fenotypickou plasticitou. Je zde přítomna také značná cytotypová variabilita. Jednotlivé cytotypy jsou často geograficky diferencované. Jedná se o poměrně mladý polyploidní komplex (Ehrendorfer 1980), který v posledních 10 tisících letech prošel bouřlivým vývojem a jeho vývoj není ani zdaleka u konce.

S výjimkou *G. pumilum* se jedná o glaciální relikty s disjunktivním rozšířením, převážně vázané na otevřená stanoviště se sníženou konkurencí ostatních druhů rostlin. Zvláštním případem je *G. sudeticum*, vykazující pozoruhodný disjunktivní výskyt v sudetských pohořích a na hadcových lokalitách. Příbuznost jeho horských a hadcových populací však doposud nebyla přesvědčivě doložená a je možné, že se jedná i o příslušníky odlišných taxonů. Tuto nesmírně zajímavou problematiku probírám ve zvláštní kapitole a chtěl bych se jí dále zabývat v navazující diplomové práci za pomoci moderních biosystematických metod, jejichž přehled shrnuji v další kapitole této práce.

## 2. Stručná charakteristika rodu *Galium* L. – svízel

Rod *Galium* zahrnuje asi 400 bylinných druhů rostlin, které se vyskytují po celém světě s centrem rozšíření v mírném pásu. Nejvíce prozkoumanou a největší druhovou diverzitu vykazuje rod v Evropě (145 druhů) a v Turecku (101 druhů) (Mabberley 2008). V následujícím textu se budu zabývat charakteristikou těch druhů svízelů ze sekce *Leptogalium*, které se vyskytují v České Republice a v okolních státech. Taktéž popisy rodu či dalších podjednotek se vztahují především na území střední Evropy.

### 2.1 Taxonomické zařazení

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Magnoliopsida

Řád: Gentianales

Čeleď: *Rubiaceae*

Podčeleď: *Rubioideae*

Rod: *Galium*

### 2.2. Popis rodu *Galium*

Jedná se o jednoleté nebo vytrvalé byliny s bohatě větvenými kořeny a oddenky. Lodyhy jsou přímé až vystoupavé, většinou větvené, někdy se sterilními přízemními prýty. Listy přisedlé, palisty jsou tvarem a velikostí nerozlišitelné od listů a často pomnožené, spolu s listy tvoří 4-12 četné přesleny. Květy v chudokvětých vrcholících skládající úžlabní nebo terminální laty nebo vidlany jsou často bohatě větvené. Listeny v horní části květenství jsou drobné, úzce eliptické, kratší než květní stopky. Květní stopky jsou delší než semeníky a bez listenců. Květy oboupohlavné, někdy postranní květy vrcholíku jednopohlavné. Kalich chybí nebo je silně redukovaný. Koruna 4(-5) četná, kolovitá nebo nálevkovitá, bílá, nazelenalá nebo žlutá, korunní trubka zřetelná, nanejvýš stejně dlouhá jako korunní cípy. Korunní cípy jsou ploché nebo miskovitě prohnuté. Čnělky 2, srostlé nanejvýš do 2/3, blizna kulovitá. Plodem je dvounažka, která se za zralosti rozpadá ve 2 merikarpia se suchým perikarpem. Jedná se o entomogamní rostliny. Může docházet k autogamii. Semena se šíří především pomocí zoochorie (Štěpánková 2000).



### 2.3. Vnitřní členění rodu *Galium*

Rod *Galium* se u nás dělí do celkem osmi sekcí (Štěpánková 2000): *Platygalium*, *Hylaea*, *Trachygalium*, *Aparinoides*, *Galium*, *Leiogalium*, *Leptogalium* a *Kolgyda*. Vnitřní členění rodu v poslední době doznává změn a je cílem intenzivního výzkumu. Nicméně sekce *Leptogalium*, která je objektem našeho zájmu, se i v nových molekulárních studiích jeví jako monofyletická (Ehrendorfer unpubl.).

### 3. Popis sekce *Leptogalium* LANGE

Zahrnuje vytrvalé byliny s řídkými nebo hustými trsy, s množstvím sterilních přizemních prýtů a s tenkými bohatě větvenými oddenky a kořeny. Lodyha dorůstá do 30 cm délky, je čtyřhranná, lysá nebo chlupatá, občas se zpětnými háčky. Listy s palisty jsou v 6-10 četných přeslenech, jednožilné, zakončené krátkou chrupavčitou osinkou či sklovitým chlupem. Květenství spíše rozvolněné, vejčité, pyramidální nebo chocholičnaté s chocholičnatými dílčími květenstvími a s koncovými větévkami obvykle bez listenů. Koruna kolovitá, barva fialová, růžová, nazelenalá, nažloutlá nebo bílá. Korunní cípy zašpičatělé nebo hrotité. Plodem je dvounažka se suchým perikarpem. Povrch perikarpu může být hladký nebo s hrbolky, velmi vzácně chlupatý, nikdy s přichytnými háčky.

Centrum rozšíření je hlavně v Evropě a středozeří, kde roste od nížin až po arko- alpínské oblasti, především jako součást nejrůznějších travních a otevřených lesních společenstev (Ehrendorfer 1976).

Základním chromozomovým číslem této sekce je  $x=11$  (Krendl 1993).

### 4. Charakteristiky střeoevropských zástupců sekce *Leptogalium*

Do charakteristik jsem záměrně nezahrnul *G. saxatile*, které se od ostatních zástupců v sekci *Leptogalium* na území ČR dobře rozlišuje a v našem studiu nepředstavuje žádný problém.

#### 4.1. *Galium anisophyllum* VILL. – svízel nestejnolistý

##### 4.1.1. Popis druhu

Vytrvalé, trsnaté byliny, 5-15(-25) cm vysoké. Oddenky tenké, kuželovité. Lodyhy vzpřímené, občas poléhavé, čtyřhranné, smáčkuté, holé nebo chlupaté, na bázi mohou být červené. Internodia jsou v dolní třetině kratší nebo stejně dlouhé jako listy. Ve střední části 1-2x delší než listy. Listy v přeslenech po 5-8 (-9), obkopinaté nebo kopinaté, náhle se zužující do chrupavčité osinky, 5-15(-20) mm dlouhé, 1-2(-3) mm široké, světle zelené, hladké, jen vzácně lesklé či se zřetelnými chloupky. Okraje listů jsou podvinuté. Sušením listy hnědnou nebo černají. Květenství latovitá, bohatě větvená.

Květní stopky 1-2 mm dlouhé, koruna žlutobílá, 2-4 mm v průměru. Korunní cípy tupé. Plod 1,5-2 mm velký, za zralosti tmavohnědý až černý, hladký nebo jemně bradavičnatý (Zahradníková 1985, Ehrendorfer 1976).

#### **4.1.2. Stanovištní vazby**

Jedná se o horský druh, který roste na sutích, skalních výchozech, chudších bazických vápenitých půdách (zejména 2x a 4x) nebo mírně kyselých čedičích či silikátech (8x). Většinou roste nad hranicí lesa v otevřených travnatých nebo málo zapojených porostech v subalpinském až alpinském stupni (Krendl 1993, Ehrendorfer in prep.). Jednotlivé cytotypy tohoto polyploidního komplexu se mohou svými stanovištními nároky a ekologií výrazně lišit, ale morfologicky jsou jen těžko rozlišitelné (Ehrendorfer 1976).

#### **4.1.3. Rozšíření**

Vyskytuje se v pohořích v jižní a centrální Evropě od Cévennes ve Francii přes Alpy až do Bulharska a na sever přes Karpaty až na jih Polska (Ehrendorfer 1976). Na Slovensku se vyskytuje v Tatrách a v centrálních Karpatech kromě Pienin (Zahradníková 1985). Výskyt v ČR je sporný, viz v kapitole „7.2. Taxonomické zařazení populací *Galium sudeticum*.“

#### **4.1.4. Karyologie**

U druhu *Galium anisophyllum* se vyskytují di-, tetra-, hexa-, okto- i dekaploidní ( $2n=22; 44; 66; 88; 110$ ) jedinci. Tetraploidní jedinci jsou nejrozšířenější. Diploidní populace se vyskytují jen ostrůvkovitě v Alpách, slovenských i rumunských Karpatech a na Balkáně, vždy jako součást většího teraploidního rozšíření (Ehrendorfer 1958). Krendl (1993) potom přesně dokládá diploidy z pohoří Brent v Itálii. V Alpách je situace nejsložitější, dokládají se zde di-, tetra-, hexa- a oktoploidní jedinci, v Apeninách se pak vyskytují jen dekaploidi (Ehrendorfer 1958). Ze slovenských Tater udává Šípošová (1987) di- a teraploidní populace (a vzácně i triploidního křížence). V Polsku se vyskytují jen tetraploidi (Piotrowicz 1958).

#### **4.1.5. Ohrožení a ochrana druhu**

Není nijak chráněn ani ohrožen

## **4.2. *Galium austriacum* JACQ. – svízel rakouský**

### **4.2.1. Popis druhu**

Vytrvalé, řídce trsnaté byliny s tenkými bohatě větvenými kořeny a oddenky, často se sterilními přízemními prýty. Lodyhy přímé (5-)15-25(-30) cm vysoké, větvené, čtyřhranné, lysé, hladké, na bázi mohou být načervenalé. Prostřední lodyžní články jsou 1,3-2,5krát delší než listy. Listy s palisty jsou v 5-8 (-9) četných přeslenech, čárkovitě podlouhlé nebo čárkovitě kopinaté, (10-)13-18(-20) mm

dlouhé, (1,0-)1,4-1-7(-2,0) mm široké, zašpičatělé, se zřetelnou chrupavčitou osinkou, lysé, lesklé, na okrajích podvinuté, hladké. Květenství latovité, bohatě větvené, vyrůstající často téměř z báze trsu, v obrysu široce vejčité, obvykle zaujímá polovinu délky celé rostliny. Květní stopky jsou 1,3 mm dlouhé. Koruna kolovitá, (1,6)2-3 mm v průměru, bílá, členěná téměř až k bázi v miskovitě prohnuté, tupě špičaté korunní cípy. Merikarpia ledvinovitá, 1,2-1,5 mm dlouhá, 0,9-1-1 široká, tmavě hnědá, lesklá, na povrchu s poduškovitými, pravidelně uspořádanými hrbolky, lysá (Štěpánková 2000). Někteří jedinci mohou mít lodyhy či listy řídce chlupaté (Ehrendorfer 1976).

#### **4.2.2. Rozšíření**

Druh se vyskytuje ve východních Alpách, v Rakousku a na severu Slovinska. Dále se vyskytuje v okolí Vídně, v západních Karpatech na Slovensku a na severozápadě Maďarska (Ehrendorfer 1962, 1976). Na Slovensku jej konkrétně můžeme najít především v nižších pohořích západního Slovenska (Malé Karpaty, Považský Inovec, Strážovské vrchy) a ve Slovenském ráji. Ojedinělé údaje jsou známy z vysokých Karpat (Šípošová 1987). Z České Republiky je udáván pouze z Pavlovských vrchů (Štěpánková 2000).

#### **4.2.3. Stanovištní vazby**

Druh je vázán na vápencová či dolomitová bradla, výslunné xerofytní skalnaté stráně či sutě se slabě zapojeným bylinným porostem. Preferuje mělké, vysychavé a minerálně bohaté půdy (Štěpánková 2000). Vyskytuje se v submontáním až subalpinském stupni (Zahradníková 1985). Tetraploidní populace v Rakousku rostou také na hadci. Diploidi na hadci nalezeni nebyli (Krahulcová & Štěpánková 1998).

#### **4.2.4. Karyologie**

U druhu *Galium austriacum* se vyskytují di- a tetraploidní ( $2n=22; 44$ ) jedinci. Na území ČR se nachází pouze tetraploidi a to na lokalitě Pavlovské vrchy na jižní Moravě (Krahulcová & Štěpánková 1998). Dalšími údaji z území Slovenska dokládá Šípošová (1987) taktéž pouze tetraploidní jedince. Rozsáhlé karyologické studie popisující podrobnou distribuci di- i tetraploidů v Rakousku prováděl Ehrendorfer (1949, 1962). Krendl (1993) jeho lokality ověřil a dokládá diploidní populace z Dolního Rakouska a ze SZ Maďarska (oblast Veszprém).

#### **4.2.5. Ohrožení a ochrana druhu**

V červeném seznamu ČR (Procházka 2001) je zapsán jako druh kriticky ohrožený (C1). V mezinárodním seznamu IUCN (Bilz et al. 2011) není uveden.

### 4.3. *Galium sudeticum* TAUSCH. – svízel sudetský

#### 4.3.1. Popis druhu

Vytrvalé, trsnaté byliny s tenkými kořeny a krátkými oddenky, s četnými sterilními prýty. Lodyhy přímé nebo vystoupavvé, (7-)10-15(-20) cm vysoké, větvené, čtyřhranné, lysé, hladké. Prostřední lodyžní články jsou 1,5-2krát delší než listy. Listy s palisty jsou uspořádané v 5-6(-8)četných přeslenech, úzce obkopinaté, (12-) 15-18 (-20) mm dlouhé, 1,2-1,6 mm široké, v průřezu spíše tlustší, krátce hrotité, na okraji lysé nebo vzácně s roztroušenými, k bázi listu směřujícími osténkatými chlupy, tmavě zelené, sušením tmavnoucí, lesklé, lysé, na bázi lodyhy brzy opadají. Květenství je latovité, v obrysu široce až protáhle vejčité, květní stopky 1,4-1,8 mm dlouhé. Koruna kolovitá, 2,5-3,4 mm v průměru, bílá, téměř až k bázi členěná v ploché korunní cípy. Semeník se zřetelnými plochými hrbolky na povrchu, čnělky srostlé do 1/3 až 1/2. Merikarpia ledvinovitá, 1,4-1,7 mm dlouhá a 0,8-1,0 mm široká, tmavě hnědá až hnědočerná, na povrchu s pravidelně uspořádanými polokulovitými hrbolky. (Ehrendorfer 1976, Štěpánková 2000). **Pozn.:** *G. sudeticum* se v současnosti vyskytuje ve dvou izolovaných oblastech a to v Krkonoších a ve Slavkovském lese, které v morfologii liší. Popis z Květeny ČR (Štěpánková 2000) se patrně vztahuje na populace v Krkonoších (Tájek 2003).

#### 4.3.2. Rozšíření

Dle Květeny ČR je areál *G. sudeticum* rozdělen na 3 izolované arely. Krkonoše, Jeseníky a Slavkovský les (Štěpánková 2000). V Hrubém Jeseníku ve Velké Kotlině je ale v současnosti nezvěstný. Ve Slavkovském lese je dokládán výhradně z hadcových výchozů (např. lokality Vlček a Křížky). V Krkonoších se nachází na české straně v Kotelních jámách, Čertově zahrádce na Rudníku a na polské straně v Malé (Krauhlová & Štěpánková 1998) a Velké sněžné jámě (Kucowa 1962). Příslušnost hadcových populací ze Slavkovského lesa k tomuto taxonu však není zcela zřejmá a je cílem našeho výzkumu, blíže v kapitole „7.2. Taxonomické zařazení populací *Galium sudeticum*.“

#### 4.3.3. Stanovištní vazby

Krkonošské populace rostou na sutích či výchozech bazických hornin, jako součást rozvolněných krátkostébelných subalpínských trávníků v na humus chudých, sušších, mělkých a minerálně bohatých, zásaditých až neutrálních půdách (Krauhlová & Štěpánková 1998, Štěpánková 2000). Populace ze Slavkovského lesa rostou na hadcových skalkách, ale i v jejich bezprostředním okolí mezi trsy *Molinia caerulea* (Tájek 2003).

#### 4.4.4. Karyologie

*Galium sudeticum* je tetraploid ( $2n=44$ ) (Krauhlová & Štěpánková 1998, Piotrowicz 1958).

#### 4.4.5. Ohrožení a ochrana druhu

V červeném seznamu ČR je zapsán jako druh kriticky ohrožený (C1). Je také ze zákona, dle vyhlášky MŽP 395/1992 Sb., chráněn jako kriticky ohrožený druh (§1) (Procházka 2001). V mezinárodním seznamu IUCN je uveden jako druh ohrožený (VU = C3) (Bilz et al. 2011). Je uveden ve Směrnicih Rady evropských společenství číslo 92/43/EHS o ochraně volných stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin, zkráceně NATURA 2000 (Rybka 2004).

### 4.4. *Galium pumilum* MURRAY. – svízel nízký

#### 4.4.1. Popis druhu

Vytrvalé, řídké trsnaté byliny s bohatě větvenými, tenkými dlouhými kořeny a oddenky, obvykle se sterilními prýty. Lodyhy chabé, vystoupavé, řidčeji poléhavé, (15-)20-40(-50) cm vysoké, čtyřhranné, na hranách často s drobnými odstátými papilami drsné, na plochách lysé nebo v dolní části krátce pýřité, na bázi nikdy červené, spodní lodyžní články velmi krátké, prostřední lodyžní články 3-5krát delší než listy. Listy a palisty uspořádané v 6-8četných přeslenech, úzce obkopynaté, (10-)12-18(-20) mm dlouhé, 0,8-1,2 mm široké, zašpičatělé, zakončené chrupavčitou osinkou, na okrajích mírně podvinuté, s roztroušenými, obvykle k vrcholu směřujícími osténkatými chlupy, na obou stranách lysé nebo roztroušeně chlupaté, na bázi lodyhy opadají. Květenství latovité, bohatě větvené, válcovité až prodlouženě vejčité, obvykle zaujímá 1/2 až 2/3 délky celé rostliny. Květní stopky jsou 2-5 mm dlouhé. Koruna kolovitá, 3-4(-5) mm v průměru, bílá, členěná téměř až k bázi v ploché, špičaté korunní cípy. Čnělky jsou srostlé do 1/3 až 1/2. Merikarpia ledvinovitá, 1,3-1,8 mm dlouhá, 0,7-0,9 mm široká, tmavě hnědá, lesklá, lysá, na povrchu s plochými poduškovitými hrbolky (Štěpánková 2000, Ehrendorfer 1976). Ochlupení spodní poloviny rostliny je variabilní od hustě chlupatých až po zcela lysé jedince. Stejně tak můžeme nalézt rostliny drsné a zcela hladké (Štěpánková 2000).

#### 4.4.2. Rozšíření

Středoevropský druh s celkovým rozšířením od Francie a jižní Anglie na sever po střední Německo, jižní Polsko a Českou republiku. Dále jižní Rakousko, sever Itálie, Maďarsko, Srbsko a Rumunsko. Synantropně roste na jihu Švédska. Izolovaná arela v Kaliningradské oblasti. V ČR častý po celém území kromě nejvyšších poloh (Štěpánková 2000). Na Slovensku jen ojediněle Štiavnické vrchy a Slovenské rudohorie (Šípošová 1987).

#### 4.4.3. Stanovištní vazby

Obývá subxerofilní travnaté stráně, rozvolněné porosty světlých lesů a jejich lemů, zvláště doubrav, dubohabřin a borů na teplých skalnatých stráních a horních hranách údolí. Dále osidluje osluněné sutě, staré lomy, paseky a meze, také krátkostébelné sušší louky, lada a pastviny, často na druhotných stanovištích (kamenné hráze rybníků, železniční náspy, valy). Roste na sušších,

neutrálních až kyselých, minerálně chudých i bohatých půdách různé hloubky i zrnitosti, často silně skeletovitých, na silikátech a hadcích většinou chudých na vápník (Štěpánková 2000).

#### 4.4.4. Karyologie

U druhu *Galium pumilum* se vyskytují hexa- a oktoploidní ( $2n=66; 88$ ) jedinci. Oktoploidní jedinci jsou rozšířenější. Hexaploidní jedince dokládá Šípošová (1987) ze Slovenska a Ehrendorfer (1949) z Dolního Rakouska. Krendl (1993) další hexaploidní populace nenalezl. V ČR se vyskytují pouze oktoploidi. Na hadci byl nalezen i jeden dodekaploid ( $2n=12x=$  ca. 132) vzniklý zřejmě křížením se sympatrickým tetraploidním *G. valdepilosum* (Krauhlová & Štěpánková 1998).

#### 4.4.5. Ohrožení a ochrana druhu

Není nijak chráněn ani ohrožen.

### 4.5. *Galium valdepilosum* H. BRAUN. – svízel moravský

#### 4.5.1. Popis druhu

Vytrvalé, řídce trsnaté byliny s tenkými, bohatě větvenými kořeny a oddenky, obvykle s četnými sterilními prýty. Lodyhy chabé, poléhavé nebo vystoupavé, (10-)15-30 cm vysoké, čtyřhranné, bohatě větvené, obvykle alespoň v dolní části krátce pýřité a načervenalé, spodní lodyžní články krátké, prostřední lodyžní články 2-4krát delší než listy. Listy s palisty uspořádané v 6-7(-8)četných přeslenech, obkopynaté až úzce kopinaté, (8-)10-20(-25) mm dlouhé, (0,8-)1,0-1,8(-2,0) mm široké, v průřezu tenké, zašpičatělé, zakončené chrupavčitou osinkou, lysé nebo krátce pýřité, na okrajích podvinuté, hladké nebo s roztroušenými, obvykle nazpět směřujícími osténkatými chlupy. Květenství latovité, bohatě větvené, v obrysu široce obvejčité, často zaujímá až 3/4 délky celé rostliny. Květní stopky 2-5 mm dlouhé. Koruna kolovitá, 2-3(-4) mm v průměru, bílá, až k bázi členěná v ploché, špičaté korunní cípy. Čnělky srostlé do 1/4-1/3. Merikarpia ledvinovitá, 1,0-1,4(-1,7) mm dlouhá, 0,7-0,9 mm široká, tmavohnědá, lesklá, na povrchu s nápadnými kuželovitými hrbolky. Tetraploidní jedinci jsou statnější a v dolní polovině nápadně chlupatější. Existují dva morfologicky odlišné cytotypy ( $2x$  a  $4x$ ), přičemž diploidi se liší menšími rozměry merikarpíí, koruny a listů. Tetraploidní rostliny jsou v dolní polovině nápadně chlupatější (Ehrendorfer 1976, Štěpánková 1997, 2000).

#### 4.5.2. Rozšíření

Středoevropský endemit s těžištěm rozšíření ve střední Evropě. Vyskytuje se disjunktivně od jihovýchodního Německa (Česká Republika, již. Polsko, severní Rakousko) až po západní Ukrajinu s izolovanou arelou *G. valdepilosum* subs. *slesvicense* v Dánsku (Ehrendorfer 1976, in prep.). V Čechách i na Moravě roste v teplejších oblastech, většinou ve výrazněji modelovaných územích, v nižším stupni pahorkatin a vrchovin. Zřetelná je kumulace v českém termofytiku, další výskyty jsou

např. v okolí Prahy. V moravském předhůří Českomoravské vrchoviny je vázán na kaňonovitá údolí řek a potoků. V mezofytiku jen vzácně, výjimkou je údolí Vltavy (Štěpánková 2000).

#### 4.5.3. Stanovištní vazby

Teplomilný druh. Suché kamenité a skalnaté stráně, osluněné sutě, světlé lesy (duby, dubohabřiny, bory). Vyskytuje se také v okolí ventarol. Je to slabý kompetitor, který roste na mělkých, vysychavých, silně skeletovitých, mírně zásaditých až mírně kyselých, minerálně bohatých, ale na živiny chudých půdách (Štěpánková 2000). Oba cytotypy se vyskytují na hadcových i nehadcových lokalitách, na silikátových i bazických horninách (zřídka však na vápencích) (Krahulcová & Štěpánková 1998).

#### 4.5.4. Karyologie

*Galium valdepilosum* sestává z di- a tetraploidního ( $2n=22; 44$ ) cytotypu. Areály těchto cytotypů se z větší části nepřekrývají. Diploidi se vyskytují převážně na jihozápadě Moravy a dále na jih směrem do severního Rakouska. Tetraploidní populace rostou vzácně na Moravě (severně od výskytu diploidů), v Čechách, ve východním Bavorsku a v pohoří Harz (Ehrendorfer 1949, 1956, 1962; Krahulcová & Štěpánková 1998). Z jižního Polska jsou udávány diploidní i tetraploidní rostliny (Ehrendorfer 1962, Kučowa & Madalski 1964, Piotrowicz 1958). V Dánsku se vyskytuje *G. valdepilosum subsp. slesvicense*, která je také tetraploidní (Ehrendorfer 1975).

#### 4.5.5. Ohrožení a ochrana druhu

V červeném seznamu ČR (Procházka 2001) je zapsán jako druh ohrožený (C3).

### 4.6. *Galium cracoviense* EHRENDF.

#### 4.6.1. Popis druhu

Vytrvalé, trsnaté byliny s množstvím sterilních prýtlů. Lodyhy (4-)6-15(-20) cm vysoké, vystoupavé, štíhlé, v průměru asi 0,6 mm, čtyřhranné, hladké. Prostřední lodyžní články asi 2,5 cm dlouhé, 1,5-2,5x delší než listy. Listy s palisty v přeslenech po (5-)6-7, kopinaté, (2-)3-8(-10) mm dlouhé, (0,5-)0,75-1,0(-1,5) mm široké, zužující se v ostrou špičku, na okrajích roztroušeně chlupaté. Listy ve spodní části lodyhy opadají. Květenství volné, chudší. Květní stopky (0,6-)1,0-1,5(-1,8) mm dlouhé, listeny (1,25)1,5-1,75 mm dlouhé. Koruna 2,0-3,5 mm v průměru, korunní plátky bílé, tupé. Plodem je dvounažka, 0,5-0,75(-1,0) mm široká, 1,0-1,25(-1,5) mm dlouhá, na povrchu s poměrně vysokými bradavičkami (Ehrendorfer 1976, Kučowa 1962).

#### 4.6.2. Rozšíření

Polský endemit. Roste na několika skalách v okolí vesnice Olsztyn u města Częstochowa (např. 50°46'N, 19°16'E) na jihu Polska (Kučowa 1962, Cieśląg & Szeląg 2010).

#### **4.6.3. Stanovištní vazby**

Roste na vápencových skalkách, kde je dostatek světla ve výšce asi 300 m. n. m. (Kucowa 1962).

#### **4.6.4. Karyologie**

*Galium cracoviense* je diploid ( $2n=22$ ) (Cieśląg & Szeląg 2010, Piotrowicz 1958).

#### **4.6.5. Ohrožení a ochrana druhu**

V červené knize Polska (Mirek 1993) je zapsán jako druh vzácný (R=C4). V mezinárodním seznamu IUCN je uveden jako druh ohrožený (VU = C3) (Bilz et al. 2011).



## 5. Srovnávací tabulka znaků

Pro přehlednost dodávám srovnávací tabulku znaků (Tab. č. 1) s uvedenými zdroji, které jsem, pokud to bylo možné, přepsal doslova. Popis povrchu merikarpíí může být značně subjektivní. Předpokládám, že popis u *G. anisophyllum* „jemně bradavičnatý“ (Zahradníková 1985) se bude blížit spíše pojmu „s poduškovitými hrbolky“, jak se užívá v Květeně ČR (Štěpánková 2000). V tabulce je uvedeno více znaků, ale pro určování jsou důležité především povrch merikarpíí (*G. pumilum*/*G. valdepilosum*), délka květní stopky, odění lodyhy a listů, okraje listů a celkový habitus rostliny. Například tvar listů je velmi variabilní a mění se podle toho, na jaké části lodyhy roste od vejčitého až po čárkovitý (Noack 1983), proto jej neuvádím vůbec.

|                           | Zahradníková 1985                           | Štěpánková 2000  |   |  |   | Kucowa 1962  |
|---------------------------|---|--|---|--|---|--|
| Druh →                    | <i>G. anisophyllum</i> (4x)                 | <i>G. sudeticum</i>  | <i>G. valdepilosum</i>  | <i>G. pumilum</i>  | <i>G. austriacum</i>                                      | <i>G. cracoviense</i>  |
| Znak ↓                    |   |  |   |  |   |  |
| Výška rostliny            | 5-15 cm                                     | 10-15 cm   | 15-30 cm  | 20-40 cm   | 15-25 cm  | 5-10 cm  |
| Lodyha                    | Přímá, vzácně poléhavá, lysá nebo chlupatá  | Přímá nebo vystoupavá, lysá, hladká  | Chabá, vystoupavá nebo poléhavá, alespoň v dolní části chlupatá                           | Chabá, vystoupavá, řidčeji poléhavá na hranách s odstálými papilkami, drsná                            | Přímá, lysá, hladká                                       | Štíhlá, vystoupavá, hladká.  |
| Prostřední lodyžní články | 1,0-2,0x delší než listy                    | 1,5-2,0x delší než listy   | 2-4x delší než listy  | 3-5x delší než listy   | 1,3-2,5x delší než listy                                  | 1,5-2-5x delší než listy   |
| Přesleny                  | 5-8(-9) četné                               | 5-6(-8) četné  | 6-7(-8) četné   | 6-8 četné  | 5-8(-9) četné   | (5-)6-7 četné  |
| Listy                     | Hladké, hrotité, nelesklé, okraje podvinuté | Lysé, hladké, lesklé, krátce hrotité, na okraji ploché, vzácně s k bázi směřujícími chlupy | Lysé nebo krátce pýřité s osinkou, na okraji podvinuté s nazpět obrácenými chlupy, drsné, | Lysé nebo roztr. chlupaté, drsné, s osinkou, na okraji s k vrcholu směřujícími chlupy, mírně podvinuté | Lysé, lesklé, na okraji podvinuté, s chrupavčitou osinkou | Lysé, na okrajích roztr. chlupaté, kopinaté, zužující se v ostrou špičku |
| Květní stopky             | 1-2 mm                                      | 1,4-1,8 mm   | 2-5 mm  | 2-5 mm   | 1-3 mm  | 1-1,5 mm   |
| Šířka koruny              | 2-4 mm                                      | 2,5-3,4 mm   | 2-3 mm  | 3-4 mm   | 2-3 mm  | 2-3,5 mm   |
| Povrch merikarpíí         | hladký nebo jemně bradavičnatý              | s polokulovitými hrbolky   | s kuželovitými hrbolky  | s poduškovitými hrbolky  | s poduškovitými hrbolky                                   | S poměrně vysokými bradavičkami  |
| Velikost merikarpíí       | 1,5-2,0 mm                                  | 1,4-1,7 mm dl.; 0,8-1,0 mm šir.  | 1,0-1,4 mm dl., 0,8-1,0 mm šir.   | 1,4-1,8 mm dl.; 0,7-0,9 mm šir.  | 1,2-1,5 mm dl.; 0,9-1,1 mm šir.                           | 1,0-1,25 mm dl.; 0,5-0,75 šir.   |

**Tabulka č. 1:** Srovnání znaků studovaných druhů rodu *Galium*, sekce *Leptogalium*

## 6. Mikroevoluční mechanismy účastnící se na diferenciaci komplexu *Galium pumilum* agg.

V této kapitole probírám procesy, které v mém studovaném komplexu nepochybně probíhají. Je nutné zmínit, že hybridizace a polyploidizace spolu úzce souvisí a jen obtížně se probírají odděleně. Hybridizace a polyploidizace jsou projevem sympatrické speciace. Geografická izolovanost je příčinou alopatrické speciace.

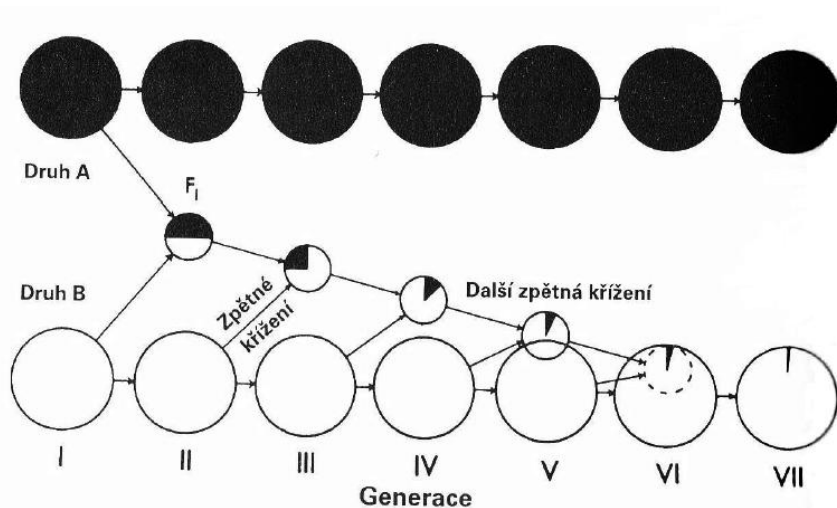
### 6.1. Hybridizace

Hybridizací rozumíme křížení dvou odlišných jedinců. Může se přitom jednat jak o hybridizaci mezidruhovou, tak i vnitrodruhovou, kdy se setkávají dvě odlišné populace (Soltis 2009). Pojmem homoploidní hybrid rozumíme jedince, který má stejnou ploidii, jako jeho rodiče. Součástí hybridizace je často polyploidie, kdy je nutné pro zachování fertility vzniklého hybridu znásobit počet jeho chromozomových sad (Soltis & Soltis 2009).

Hybridizace je především u rostlin velmi častá, dříve však byla pokládána za poměrně vzácný jev. Vytváří nové kombinace genotypů a rozšiřuje genetickou variabilitu. Ne vždy se však jedná o výhodu a často je doprovázena částečnou nebo úplnou sterilitou hybridních jedinců (Wissemann 2007). Proto mezi rostlinami existují bariéry, které hybridizaci zabraňují. Prezygotické bariéry zabraňují již vzniku zygoty (časový posun v kvetení, rozdílní opylovači, gametofytická inkompatibilita), postzygotické bariéry pak zabraňují vývoji zygoty nebo rozmnožování jedince (Flegr 2005). Pokud dojde k zamezení zpětného křížení s rodiči, může vzniknout nový hybridogenní druh (Wissemann 2007).

Významným procesem často doprovázejícím hybridizaci u rostlin je tzv. *introgrese*. Vzniknuvší hybridi se zpětně kříží se svými rodiči a dochází tak k přenosu genů z jednoho druhu do druhého, viz obr. č. 1 (Briggs & Walters 2001). Jedním z důsledků tohoto procesu je i jev zvaný *chloroplast capture*, kdy se v důsledku masivního křížení genom jednoho druhu/linie „rozplyne“ v genomu druhu druhého. Dojde však k zachování (v extrémním případě dokonce k dalšímu rozšíření) jeho původní chloroplastové DNA, což poté značně komplikuje fylogenetický výzkum (Tsitroni et al. 2003).

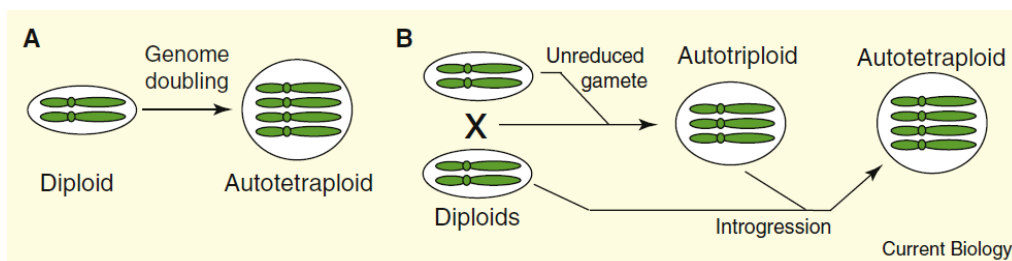
Hybridizace představuje nebezpečí pro vzácné a ohrožené druhy. Vlivem klimatických změn a vlivem člověka dochází k disperzi rostlin na velké vzdálenosti a setkávají se tak druhy, které nemají potřebné izolační mechanismy zabraňující hybridizaci. Může tak dojít ke genetické erozi a „pohlčení“ vzácnějšího taxonu jiným, běžněji rozšířeným (Soltis et Soltis 2009).



**Obr č. 1:** Graf znázorňující introgresi mezi dvěma druhy. Zpětné křížení  $F_1$  hybridů s druhem B vede v konečném důsledku k přijetí některých genů druhu A druhem B (Briggs & Walters 2001).

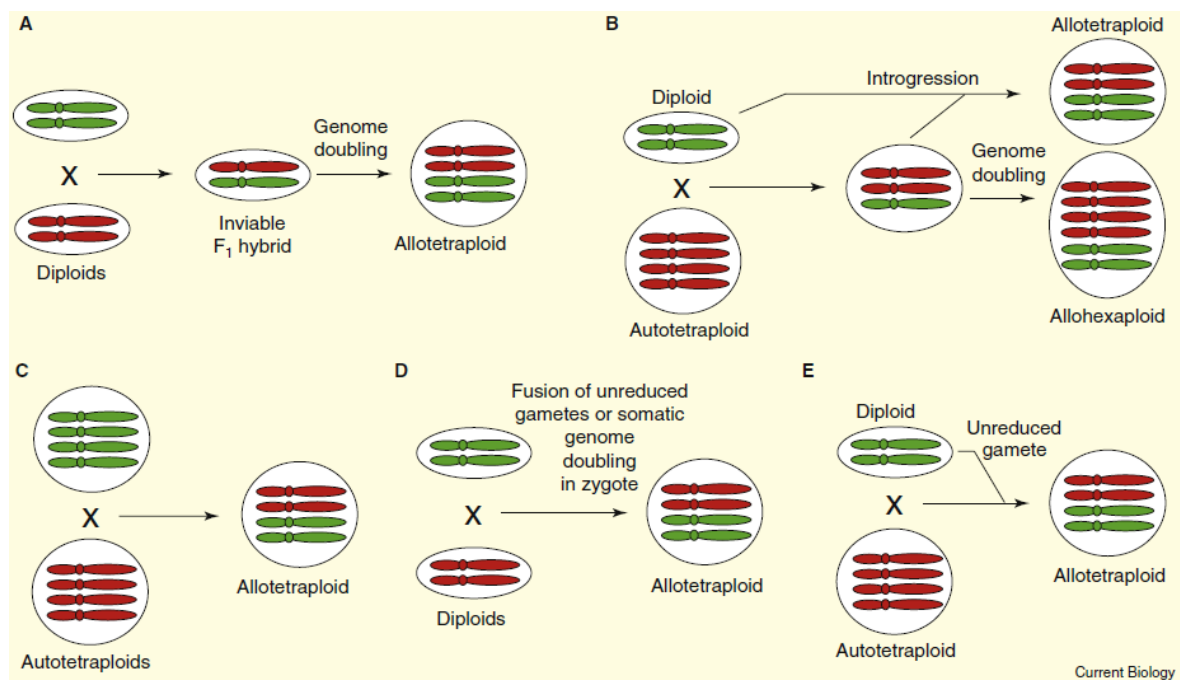
## 6.2. Polyploidizace

Pojmem polyploidie rozumíme stav, kdy se v genomu nachází tři a více sad chromosomů, namísto obvyklých dvou, jak je tomu klasicky u diploidů (Hegarty & Hiscock 2008). Předpokládá se, že téměř všechny krytosemenné rostliny, včetně rostlin s malým genomem jako je *Arabidopsis thaliana*, zaznamenaly během své historie alespoň jednu událost polyploidizace. Jedinou výjimku tvoří bazální rod *Amborella* (Soltis et al. 2009). Podle vzniku polyploidie rozpoznáváme dvě základní kategorie. Autopolyploid (autotetraploid, autohexaploid, apod.) je jedinec, u něhož dochází ke zmnožení strukturně podobného genomu v rámci jednoho jedince či druhu. Allopolyploid vzniká křížením dvou nepříbuzných jedinců, jejichž genomy se liší (odlišný může být dokonce i počet chromozomů). Příklady viz obr. č. 2 a 3 (Hegarty & Hiscock 2008). Mezi oběma výše popsanými stavy však existuje kontinuální překryv a ne vždy můžeme autopolyploidii od allopolyploidie jasně odlišit (Bennet & Leitch 1997).



**Obr č. 2:** (A) Autopolyploid vzniká zdvojením chromozomové sady nebo splynutím neredukovaných ( $2n$ ) gamet. (B) Tzv. triploidní můstek. Triploid je schopen tvořit životaschopná triploidní vajíčka která po splynutí s redukovanou gametou dá vznik tetraploidovi (Hegarty & Hiscock 2008).

Vzniku polyploidie předchází buď spontánní genomová duplikace (somatická polyploidie) nebo splynutí neredukovaných ( $2n$ ) gamet. V případě somatické polyploidizace mluvíme také o tzv. mixoploidii, kdy jedna část rostliny může mít jinou ploidii, než zbytek jedince. Faktorem pozitivně ovlivňujícím četnosti těchto událostí může být např. teplotní stres, ale i jakékoli jiné agens chemického nebo biologického původu. V případě allopolyploidie dochází k duplikaci kvůli genomové nerovnováze, kdy nedochází ke správnému párování chromozomů, viz obr. č. 3 (A). Polyploidizace může být také navozena experimentálně, např. působením mitotického jedu kolchicinu (Briggs & Walters 2001).



**Obr. č. 3:** (A) Mezidruhová hybridizace s neplodným F<sub>1</sub> hybridem (nepárující chromozomy při meiose), polyploidizace za vzniku fertilního allotetraploida (B) Mezidruhová hybridizace dvou druhů lišících se v ploidii, vznikne neplodný F<sub>1</sub> triploid, může dojít ke vzniku fertilního hexaploida nebo zpětným křížením ke vzniku tetraploida (C) Mezidruhová hybridizace tetraploidů bez zvýšení ploidie, pokud dochází k pravidelné meiose (D) Splynutí neredukovaných gamet dvou rozdílných diploidů nebo somatické zdvojení až v zygotě (E) Mezidruhová hybridizace neredukované gamety diploida a redukované gamety tetraploida (Hegarty & Hiscock 2008).

Především u nově formovaných polyploidů dochází v genomu k velkým přestavbám, tzv. silencingu (pozastavení transkripce) některých duplikovaných genů a k jejich funkční diferenciaci (Adams & Wendel 2005). Dokonce může docházet i k významné redukci velikosti samotného genomu. Tyto procesy lze jednotně nazvat procesem diploidizace (Parisod et. al 2010). Rostlina se tak postupně navrácí k diploidnímu stavu.

Výskyt polyploidie je vyšší u rostlin, která obývají méně stabilní a disturbovaná prostředí. Velké množství polyploidních linií nalézáme v oblastech předchozího zalednění (Ehrendorfer 1980). I přes počáteční obtíže a potenciálně sníženou fertilitu, vykazují polyploidi širší ekologickou

amplitudu a jsou schopni obsadit jiné, mateřskými druhy neobsazené niky (Otto 2007). Význam autopolyploidů pravděpodobně není doceněn (jsou obtížněji detekovatelní) a mají na speciaci a šíření rostlin podobný dopad, jako více studování allopolyploidů (Parisod et al. 2010).

### 6.3. Alopatická diferenciace

K alopatické diferenciaci dochází díky prostorové izolaci, která ve velké míře nebo zcela zabraňuje komunikaci populací a tedy i genovému toku. Takovou bariérou může být prakticky cokoliv, např. pohoří nebo řeka, ale třeba i pro stepní druhy les a naopak. Obecně absence vhodného biotopu v dané oblasti pro daný druh. Pokud izolace existuje dostatečně dlouho, v populacích se kumulují genetické změny. Postupem času může docházet i k odlišení fenotypu a ke speciaci (Flégr 2005).

K fragmentaci areálu může dojít v důsledku klimatických či geomorfologických změn nebo náhodným dálkovým přenosem semen. Zvláště v období postglaciálu docházelo k migraci rostlin a ke kvantitativním změnám areálu rozšíření, které po sobě zanechávaly izolované arely (Briggs & Walters 2001). V případě, že se dlouho izolované populace znovu setkají, může dojít k hybridizaci a polyploidizaci a ke vzniku nových cytotypů (Ehrendorfer 1962).

## 7. Evoluční historie komplexu

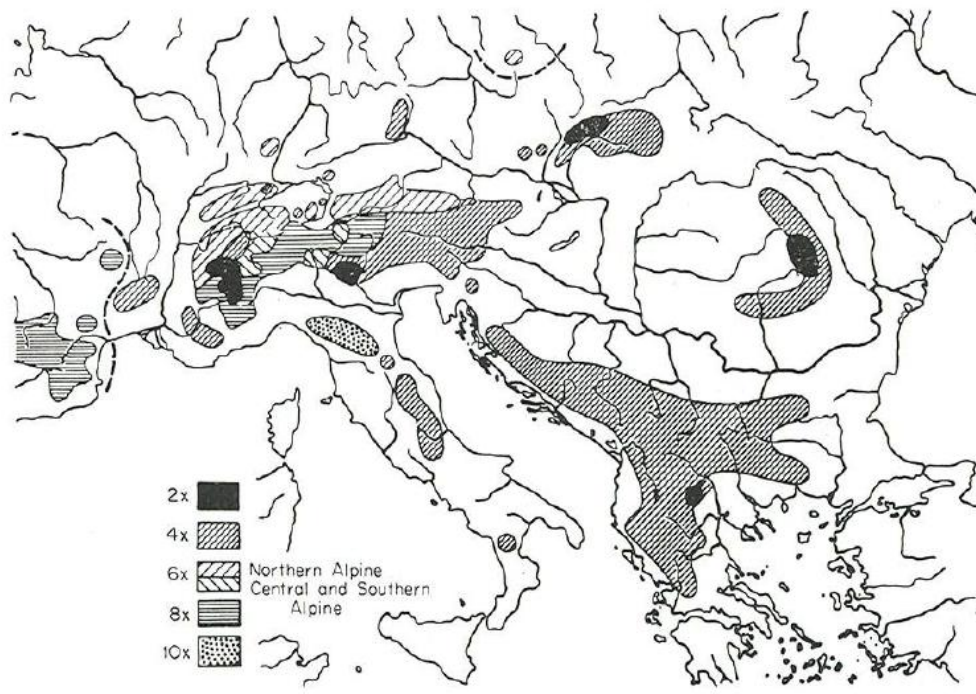
### 7.1. Evoluční historie celého komplexu a jeho šíření v poledové době

Historie komplexu je velmi komplikovaná, především díky blízké příbuznosti jednotlivých taxonů (Ehrendorfer et al. 1996), opakované polyploidizaci a časté hybridizaci, a také kvůli velké fenotypické plasticitě. Kvantitativní znaky se často překrývají a vhodné určující znaky jsou velmi drobné (Štěpánková 2000).

K hybridizaci dochází především v rámci téže ploidní úrovně (Ehrendorfer 1976). Např. diploidní cytotypy *G. austriacum* a *G. valdepiosum* jsou schopny vytvořit plně fertální F1 hybridy (Ehrendorfer 1962 a unpubl.), stejně tak tetraploidní *G. austriacum* a *G. anisophyllon* (*G. bellatulum*) (Šípošová 1987). Proto je nutné zmínit pojem *retikulátní evoluce*. Tedy stav, kdy vztahy mnohem více než rodokmen připomínají síť pospojovanou z hybridních taxonů, kteří se kříží nazpět se svými rodiči. Součástí hybridizace může být polyploidizace. V našem případě ale nejsme schopni s jistotou odlišit allopolyploida od autopolyploida (Ehrendorfer 1996), protože rodiče hybrida jsou si blízce příbuzní a ani chromozomy nejsou nijak výrazně diferencované (Krahulcová & Štěpánková 1998).

Důležitou roli ve vývoji námi studovaného komplexu hrály pohoří jihozápadní Evropy a oblasti Balkánu, hlavně díky mnohým vazbám jednotlivých cytotypů *G. anisophyllon* na ostatní druhy

v komplexu (Ehrendorfer 1962). *G. anisophyllum* má v Alpách pozoruhodnou geografickou diferenciaci svých cytotypů. Současný stav na obr. č. 4 vysvětluje Ehrendorfer (1958) v několika krocích jako výsledek změn klimatu v pleistocénu s periodickým růstem/úbytkem pevninského ledovce. V první fázi se šířily diploidní cytotypy. Při ochlazení klimatu se růst areálů zastavil a začínalo postupně docházet k disjunkcím, ústupu areálu na jih a do refugií a izolaci jednotlivých populací, což vedlo následně k alopatrické diferenciaci. Při nástupu vhodných klimatických podmínek se areály izolovaných populací znovu setkávají a dochází k opakované hybridizaci a polyploidizaci. Tyto mikroevoluční procesy hrály důležitou roli pro zvýšení genetické variability, která byla ochuzena v období glaciace. Jedinci vyšší ploidie se díky této výhodě potom šířily dále, zatímco diploidi přetrvávali v refugiích. Celý proces se opakoval a dal tak vznik vyšším ploidním.



**Obr. č. 4:** Distribuce alpského polyploidního komplexu sekce *Leptogaliium*: *G. anisophyllum*: různé 2x, 4x, 6x, 8x, 10x cytotypy; za přerušovanou čarou pravděpodobně příbuzné horské až alpské druhy *G. marchandii* (8x, Pyreneje) a *G. sudeticum* (4x, Sudety) (Ehrendorfer 1965).

Osídlování severních oblastí v průběhu holocénu probíhalo v několika vlnách (Ehrendorfer 1962, 1965). Podle dosavadních představ proběhla první vlna v raném holocénu a zahrnovala druhy *G. cracoviense* a *G. oleandicum* (STERNER & HYL.) EHREND. Jedná se pravděpodobně o pozůstatek druhů vázaných na otevřené stepi, které v té době převládaly.

Druhá pozdější vlna zahrnuje *G. suecicum* (STERNER) EHREND., které se vyskytuje v severovýchodním Německu a jižním Švédsku a šířilo se se „severskými“ borovými lesy. Třetí vlna z období vrcholného

holocénu zahrnuje tetraploidní *G. valdepiosum*, které při své cestě na sever došlo až do Dánska a dnes obývá otevřené lokality s „teplomilnější“ vegetací (otevřené smíšené a listnaté lesy, písečné duny, apod.). Poslední čtvrtá vlna zahrnuje období spojené s výraznou lidskou aktivitou v čele s *G. pumilum*, jehož areál je v současnosti největší. Tento velmi variabilní taxon se běžně může křížit s *G. rubrum* L., jako *G. x centroniae* CARIOT (Ehrendorfer 1976) a v minulosti se na jeho vzniku zřejmě podílely taxony jako *G. valdepiosum*, *G. marchandii* ROEMER & SCHULTES nebo oktoploidní *G. anisophyllon* (Ehrendorfer 1962).

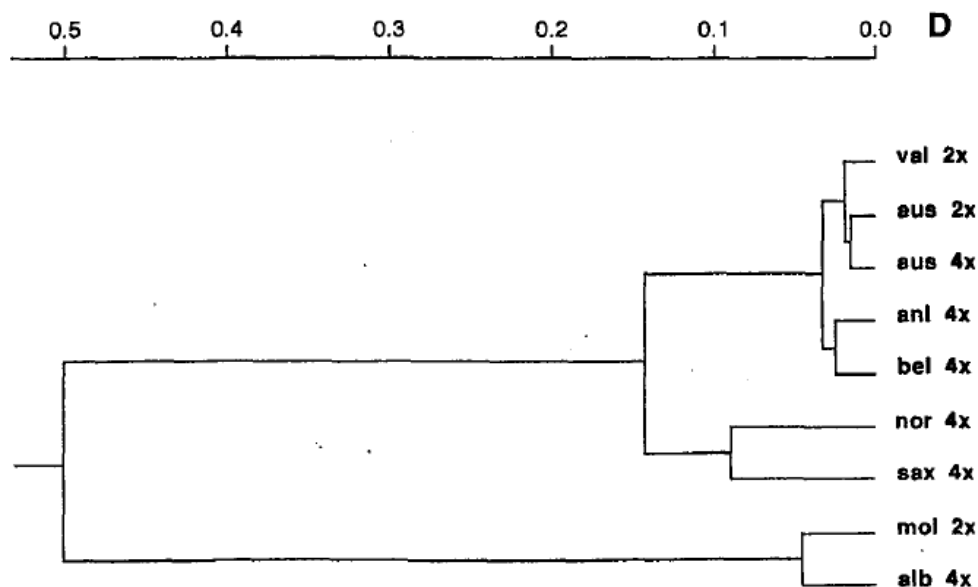
Důležitý je taktéž charakter osidlovaných stanovišť, která mají u nižších ploidí (2x, 4x) vyloženě reliktní charakter. Jedná se o otevřená stanoviště, většinou vázaná na skály a sutě, bez výrazného zapojení rostlinného porostu, sušší, zásadité až neutrální, vzácněji i kyselé. Vyšší ploidie oproti tomu více obsazují konkurenčně náročnější biotopy (zapojenější trávníky). Tento trend lze vyzorovat již při porovnání diploidních a tetraploidních rostlin v rámci téhož druhu, např. *G. austriacum* (Ehrendorfer 1996). Oktoploidní *G. pumilum* je roztroušeně přítomno již po celé České Republice, vyjma nejvyšších poloh (Štěpánková 2000).

Podobný pattern rozšíření jako *G. valdepiosum* či *G. sudeticum*, pokud se bavíme o území České Republiky, můžeme sledovat např. u rodu *Knautia arvensis* L. (COULTER) s.l. Zahrnuje běžněji rozšířené tetraploidní (4x) cytotypy, které obklopují reliktní populace diploidů (2x) izolované na hadcových lokalitách. V období raného postglaciálu, kdy převládaly stepi a otevřenější stanoviště, byli diploidi rozšířenější. S ústupem těchto stanovišť a postupným zalesňováním byly nakonec zatlačeny a izolovány do těchto ostrůvků (Kaplan 1998). Podobně předek druhu *Cerastium alsinifolium* TAUSCH pravděpodobně v období glaciace ustupoval z Alp do okolních oblastí a vytvořil opět na hadcích ve Slavkovském lese izolovanou populaci, která se v důsledku izolace vyvinula v samostatný druh (Novák 1960).

Z výše uvedeného vyplývá, jaké procesy se podílejí na evoluci komplexu. Především v horských oblastech docházelo k izolaci jednotlivých populací a alopatrické diferenciaci, čemuž ani v současnosti nebrání ostrůvkovitý charakter rozšíření. Při styku diferencovaných populací potom může dojít k hybridizaci a polyploidizaci (allopolyploidizace), která se pravděpodobně dělá opakovaně, na různých místech (viz obr. č. 4). Možný vznik autopolyploidů však také není vyloučen.

Novější práce se s využitím allozymových analýz se zaměřují na příbuzenské vztahy a rozdíly v genetické variabilitě. První jen v rámci *G. austriacum* a *G. pumilum* (Samuel et. al. 1990), kde se jak podle analýz, tak i ekologicky odlišují di- a tetraploidi *G. austriacum*. Pozdější práce od stejných autorů je rozšířena o další příbuzné druhy (Ehrendorfer et al. 1996) viz obr. č. 5. Poprvé je zde

s podporou molekulárních analýz podpořena hypotéza o hybridním vzniku vyšších ploidií. Konkrétně tetraploidní *G. austriacum* s rodičovskými druhy *G. anisophyllum* (4x) a *G. austriacum* (2x).



**Obr. č. 5:** UPGMA dendrogram, vytvořený pomocí alozymové analýzy, zobrazující příbuzenské vztahy 9 druhů studovaných svízelů. Vysvětlivky: val=*G. valdepilosum*; aus=*G. austriacum*; ani=*G. anisophyllum*; bel=*G. bellatulum* (= *G. anisophyllum* ze Slovenska); nor=*G. noricum*; sax=*G. saxatile*; mol=*G. mollugo*; alb=*G. album* (Ehrendorfer 1996).

## 7.2. Taxonomické zařazení populací *Galium sudeticum*

Druh *G. sudeticum* má neobvyklé disjunkt ní rozšíření sestávající z několika arel (viz kapitola 4.3.2.). V následujících odstavcích se zabývám historií poznatků o jeho rozšíření a problematikou rozdílných názorů na příslušnost jednotlivých populací k tomuto taxonu. Vzhledem k zaměření mé navazující diplomové práce rozebírám tento druh podrobněji a odděleně.

Druh *G. sudeticum* popsal I. F. Tausch (1835), dovoluji si přiložit celou diagnózu v původním znění: „*Galium sudeticum*: caulibus caespitosis abbreviatis erectis glabris, foliis 6-8, interioribus obovatis retrorsum ciliatis, superioribus obverse lanceolatis breve mucronatis membranaceis laevibus, corymbis terminalibus trichotomis patulis, floribus acutis, fructibus tenuissime granulatis.“ Zde je můj překlad: „Trsnatá rostlina, lodyhy drobné, vzpřímené, lysé, listy po 6-8, ve střední části lodyhy obvejčité, na okraji s k bázi směřujícími chlupy, listy v horní části lodyhy obkopynaté, hladké, náhle se zužující v blanitou špičku, koncové květenství chocholičnaté, otevřené, dělí se na tři části, korunní cípy ostré, plody velmi jemně zrnité.“ I když neudává žádné přesné lokality výskytu, z textu jasně vyplývá, že jej popisuje z Krkonoš a vypisuje i rozdílné stanovištní preference oproti *G. saxatile* L. (v originále *G. hercynicum* WEIG.), který v Krkonoších roste také: „*G. hercynicum* wächst



in den unteren Gegenden des Riesengebirgs äusserst häufig, überzieht ganze Strecken und steigt bis gegen die höchsten Bergrücken fort, und da wo es aufhört, fängt das *G. sudeticum*, an, welches trockne steinige Stellen liebt, während das andere nur in Sümpfen gedeiht“ (Tausch 1835). V Bavorsku Vollmann (1914) dokládá populace *G. pumilum* MURRAY ssp. *alpestre* GAUD., které Ehrendorfer (1956) přiřazuje ke *G. sudeticum*, a dále uvádí jeho výskyt na hadcových skalkách v okolí Mariánských Lázní a Karlových Varů (Slavkovský les). V Klíči k úplné květeně ČSR (Dostál 1958), kde je *G. sudeticum* chápán jako součást taxonu *G. pumilum* ssp. *anisophyllon* (WILL.) DOST., se tyto lokality neuvádí, v pozdější Nové květeně je již *G. sudeticum* chápáno jako samostatný druh a je uváděn jak z Krkonoš, tak i ze Slavkovského lesa (Dostál 1989). I když v této práci (Dostál 1989) nejsou přímé citace, předpokládám, že to byl právě Ehrendorfer (1956), který přišel s touto domněnkou a přiřadil populace ze Slavkovského lesa ke Krkonošským, načež ostatní autoři tento fakt později sami přejímali například z Flora europaea (Ehrendorfer 1976), kde je situace řešena stejně. Další populace existovala ještě ve Velké Kotlině v Jeseníkách, která je dokladována položkou Lause v OLM (Štěpánková 2000) a pozdějším floristickým záznamem (Bureš & Burešová 1983). Zde je však *G. sudeticum* v současnosti považováno za nezvěstné (Štěpánková 2000) a ani inventarizační botanický průzkum v roce 2005 jej neodhalil (Mgr. Radek Štencel ústní sdělení). Jelikož se jedná o obtížně rozpoznatelný taxon, existuje několik záměn ze Slovenska (Štěpánková 2000), vesměs s *G. anisophyllon* a dokonce je i jedna zmínka o možném výskytu v západním Maďarsku (Ehrendorfer 1973).

Noack (1983) ve své diplomové práci, zabývající se bavorskými populacemi, poukazuje na rozdíly mezi populacemi *G. sudeticum* z Krkonoš a ze Slavkovského lesa. Jedná se především o rozdíly v odění rostliny, povrchu merikarpíí a průměru koruny a pracovně ne-krkonošské populace nazývá *G. valdepilosum* ssp. *pseudosudeticum*. Podotýká, že další studie je nutná, protože v tomto případě pracoval jen s několika (12) herbářovými položkami. Krahulcová & Štěpánková (1998) pracovaly již s živým materiálem a na území ČR sledovaly rozdíly mezi hadcovými a nehadcovými populacemi různých taxonů v rámci agregátu *Galium pumilum*. V našem případě tedy nehadcové populace z Krkonoš a hadcové ze Slavkovského lesa. Nalezly morfologické rozdíly mezi populacemi a doporučily další, především molekulární studium s širším kontextem a zahrnutím i jiných horských druhů, které by rozřešily eventuální příslušnost hadcových populací ke *G. valdepilosum*. Příslušnost západočeských populací ke *G. valdepilosum* upřednostňuje také Ehrendorfer, v připravovaném manuskriptu pro nové vydání Flora von Mitteleuropa, na základě podobností povrchové struktury plodů (Ehrendorfer in prep.). Taktéž hodnota celého taxonu je otázkou diskuze. Mnozí autoři (Dostál 1989, Ehrendorfer 1976, Štěpánková 2000) uvádí *G. sudeticum* jako samostatný druh, ale v dřívějších letech byl považován i za součást poddruhu *G. pumilum* ssp. *anisophyllon* (Dostál 1958). Hlavně krkonošské populace jsou udávány do blízké příbuznosti s *G. anisophyllon* (Ehrendorfer 1956, 1958, 1976,

Kucowa 1962). A podle nejnovějších názorů (Ehrendorfer in prep.) je také řazen přímo do druhu *G. anisophyllon*. Je však nutné zdůraznit, že zmiňované hypotézy jsou založeny pouze na znalosti distribuce a stanovištních vazeb, morfologických pozorováních a základních karyologických analýzách. Je zřejmé, že v úvahu mohou přicházet i jiné hypotézy původu krkonošských populací, např. allopolyploidní vznik s účastí jiných druhů, např. *G. cracoviense* (Ehrendorfer 1960, 1962).

## 8. Otázky pro navazující diplomovou práci

- 1) Jaká je genetická variabilita *G. sudeticum* ve srovnání s běžněji rozšířenými příbuznými tetraploidními druhy (*G. anisophyllon*, *G. valdepilosum*)?
  - jsou malé a izolované horské populace geneticky uniformní?
- 2) Jaké jsou vztahy jednotlivých populací v rámci *G. sudeticum* a k příbuzným druhům v sekci *Leptogalium*?
  - jsou si krkonošské a hadcové populace ze Slavkovského lesa příbuzné?
    - jsou krkonošské populace příbuzné spíše *G. anisophyllon*?
    - jsou hadcové populace ze Slavkovského lesa příbuzné spíše *G. valdepilosum*?
- 3) Jaký je původ vzniku *G. sudeticum*?
  - Jaké druhy/jaký druh se mohly podílet na jeho vzniku?
- 4) Budou se jedinci *G. sudeticum* z krkonošských a slavkovských populací vzájemně morfologicky lišit a budou se odlišovat od *G. anisophyllon* a *G. valdepilosum*, pokud budou pěstováni za stejných podmínek?
- 5) Budou se pěstovaní jedinci *G. sudeticum*, *G. anisophyllon* a *G. valdepilosum* morfologicky lišit od svých volně rostoucích rodičů?

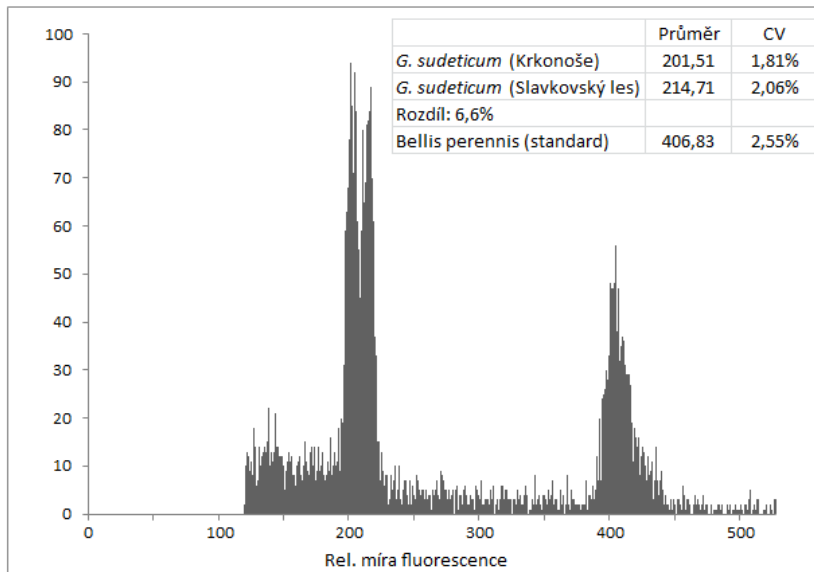
## 9. Metody v diplomové práci

### 9.1. Průtoková cytometrie (FCM)

Průtoková cytometrie, zkráceně FCM (flow cytometry) nalézá využití v široké škále oborů, primárně v medicíně. Princip průtokové cytometrie spočívá v počítání a měření vlastností biologických částic (nejčastěji buněk či buněčných jader), které prochází skrz kapiláru, kde jsou vystaveny zdroji excitačního záření. Obarvením specifických struktur fluorescenčním barvivem pak můžeme měřit relativní míru fluorescence (Shapiro 2003).

Využití v botanice bránila povaha rostlinných pletiv, kdy bylo nutné buňky od sebe oddělit. Nejjednodušší a převratný postup mechanické izolace jader spočívá v prostém nasekání pletiv žiletkou v hypotonickém izolačním roztoku, odfiltrování zbytků pletiv a přidáním potřebného barviva (Galbraith et al. 1983). Výhod průtokové cytometrie je několik. Je rychlá, za den můžeme změřit až stovky jedinců. V rámci jednoho měření, dle našeho zájmu, můžeme spolu měřit i několik jedinců. Jedná se o nedestruktivní metodu (obvykle stačí kousek listu), takže ji lze uplatnit i u ohrožených taxonů. K analýze můžeme využít téměř jakékoliv pletivo. A je nízkonákladová. Cena jednoho měření je několik desítek korun. Velkou nevýhodou je tzv. nulová vizuální rozlišovací schopnost, kdy nevíme, zda měříme jednotlivé jádro nebo shluk jader (Suda 2011). Při vyhodnocování je tak nutné být kritický. Počty a násobky chromozomů nemusí korelovat s množstvím DNA. Pokud tedy nemáme k dispozici i výsledky z klasického počítání chromozomů z roztlačových preparátů, měli bychom se bavit pouze o „DNA ploidii“ (Suda 2006).

V diplomové práci se bude průtoková cytometrie uplatňovat jako podpůrná metoda hlavně pro ověření správnosti určení problematických taxonů, lišících se stupněm ploidie (zejm. odhalení případných záměn s *G. pumilum*) a pro zjištění rozdílů v množství jaderné DNA na homoploidní úrovni, které poslouží jako první indikace příslušnosti populací k různým evolučním liniím. I druhy stejné ploidie lze při tomto poznatku, i když jen s malým rozdílem, na průtokové cytometrii odlišit, viz obr. č. 6. Díky populačnímu screeningu budeme také schopni odhalit případnou vnitropopulační cytotypovou variabilitu.



**Obř. ř. 6:** Histogram z průtokové cytometrie zobrazující rozdíl ve velikosti genomu jedinců *Galium sudeticum* stejné ploidie (4x) pocházejících z lokalit v Krkonoších a Slavkovském lese. Izolace v Otto pufru. Barvení DAPI.

## 9.2. Dominantní (binární) molekulární marker - AFLP

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism = délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů) je molekulární metoda založená na namnožení vybraných částí celkové jaderné DNA (Vos et al. 1995). Patří mezi dominantní markery, protože nejsme schopni odlišit dominantní homozygoty od heterozygotů. Výstupem je obvykle nějaké pattern proužků. Proužek o konkrétní délce definuje jednotlivý lokus. U každého jedince potom hodnotíme, zda proužek je (1) nebo není (0) přítomen. Proto se tato metoda také nazývá binární (Fér 2011).

Postup se v zásadě skládá ze čtyř kroků. Prvním je štěpení celkové DNA pomocí dvojice restričních enzymů, které štěpí DNA v místě konkrétní sekvence. Nejčastěji se používá dvojice enzymů *EcoRI* a *MseI*. Druhým krokem je ligace adaptorů na konce nastříhaných fragmentů pomocí enzymu T4 ligázy. Třetím krokem se pomocí preselektivní PCR specificky redukuje počet fragmentů, které budou analyzovány. Čtvrtým krokem je další selektivní amplifikace, kde dojde k další významné redukci fragmentů a jeden z primerů (zpravidla *EcoRI*) je fluorescenčně označen, což umožní velmi přesnou délkovou analýzu výsledných fragmentů na automatickém sekvenátoru (Meudt & Clarke 2007).

Výhodou této metody je, že analyzujeme „celý“ genom a máme tak k dispozici velké množství variability i u blízce příbuzných druhů. Při dobrém technickém zvládnutí metody je dosaženo vysoké opakovatelnosti a metoda je potom velmi spolehlivá (Fér 2011).

Námi studovanými druhy se s využitím AFLP již zabývala studie polských autorů Cieśląg & Szeląg (2010). V tomto konkrétním případě ale měla práce značné nedostatky. Např. měřila množství genetické variability ohrožených druhů bez srovnání s běžně rozšířenými. Jiná studie zabývající se vztahy v rodu *Achillea* (Guo et al. 2005), který se charakterem své historie našemu rodu značně podobá, touto metodou dokázala úspěšně poodhalit složité vztahy v rámci polyploidního komplexu *Achillea millefolium*, zahrnující i opakované polyploidizace a hybridizace. Tedy ty procesy, které bych chtěl v navazující diplomové práci detekovat. Metoda samozřejmě poskytne i ověření správné determinace druhu.

### 9.3. Sekvenování DNA

Při sekvenování DNA získáváme informaci v podobě pořadí čtyř nukleotidových bází. Výhodou takové metody je univerzalita a diskrétnost znaků, rozdílně stavy se od sebe dají snadno odlišit. Základními znaky, které nám mohou od sebe odlišit dva taxony, jsou bodové mutace (SNP – single nucleotid polymorphism), kdy je jeden nukleotid nahrazen jiným a délkový polymorfismus, kdy se sekvence liší svojí délkou. V takovém případě pak došlo buď ke vložení (inserci) nebo k vystřížení (deleci) v jedné ze studovaných sekvencí. Tyto tzv. indely se mohou lišit svojí délkou od několika až po stovky nukleotidů (Krač 2011).

Způsobů sekvenování je několik. V současnosti asi nejpoužívanější je tzv. Sangerova metoda (Sanger 1988). Její postup se od doby její publikace změnil, např. způsob značení nukleotidů, ale princip zůstává stejný. Při této metodě musíme alespoň částečně znát studovaný fragment, který namnožíme pomocí PCR. Sekvenování pak probíhá pomocí druhé PCR, kde jako templát slouží namnožené molekuly studovaného úseku. Jako stavební jednotky jsou ve směsi deoxyribonukleotidy (dNTP) a dideoxyribonukleotidy (ddNTP). Ty se začleňují do nově syntetizovaného řetězce DNA. Ovšem v okamžiku navázání některého z ddNTP syntéza skončí. Získáme tak množství různě dlouhých fragmentů s ddNTP na konci. Poté jsou fragmenty elektroforeticky rozděleny v kapiláře a snímány kapilárovým sekvenátorem. Každý ze čtyř ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) je označen jinou fluorescenční barvou, takže sekvenátor rozpozná jednotlivé nukleotidy a my tak získáme celou sekvenci sledovaného úseku DNA (Krač 2011).

Studovat můžeme mitochondriální (mtDNA), chloroplastovou (cpDNA) nebo jadernou DNA (jadernou ribosomální=nrDNA nebo low-copy geny), přičemž každá z nich má jiné charakteristiky, viz tabulka č. 2.

| Typ markeru           | Dědičnost     | Evoluční rychlost | Univerzalita | Přítomnost mnoha nezávislých lokusů |
|-----------------------|---------------|-------------------|--------------|-------------------------------------|
| cpDNA                 | uniparentální | nízká             | ano          | ne                                  |
| mtDNA                 | uniparentální | nízká             | ne           | ne                                  |
| nrDNA                 | biparentální  | vysoká            | ano          | ne                                  |
| jaderné low-copy geny | biparentální  | vysoká            | ne           | ano                                 |

**Tabulka č. 2:** Přehled základních vlastností skupin markerů sekvenovaných v rámci biosystematiky rostlin (převzato z Krak 2011).

V navazující diplomové práci bych se chtěl zaměřit na využití sekvencí chloroplastové DNA a low-copy jaderných genů, jejichž krátkou charakteristiku přikládám. Kombinace těchto dvou rozdílných markerů by měla poskytnout základ robustní fylogenetické analýzy. Jako srovnávací materiál budou k dispozici také sekvence týchž úseků od dalších druhů sekce *Leptogalium*, které jsou předmětem výzkumu v rámci dizertačního projektu školitele.

### 9.3.1. Chloroplastová DNA

Chloroplastová DNA (cpDNA) je kruhová molekula o délce 71-230 kbp. V chloroplastu je těchto molekul obvykle několik desítek. Kóduje některé pro rostlinu esenciální látky, jako je enzym RuBisCo, různé části fotosystému I a II apod. (Alberts 2002). Chloroplastová DNA je velmi konzervativní. I molekuly vzdáleně příbuzných organismů kódují stejné geny, často také ve stejném pořadí. Díky tomu je cpDNA univerzální a využitelná napříč rostlinnou říší (Olmstead & Palmer 1994). cpDNA je haploidní a až na výjimky se dědí po mateřské linii, taktéž nepodléhá rekombinaci. Ke zkoumání mezi a vnitrodruhové variability nejsou kódující sekvence vhodné, lze ale využít sekvence nekódující (Krak 2011).

### 9.3.2. Jaderné geny s nízkým počtem kopií (low-copy geny)

Jak již název napovídá, jedná se o geny, které jsou v genomu kódované několikrát, ideálně pouze jednou. To je základní rozdíl od nrDNA, které se v genomu vyskytují ve stovkách až tisících kopiích. Takových genů je v jádře mnoho a poskytují tedy dostatečné množství znaků pro analýzu. Ve struktuře jaderných genů se nacházejí kódující exony a nekódující introny. Introny jsou obecně méně konzervované než exony, a proto jsou obecně vhodnější pro rekonstrukci vztahů na nižších fylogenetických úrovních. Navíc se obecně předpokládá, že low-copy geny nepodléhají fenoménu *concerted evolution* (Krak 2011). To je proces, ve kterém ztrácíme informace o minulosti organismu procesem homogenizace sekvencí v rámci celé genové rodiny (Elder & Turner 1995).

## 9.4. Morfometrická analýza

Podstata morfometrické analýzy spočívá v měření množství kvantitativních i kvalitativních znaků a jejich následné statistické analýze. Metoda je použitelná především na druhové a mezidruhové úrovni (Marhold & Suda 2002).

V diplomové práci budu využívat klasické morfometrie se zaměřením jak na vegetativní, tak na generativní znaky. Ke zpracování mnohorozměrných dat využiji především analýzu hlavních komponent (PCA) pro odlišení jednotlivých skupin a kanonickou diskriminační analýzu (CDA) k nalezení nejvhodnějších determinačních znaků odlišující populace pocházející z různých geografických oblastí, podobně jak byly použity u rodu *Cerastium* (Letz et al. 2012). Analýza nemá za cíl nalézt determinační znaky na rostlinách v terénu, které jsou velmi variabilní, ale bude se zaměřovat na rostliny pěstované a vytvoří tak případnou podporu pro výsledky molekulárních analýz.

## 10. Závěr

Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o druzích patřící do agregátu *G. pumilum*. V rámci agregátu dochází k hybridizaci, polyploidizaci a alopatrické diferenciaci. Všechny druhy si jsou velmi podobné a jsou morfologicky velmi variabilní. U každého druhu se většinou vyskytují alespoň dva cytotypy. Reliktní charakter rozšíření druhů, s výjimkou *G. pumilum*, poukazuje na jejich pravděpodobně dřívější větší areál rozšíření, který v poledových dobách doznával značných změn. Nižší ploidie se vyskytují na konkurenčně slabších stanovištích s menším zapojením porostu, zatímco vyšší ploidie se naopak vyskytují v konkurenčně náročnějších biotopech.

V druhu *G. sudeticum* existují mezi populacemi morfologické rozdíly, které doposud nebyly řádně prozkoumány. Je možné, že jeho hadcové a horské populace jsou příslušníky jiných taxonů. Proto bych se touto problematikou chtěl zabývat v navazující diplomové práci. Vzhledem k drobnosti a variabilitě znaků bude kladen důraz především na molekulární analýzy, s cílem odhalit příbuzenské vztahy mezi populacemi a v rámci agregátu. Práce by mohla posloužit také ke zhodnocení ohrožení chráněného druhu *G. sudeticum*, který je českým subendemitem.

## 11. Seznam literatury

- Adams K. L. & Wendel F. J. (2005):** Polyploidy and genome evolution in plants. *Current opinion in plant biology*, 8: 135-141.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2002):** The genetic systems of mitochondria and plastids. In Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. [eds.]: *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed., Garland Science, New York, 808-821.
- Bennett M. D., Leitch I. J. (1997):** Polyploidy in angiosperms. *Trends in plant science*, 2(12): 470-476.
- Bilz M., Kell S. P., Maxted N. & Lansdown R. V. (2011):** European Red List of Vascular Plants. Publications Office of the European Union, Luxembourg, 1-130.
- Briggs D., Walters S. M. (2001):** Proměnlivost a evoluce rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Bures L. & Buresova Z. (1983):** Revised flora of Velka Kotlina Cirque, the Sudeten. Mountains, vol. 1 & 2. *Preslia*, 55: 25-61 & 123-142.
- Cieśląg E. & Szeląg Z. (2010):** Genetic diversity of *Galium cracoviense*, *G. oleandicum*, *G. sudeticum* (*Rubiaceae*) – narrow endemic species of *Galium* sect. *Leptogalium* in northeastern Europe. *Acta societatis botanicorum poloniae*, 79: 269-275.
- Dostál J. (1958):** Klíč k úplné květeně ČSR. Československá akademie věd, Praha, 593-600.
- Dostál J. (1989):** Nová květena ČSSR 2. Československá akademie věd, Praha, 774.
- Ehrendorfer F. (1949):** Zur Phylogenie der Gattung *Galium* I. Polyploidie und geographisch-ökologische Einheiten in der Gruppe des *Galium pumillum* MURRAY (Sekt. *Leptogalium* LANGE sensu ROUY) im österreichischen Alpenraum. *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 96: 109-138.
- Ehrendorfer F. (1956):** Struktur, Verbreitung und Geschichte der Sippen von *Lepto-Galium* in Bayern. *Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft*, 31: 5-12.
- Ehrendorfer F. (1958):** Die geographische und ökologische Entfaltung des europäisch-alpinen Polyploidkomplexes *Galium anisophyllum* VILL. Seit Beginn des Quartars. *Uppsala Universitets Årsskrift*, 6: 176-181.



- Ehrendorfer F. (1960):** Neufassung der Sektion *Lepto-Galium* LANGE und Beschreibung neuer Arten und Kombinationen (Zur Phylogenie der Gattung *Galium*, VII.). *Sitzungsberichte der Österreichischen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse.*, Abt. 1., 169: 407-421.
- Ehrendorfer F. (1962):** Cytotaxonomische Beiträge zur Genese der mittel-europäischen Flora und Vegetation. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 75: 137-152.
- Ehrendorfer F. (1965):** Dispersal mechanisms, genetic systems, and colonizing abilities in some flowering plant families. In Baker H. G. & Stebbins G. L. [eds.]: *The genetics of colonizing species*. Academic press, New York and London, 331-352.
- Ehrendorfer F. (1973):** Liste der Gefäßpflanzen Mitteleuropas. 2. vyd., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 120.
- Ehrendorfer F. (1975):** Further taxonomic notes on *Rubiaceae* in Europe. *Plant systematics and evolution*, 124: 173-178.
- Ehrendorfer F. (1976):** *Galium* L. In Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. [eds.]: *Flora Europaea* 4. Cambridge University Press, Cambridge, 14-36.
- Ehrendorfer F. (1980):** Polyploidy and Distribution. In Lewis W. H. [ed.]: *Polyploidy-Biological Relevance*, Plenum press, New York and London, 45-60.
- Ehrendorfer F., Samuel R., Pinsker W. (1996):** Enzyme analysis of genetic variation and relationship in diploid and polyploid taxa of *Galium (Rubiaceae)*, *Plant systematics and evolution*, 202: 121-135.
- Elder J. F. & Turner J. B. (1995):** Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes, *The quarterly review of biology*, 70: 297-320.
- Fér T. (2011):** Dominantní (binární) molekulární markery a jejich využití v populační a systematické biologii. In Mandák B., Krahulec F. & Hroudová Z. [eds.]: *Evoluční aspekty biologie rostlin. Zpráva České Botanické Společnosti, Praha, Materiály* 25: 61-78.
- Flégr J. (2005):** *Evoluční biologie*. Academia, Praha.
- Galbraith D. W., Harkins K. R., Maddox J. M., Ayres N. M., Sharma D. P. & Firoozabady E. (1983):** Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049-1051.

- Guo Y., Saukel J., Mittermayr R & Ehrendorfer F (2005):** AFLP analyses demonstrate genetic divergence, hybridization, and multiple polyploidization in the evolution of *Achillea* (*Asteraceae-Anthemideae*), *New Phytologist*, 166:273-290.
- Hegarty M. J., Hiscock S. J. (2008):** Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Current Biology*, 18(10): 435-444.
- Kaplan Z. (1998):** Relict serpentine populations of *Knautia arvensis* s. l. (*Dipsacaceae*) in the Czech Republic and an adjacent area of Germany. *Preslia*, 70: 21-31.
- Krahulcová A. & Štěpánková J. (1998):** Serpentine and polyploid differentiation within *Galium pumilum* agg. (*Rubiaceae*) in eastern c. Europe. *Folia geobotanica*, 33: 87-102.
- Krak K. (2011):** Využití sekvencí DNA při studiu rostlin. In Mandák B., Krahulec F. & Hroudová Z. [eds.]: Evoluční aspekty biologie rostlin. *Zprávy České Botanické Společnosti*, Praha, Materiály 25: 21-42.
- Krendl F. (1993):** Chromosomenzahlen und geographische Verbreitung in der Gattung *Galium* (Sect. *Leptogalium* – *Rubiaceae*). *Biosystematics and ecology series*, 4: 51-112.
- Kucowa I. (1962):** Gatunki rodzaju *Galium* L. sekcji *Leptogalium* LANGE z Polski i ziem ościennych – Species of the genus *Galium* L. of the section *Leptogalium* LANGE found in Poland and neighbouring territories. *Fragmenta floristica et geobotanica*, 8: 417-442.
- Kucowa I. & Madalski J. (1964):** Nowe stanowiska *Galium valdepilosum* HEINR. BRAUN w Polsce (New localities of *Galium valdepilosum* HEINR. BRAUN in Poland). *Fragmenta Floristica et Geobotanica*. 10: 3-8.
- Letz D. R., Dančák M., Danihelka J & Šarhanová P. (2012):** Taxonomy and distribution of *Cerastium pumilum* and *C. glutinosum* in Central Europe. *Preslia*, 84: 33-69.
- Mabberley D. J. (2008):** Mabberley's plant-book: A portable dictionary of plants, their classification and uses. 3rd ed., completely rev. Cambridge University Press, Cambridge.
- Marhold K., Suda J. (2002):** Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody). Karolinum, Praha.
- Meudt H. M. & Clarke A. C. (2007):** Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances, *Trends in plant science*, 12: 106-117.

- Mirek Z. (1993):** *Galium cracoviense* EHREND. – przytulia małopolska. In Zarzycki K., Kaźmierczakowa R., [eds.]: Polska czerwona księga roślin – paprotniki i rośliny kwiatowe. Instytut Botaniki im. W. szafera, Polska Akademia Nauk, Krakow, 152-153.
- Noack M. (1983):** Untersuchungen an außeralpinen Sippen von *Galium* Sekt. *Lepto-Galium* in Bayern. Diplomová práce, Universität München.
- Novák F. A. (1960):** Fylogeneze serpentínových typů. *Preslia*, 32: 1-8.
- Olmstead R. G. & Palmer J. D. (1994):** Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis, *American Journal of Botany*, 81:1205-1224.
- Otto P. S. (2007):** Evolutionary consequences of polyploidy, *Cell*, 131:452-462.
- Parisod Ch., Holderegger R., Brochmann Ch. (2010):** Evolutionary consequences of autopolyploidy, *New phytologist*, 186: 5-17.
- Piotrowicz M. (1958):** Caryological studies in some species of the genus *Galium* L., *Acta Biologica Cracoviensia, Série Botanique*, 1: 159-169.
- Procházka F. [ed.] (2001):** Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). Příroda, Praha, 18: 1-166.
- Rybka V., Rybková R., Pohlová R. (2004):** Rostliny ve svitu evropských hvězd. Rostliny soustavy Natura 2000 v České republice. Sagittaria, Olomouc, Praha, 52-53.
- Samuel R., Pinsker W., Ehrendorfer F. (1990):** Allozyme polymorphism in diploid and polyploid populations of *Galium*, *Heredity*, 65: 369-378.
- Sanger F. (1988):** Sequences, sequences and sequences, *Annual review of Biochemistry*, 57: 1-28.
- Shapiro H. (2003):** Practical flow cytometry. Wiley-Liss, New York.
- Soltis D. E., Albert V. A., Leebens-Mack J., Bell Ch. D., Paterson A. H., Zheng C., Sankoff D., de Pamphilis C. D., Wall P. K., Soltis P. S. (2009):** Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany*, 96: 336-348.
- Soltis P. S. & Soltis D. E. (2009):** The role of hybridization in plant speciation, *Annual review of plant biology*, 60: 561-568.

- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P. & Krahulec F. (2006):** Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. *Taxon*, 55: 447-450.
- Suda J. (2011):** Průtoková cytometrie a její využití v botanice. In Mandák B., Krahulec F. & Hroudová Z. [eds.]: Evoluční aspekty biologie rostlin. *Zprávy České Botanické Společnosti*, Praha, Materiály 25: 21-42.
- Šípošová H. (1987):** Taxonomicko-chorologické štúdium *Galium pumilum* MURRAY s.l. na Slovensku (A taxonomic-chorological study of the *Galium pumilum* MURRAY s.l. in Slovakia). *Acta Botanica Slovaca, Academiae scientiarum slovacae, Série A*, 10: 97-169.
- Štěpánková J. (1997):** The effect of serpentine on morphological variation in the *Galium pumilum* group (*Rubiaceae*). *Thaiszia*, 7: 29-40.
- Štěpánková J. (2000):** *Galium* L. - svízel. In Slavík B. [ed.]: Květena České republiky 6, Academia, Praha, 122-156.
- Tájek P. (2003):** Hadcové výchozy ve Slavkovském lese z pohledu ostrovní biogeografie. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha, 17.
- Tausch I. F. (1935):** Bemerkungen über *Galium* und einige verwandte Gattungen, Flora Regensburg, 18: 337-351.
- Tsitrone A., Kirkpatrick M., Levin D. A. (2003):** A model for chloroplast capture. *Evolution*, 57: 1226-1782.
- Vollmann F. (1914):** Flora von Bayern. Christianische Belsersche Buchdruckerei, Stuttgart, 692-693.
- Zahradníková K. (1985):** *Galium anisophyllum* VILL. In Bertová L. [ed.]: Flóra Slovenska IV/2. VEDA, Bratislava, 48-50.

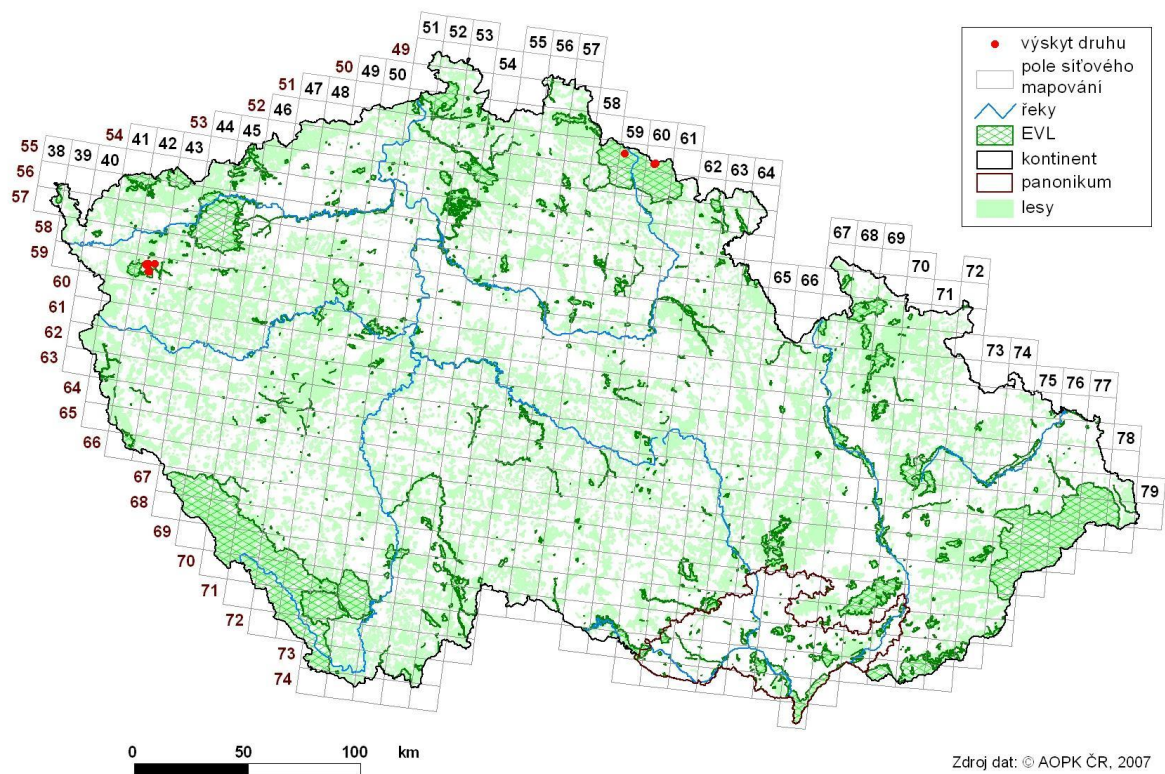
## 12. Přílohy



Příloha 1: *Galium sudeticum*, Čertova zahrádka, Krkonoše



Příloha 2: *Galium sudeticum*, Slavkovský les ([www.botany.cz](http://www.botany.cz))



**Příloha 3:** Mapa rozšíření *Galium sudeticum* ([www.biomonitoring.cz](http://www.biomonitoring.cz)).