

**Univerzita Karlova v Praze**

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Jana Bílá

Zdroje variability v *Sorbus aria* agg.

Sources of *Sorbus aria* agg. variation

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Praha, 2015



Prohlášení:

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

V Praze, 4.5.2015

Jana Bílá





Děkuji nejlepšímu školiteli na světě, Tomáši Urfusovi, za jeho rady, kritiku i chválu, za jeho skvělé umění motivovat.

Děkuji svému konzultantovi, Petru Vítovi, za výjimečnou pomoc především s bílou (molekulární) částí práce.

Děkuji Martinu Lepšímu za skvělou spolupráci.

Děkuji Lence Flaškové a Gábině za pomoc při laboratorním bloudění. Lence dále za nemalé ulehčení při izolacích.

Děkuji všem kamarádům – botanikům Lence, Monče, Kristý a Kristý, Adamovi a Majdě, u kterých jsem našla vždy velkou podporu a díky nimž je botanika ještě zábavnější.

Děkuji své úžasné rodině za jejich psychickou, fyzickou i finanční podporu za jakýchkoli okolností!

A hlavně, děkuji Ondrovi. Za všechno.

Práce byla financována z prostředků GAUK (projekt č. 259579).

## Abstrakt

Hlavními mikroevolučními mechanismy generujícími variabilitu ve skupině *S. aria* agg. i v celém rodu *Sorbus* jsou polyploidie a hybridizace. Spolu s diverzitou v reprodukčních mechanismech (a zejména apomixií) umožnily vzniknout celé řadě blízce příbuzných taxonů. Skupina *S. aria* agg. (podrod *Aria*) je výjimečná svou účastí ve všech mikroevolučně významných hybridizačních událostech v celém rodu, a je tedy zodpovědná za velkou část jeho různorodosti. Cílem předkládané práce tedy bylo zhodnotit mikroevoluční procesy této skupiny utvářející a uchovávající její vnitřní variabilitu užitím průtokové cytometrie, analýzy mikrosatelitů i numerické a geometrické morfometriky.

V České republice se vyskytují diploidní, triploidní a tetraploidní cytotypy jeřábů. Variabilita ploidních úrovní je u nás vázána pouze na jižní Moravu, která je i díky své taxonomické rozmanitosti centrem diverzity skupiny *S. aria* agg. i celého rodu *Sorbus* v ČR. Analýza semen jedinců *S. aria* agg. průtokovou cytometrií odhalila celkem 7 typů reprodukčních způsobů, zahrnujících sexuální i apomiktické (pseudogamické) rozmnožování s účastí redukovaných i neredukovaných gamet. Všichni diploidní jedinci jsou plně sexuální, kdežto u polyploidních taxonů převažuje apomixie, přičemž pouze u *S. danubialis* a linie "*pinetorum*" byl zaznamenán výraznější podíl pohlavního rozmnožování.

Jednotlivé druhy a izolované evoluční linie byly rozlišeny pomocí molekulárních markerů (mikrosatelitů). Nejvyšší míra genetické variability u sexuální diploidní *S. aria* s.str. odpovídá jejímu typu rozmnožování. Mezi fakultativně a obligátně apomiktickými polyploidními skupinami nebyla nalezena vazba genetické diverzity a míry sexuality. Podle mikrosatelitového pattern byly odhadnuty potenciální rodičovské druhy hybridogenních taxonů. Převážná většina vznikla křížením *S. aria* s. str. a *S. danubialis*. Jediná skupina pocházející z kombinace *S. aria* s.str. a *S. graeca* (případně *S. collina*) je *S. pannonica* agg. Na základě morfologických znaků lze od sebe jednotlivé taxony více méně odlišit, ale často dochází k překryvu znaků díky enormní fenotypové plasticitě jednotlivých druhů, ale i jedinců se shodným genotypem.

**Klíčová slova:** *Sorbus*, apomixie, hybridizace, polyploidizace, speciace, průtoková cytometrie, mikrosatelity.

## Abstract

The main drivers of microevolution in the genus *Sorbus* are interspecific hybridisation and polyploidy. The fate of new hybrid and polyploid taxa is determined by their mode of reproduction. Especially apomixis could be very advantageous for these new taxa. The *S. aria* agg. (subg. *Aria*) plays an important role within the genus since its members are involved in all hybridisation events and thereby is responsible for the substantial part of variation of the genus. Flow cytometry, molecular markers and multivariate morphological analyses were employed to evaluate the processes generating the variability in the *S. aria* group.

Three ploidy levels were detected among species from subg. *Aria* in the Czech Republic. All of them could be found in the South Moravia, whereas only tetraploids occur in the Bohemia region. Moreover, most of the Czech taxa (5 out of 7) grow also only in the South Moravia which is therefore considered as a centre of diversity of the genus *Sorbus* in the Czech Republic.

Flow cytometry seed screen revealed 7 modes of reproduction among the individuals from *S. aria* agg. A wide range of sexual and apomictic types of reproduction including reduced and unreduced gametes was detected. All of the diploid individuals are completely sexual. Among polyploid taxa, most of the species are obligate apomicts and only two species reproduce both sexually and asexually.

All taxa and lineages were defined using microsatellite markers. Genetic variation was then determined for each group. According to the assumption, the most variable species is diploid and sexual *S. aria* s.str. However, there is no correlation between the rate of residual sexuality and genetic variation among apomictic polyploids. Possible parental species of hybrids were identified based on multilocus genotypes. Most of the hybrids arose from crossing between *S. aria* s.str. and *S. danubialis*. Only one group (*S. pannonica* agg.) is a progeny of *S. aria* s.str. and *S. graeca* (or *S. collina*).

Basically, it is possible to distinguish all studied groups using morphological characters. However, the characters on leaves usually overlap. It is caused by the exceptional phenotypic plasticity of each species and even of the same genotypes.

**Keywords:** *Sorbus*, apomixis, hybridization, polyploidy, speciation, flow cytometry, microsatellites.

## Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Literární přehled .....	3
2.1.	Charakteristika rodu <i>Sorbus</i> .....	3
2.2.	<i>Sorbus aria</i> agg. ....	5
2.2.1.	Pojetí.....	5
2.2.2.	Základní druhy agregátu.....	7
2.2.3.	Studované hybridogenní druhy agregátu.....	9
2.3.	Zdroje variability u jeřábů.....	11
2.3.1.	Mezidruhovú hybridizace .....	11
2.3.2.	Polyploidizace .....	14
2.3.3.	Reprodukční způsoby – přechod k apomixii.....	17
3.	Metodika .....	21
3.1.	Sběr materiálu .....	21
3.2.	Průtoková cytometrie .....	25
3.2.1.	Analýza pletiv řapíku .....	25
3.2.2.	Analýza semen .....	25
3.2.3.	Analýza pylu.....	26
3.2.4.	Analýza dat.....	26
3.3.	Molekulární analýzy.....	27
3.3.1.	Izolace DNA.....	29
3.3.2.	Multiplexová PCR.....	29
3.3.3.	Vizualizace fragmentů.....	31
3.3.4.	Vyhodnocení dat.....	31
3.4.	Morfometrické analýzy .....	33
3.4.1.	Klasická morfometrika .....	34
3.4.2.	Geometrická morfometrika (eliptická Fourierova analýza) .....	35
3.5.	Experimentální křížení .....	35
4.	Výsledky .....	36
4.1.	Průtoková cytometrie .....	36
4.1.1.	Cytogeografie .....	36
4.1.2.	Reprodukční způsoby (FCSS).....	39
4.1.3.	Geografická vazba míry sexuality u <i>S. danubialis</i> na regiony ČR.....	48
4.1.4.	Analýza pylu.....	49
4.1.5.	Experimentální křížení .....	51
4.2.	Molekulární analýzy – mikrosatelity .....	52
4.2.1.	Analýza hlavních koordinát.....	53
4.2.2.	Sdílené alelické fenotypy .....	56
4.2.3.	Analýza molekulární variance (AMOVA).....	57
4.2.4.	Variabilita v rámci druhů .....	58



4.2.5.	Vnitropopulační variabilita široce rozšířených druhů.....	59
4.3.	Morfometrika.....	61
4.3.1.	Klasická (numerická) morfometrika.....	61
4.3.2.	Geometrická morfometrika.....	74
4.3.3.	Fenotypová plasticita klonů.....	78
4.4.	Výsledky analýz populací Ostrý a Bor u Hardeggu.....	80
5.	Diskuze.....	83
5.1.	Cytogeografie.....	83
5.2.	Reprodukční způsoby.....	84
5.3.	Genetická variabilita.....	89
5.4.	Morfologická variabilita.....	92
5.5.	Rozmístění variability jeřábů v rámci ČR.....	93
5.6.	Dopady mikroevolučních procesů na taxonomii.....	95
6.	Závěr.....	96
7.	Literatura.....	97
8.	Přílohy.....	104



## 1. | Úvod

Jednou z nejkomplicovanějších skupin naší dřevinné flóry je rod *Sorbus* L. (jeřáb), jehož výskyt je vázán na severní polokouli. Tento rod obsahuje přibližně 200 druhů (Warburg and Kárpáti, 1968; Aedo and Aldasoro, 1998), které jsou obvykle řazeny do pěti podrodů: *Sorbus*, *Cormus*, *Torminaria*, *Aria* a *Chamaemespilus*. Hlavní druhy těchto podrodů jsou diploidní, sexuální a dobře odlišitelné, a jsou proto označovány jako základní druhy celého rodu. Celkový počet druhů se díky rozpoznávání nových apomiktických linií neustále zvyšuje, ovšem v akceptování statutu druhu pro tyto mikrospecie existují značné rozpory (Warburg and Kárpáti, 1968; Challice and Kovanda, 1978; Aedo and Aldasoro, 1998; Rich et al., 2010).

Problematické hodnocení rodu *Sorbus* je dáno několika mechanismy. Především jde o schopnost většiny jeřábů se mezidruhově křížit. Výjimku tvoří pravděpodobně jen jeřáb oskeruše (*S. domestica*; Kovanda, 1961b; Warburg and Kárpáti, 1968). Mezi taxony schopné hybridizace patří jeřáb ptačí – *S. aucuparia* L., j. břek – *S. torminalis* (L.) Crantz, j. mišpulka – *S. chamaemespilus* (L.) Crantz a zejména jeřáby z podrodu *Aria* (skupina okolo jeřábu muku, *S. aria* agg.). Při hybridizačních událostech je vždy jedním z rodičů taxon ze skupiny *S. aria* agg., ostatní taxony se spolu nekříží (Kovanda, 1961, 1999; Warburg and Kárpáti, 1968).

Dalším mechanismem ovlivňujícím evoluci jeřábů je polyploidizace. Mezi základními druhy (tj. rodičovskými druhy) najdeme nejčastěji diploidy, ale byly zjištěny i triploidní cytotypy u *S. chamaemespilus* (Liljefors, 1953), tetraploidní cytotypy u *S. danubialis*, *S. aria* a dokonce i *S. torminalis* (Aldasoro et al., 1998; Vít, 2006). Polyploidní (tri, tetra a pentaploidní) jsou zpravidla všechny hybridogenní druhy (tzn. allopolyploidní; Bailey et al., 2008; Lepší et al., 2009; Rich et al., 2010; Vít et al., 2012).

Pravděpodobnost vzniku nové hybridní a/nebo polyploidní linie a její fixace je určena zejména reprodukčním mechanismem rostliny. Při hybridizačních událostech je potřebné sexuální rozmnožování, kterého ovšem posléze nově vzniklé linie často nejsou schopny. Pro jejich udržení je tedy nezbytná schopnost nepohlavního rozmnožování. V rámci lokality může stačit prosté vegetativní šíření (u jeřábů např. spontánní hřížení; Kociánová and Štursová, 1986). Avšak k větší pravděpodobnosti udržení a šíření může nově linii pomoci obzvláště apomixie (syn. agamospermie; Richards, 2003). Všechny polyploidní jeřáby jsou schopné apomiktického rozmnožování, většinou spojeného s nutností oplodnění endospermu, tzv. pseudogamií (Liljefors, 1953, 1955; Jankun and Kovanda, 1986, 1987; Dickinson and Campbell, 1991).

V rámci celého rodu *Sorbus* má skupina *S. aria* agg. zvláštní postavení, neboť tvoří základ evolučních procesů, jež v této složité skupině probíhají. Nejvíce zkoumané jsou dnes ovšem hybridogenní mikrospecie vzniklé křížením mezi *S. aria* agg. a jednotlivými podrody (viz např. Bernátová and Májovský, 2003; Mikoláš, 2003; Vít, 2006; Lepší et al., 2008),

kteře jsou až výsledkem, nikoli příčinou zmiňovaných procesů. Proto, chceme-li pochopit vztahy a procesy v celém rodu, je znalost druhů ze skupiny jeřábu muku klíčová.

Skupina *S. aria* agg. není jednoznačně taxonomicky určena. Jedná se o sběrnou skupinu pro druhy a linie z podrodu *Aria*, které se mezi sebou kříží a vytváří řadu polyploidních apomiktických linií (obyčejně hodnocených jako mikrospecie). Za základní druhy agregátu jsou většinou považovány druhy jeřáb muk (*S. aria* (L.) Crantz), j. okoličnatý (*S. umbellata* (Desf.) Fritsch) a případně i j. řecký (*S. graeca* (Spach) Schauer; Bresinsky, 1978; Nelson-Jones et al., 2002; Aldasoro et al., 2004; Meyer et al., 2005). Jejich potomky jsou například z našeho území známý jeřáb dunajský, *S. danubialis* (Jávorka) Kárpáti, či z Německa a Slovenska udávaný j. panonský, *S. pannonica* Kárpáti (Kutzelnigg, 1994).

Práce zabývající se doposud skupinou okolo jeřábu muku jsou především taxonomického rázu (Proctor et al., 1989; Houston et al., 2009; Rich et al., 2014). Kromě toho jsou procesy v této skupině regionálně specifické a ve střední Evropě najdeme zatím jen minimum studií, které se agregátem zabývají, navíc také jen z taxonomického hlediska (Meyer et al., 2005; Lepší et al., in press.). Touto diplomovou prací bych tedy ráda přispěla k objasnění procesů a vztahů ve skupině *S. aria* agg. na území České republiky a v jejím nejbližším okolí.

K objasnění vztahů mezi druhy u takto variabilních rostlin je vhodné kombinovat morfologické, karyologické a molekulární analýzy. V předkládané diplomové práci je pro zjištění cytotypové variability v geografickém měřítku použita průtoková cytometrie, která je dnes v botanice běžně používanou metodou ke zjištění stupně ploidie (relativní velikosti genomu; Loureiro et al., 2010). Touto metodou je také zjišťován způsob reprodukce, a to analýzou semen, při které se zjistí poměr embrya a endospermu, který je charakteristický pro jednotlivé typy rozmnožování (Matzk et al., 2000). Molekulární analýzy mikrosatelitů (krátkých repetitivních DNA sekvencí) jsou použity pro definování jednotlivých skupin (druhů a linií) v rámci agregátu a ke zhodnocení jejich variability na mezi i vnitropopulační úrovni. Pomocí mikrosatelitových markerů je také ověřen způsob reprodukce a směr hybridizace a introgrese. Pro objektivní zhodnocení fenotypové variability u jednotlivých skupin bylo užito jak numerické, tak geometrické morfometrické analýzy.

Předkládaná diplomová práce si klade za cíl odpovědět na následující otázky:

- Jaká je distribuce ploidních úrovní *S. aria* agg. (cytogeografie) na území ČR a v přilehlých oblastech?
- Jaké jsou převažující reprodukční mechanismy v rámci *S. aria* agg.?
  - Liší se proporce jednotlivých reprodukčních mechanismů mezi ploidiemi?
  - Jaké taxony jsou rodičovské a jakým směrem jde tok genů?
- Jaká je genetická variabilita populací *S. aria* agg.?
  - Odráží nějakým způsobem zjištěné reprodukční mechanismy?
- Jsou skupiny charakterizované kombinací ploidní úrovně a mikrosatelitového pattern odlišitelné pomocí numerické a geometrické morfometrické analýzy?
  - Odráží fenotypová variabilita zjištěné reprodukční mechanismy?

## 2. | Literární přehled

### 2.1. | Charakteristika rodu *Sorbus*

#### Zařazení v systému

Rod *Sorbus* patří do řádu Rosales a čeledi Rosaceae. V rámci čeledi je řazen do podčeledi Maloideae, kde jsou jeho nejbližšími příbuznými rody *Malus* a *Pyrus* (Campbell et al., 1995).

#### Morfologická charakteristika

Jeřáby jsou stromy a keře, které oproti většině ostatních rodů podčeledi Maloideae postrádají trny. Listy jsou jednoduché nebo lichozpeřené a palisty opadavé. Pupeny jsou kuželovité až vejčité se špičatými nebo tupými vrcholy. Květenství jeřábů je chocholičnatá lata. Květy jsou oboupohlavné, pravidelné, cyklické a původně pětičetné ve všech částech. V květech se tvoří pro čeleď Rosaceae typický útvar – nálevkovitá češule. Kališní cípy jsou u jeřábu povětšinou vytrvalé, častěji zasychají, nebo dužnatí, méně často opadávají. Korunní lístky mají okrouhlý až široce eliptický tvar při bílé až nažloutlé barvě, vzácněji i růžové. Tyčinek je 15-25. Jsou volné a uspořádané ve třech kruzích. Otevírání prašníků je podélné. Gyneceum může být pětičetné, popřípadě redukované až na dvoučetné (počet plodolistů je různý jak v rámci jednotlivých druhů, tak uvnitř jednoho druhu nebo dokonce jednoho jedince). Čnělky jsou u rodu *Sorbus* terminální a volné, případně srostlé ve spodní části. Semeník je spodní nebo polospodní. V každém pouzdře se nacházejí dvě anatropická vajíčka, ačkoli se do semene vyvine většinou jen jedno z nich. Plody jeřábů jsou malvice, mezi jednotlivými druhy odlišné velikostí, barvou i tvarem. Malvice má blanitý, kožovitý, chrupavčitý nebo peckovitý endokarp, zatímco mesokarp je vždy dužnatý a exokarp blanitý. Plod ve zralém stavu je většinou lysý. Jednotlivé druhy jeřábů se liší počtem a velikostí lenticel na povrchu malvice (Kovanda, 1961a, 1992; Warburg and Kárpáti, 1968; Májovský, 1992; Rich et al., 2010).

Jeřáby jsou opylovány hmyzem, který vábí vůní a nektarem. Můžou být alogamní, autogamní i apomiktické. Rozšiřování plodů probíhá pomocí endozoochorie (Kovanda, 1992; Rich et al., 2010).

#### Ekologie

Jeřáby jsou dlouhověké dřeviny. Na území České republiky se vyskytují zejména v termofytiku a mezofytiku, ale částečně zasahují i do oreofytika (Kutzelnigg, 1994; Kovanda, 1999; Rich et al., 2010). Většina druhů rodu *Sorbus* je světlomilných s výjimkou typicky lesního *S. torminalis* (L.) Crantz (jeřáb břek) a některých jeho kříženců. Některé

z dalších druhů jsou tolerantní ke stínu, avšak při zastínění nekvetou a nerostou plně (Rich et al., 2010). Jeřáby se na území střední Evropy vyskytují (spolu s jinými druhy teplomilných rostlin) zejména na strmých stráních, skalních výchozech, v dubových lesích a křovinách. Všechny druhy rodu tvoří ektotrofní mykorhizu (Kutzelnigg, 1994).

### **Rozšíření**

Oblastí výskytu rodu *Sorbus* je mírný pás severní hemisféry, zejména Eurasie. V Evropě jejich areál výskytu sahá od severní Afriky po sever Skandinávského poloostrova. Oproti Asii můžeme v Evropě pozorovat odlišný průběh mikroevoluce. V Asii se nachází největší počet sexuálních druhů, kdežto v Evropě mají převahu apomiktické druhy. V severní Americe se vyskytuje jen podrod *Sorbus* (Meusel et al., 1965; Warburg and Kárpáti, 1968; Kovanda, 1992; Kutzelnigg, 1994).

### **Vnitřní členění rodu**

V rodu *Sorbus* bylo mimo tradičně uznávaných sexuálních druhů i množství hybridogenních druhů (mikrospecií), jež byly popsány až v průběhu 20. století. Pro ilustraci v Květeně České republiky (1992) je rozlišeno 9 druhů jeřábů. V roce 1999 je seznam druhů v České Republice doplněn o 8 mezitím nově popsanych (Kovanda, 1999). Od té doby bylo popsáno ještě dalších 11 druhů (Lepší et al., 2008, 2009, 2013, in press.; Velebil, 2012; Vít et al., 2012), ale také byly na základě biosystematických revizí 4 taxony ze seznamu odebrány (Lepší et al., 2013, in press.). Nové druhy jsou stále rozeznávány a popisovány v celé Evropě (Bernátová and Májovský, 2003; Houston et al., 2009; Rich and Proctor, 2009; Rich et al., 2014), která je tak právem považována za jedno z center diverzity rodu *Sorbus* (Challice and Kovanda, 1978).

V rodu *Sorbus* je všeobecně uznáváno pět podrodů: *Sorbus*, *Cormus*, *Torminaria*, *Aria* a *Chamaemespilus* (Kovanda, 1961a; Májovský, 1992; Kutzelnigg, 1994; Rich et al., 2010). V České republice nalezneme čtyři z nich – nevyskytuje se zde monotypický podrod *Chamaemespilus* (*S. chamaemespilus* (L.) Crantz, jeřáb mišpulka). Nejbliže se jeřáb mišpulka vyskytuje v Alpách a Karpatech (Warburg and Kárpáti, 1968; Májovský, 1992). Někteří autoři považují rod *Sorbus* za polyfyletický a rozdělují ho na 5 menších rodů (*Sorbus*, *Cormus*, *Torminaria*, *Aria* a *Chamaemespilus*; Robertson et al., 1991; Campbell et al., 1995). V dalším pojetí dělí Gabrielian (1978; podle Aldasoro et al., 2004) jeřáby do šesti sekcí *Sorbus*, *Cormus*, *Torminaria*, *Aria*, *Chamaemespilus* a *Micromeles*, která obsahuje výhradně asijské druhy.

Základní podrody jsou jasně definované, snadno mezi sebou odlišitelné a obsahují primární sexuální druhy (kromě podrodu *Aria*). Vyjma základních podrodů rozlišujeme také hybridogenní taxony, které jsou řazeny do tří agregátů podle rodičovské kombinace, jež vedla k jejich vzniku. Rozlišujeme tedy *S. latifolia* agg., který pojímá druhy vzniklé křížením *S. aria* agg. a *S. torminalis*, *S. hybrida* agg. (nebo-li *S. anglica* agg. podle Nelson-Jones et al., 2002), obsahující potomky křížení *S. aria* agg. a *S. aucuparia*, a *S. sudetica* agg., kam jsou řazeny druhy s rodičovskou kombinací *S. aria* agg. a *S. chamaemespilus* (Kovanda, 1999).

Májovský a Bernátová (2001) alternativně vytvořili 4 nové hybridogenní podrody: *Soraria*, *Tormaria*, *Chamaespilaria* a *Chamsoraria*. Do těchto podrodů ale nelze zařadit všechny hybridní kombinace. Pro *S. intermedia*, trojnásobného hybrida mezi *S. aucuparia*, *S. aria* agg. a *S. torminalis* (Nelson-Jones et al., 2002), byl popsán samostatný podrod *Triparens* teprve nedávno (Rich et al., 2014).

### Pojetí druhu v rodu *Sorbus*

Definovat druh je v apomiktických rodech s častou mezidruhovou hybridizací většinou velice problematické, neboť u různých rodů probíhají odlišné procesy, které to znesnadňují. Proto bývá vymezení druhu specifické pro jednotlivé rody (např. Holub, 1995). U jeřábů se jako samostatný druh (mikrospecie) popisují jednotlivé hybridní linie vznikající z různých populací rodičů. Mezi mikrospeciemi jsou malé, ale vždy zřetelné rozdíly v alespoň některých znacích bez přechodných rysů. Tyto hybridogenní druhy jsou pomocí apomiktického způsobu rozmnožování reprodukčně izolovány, jejich potomstvo je tedy geneticky uniformní. Takto definovaný druh odpovídá koncepci biologického druhu (Flegr, 2009). Dále mají jasně vymezené areály rozšíření, které bývají velmi malé – často jsou popisovány lokální stenoendemy, které tvoří jedinou, či několik málo populací. Pro odlišení těchto mikrospecií se v posledních letech používá více biosystematických metod, především karyologických a molekulárních analýz (Campbell and Dickinson, 1990; Kovanda, 1999; Bernátová and Májovský, 2003; Lepší et al., 2008).

## 2.2. | *Sorbus aria* agg.

### 2.2.1. Pojetí

Druhy z podrodu *Aria* se mezi sebou kříží a vzniká tak řada polyploidních apomiktických linií či mikrospecií. Skupina *Sorbus aria* agg. slouží jako sběrná skupina pro tyto druhy a mikrospecie a navíc jsou do ní řazeny i vzniklé hybridogenní<sup>1</sup> jedinci či linie nejasného určení. Základními třemi druhy v této skupině jsou *S. aria* s.str.<sup>2</sup>, *S. graeca* (Spach) Schauer a *S. umbellata* (Desf.) Fritsch (Kárpáti, 1960; Bresinsky, 1978; Nelson-Jones et al., 2002; Aldasoro et al., 2004; Meyer et al., 2005; Šefl, 2007). Druhy této skupiny (podrodu *Aria*) se od ostatních podrodů liší následujícími morfologickými znaky: jednoduché listy, vytrvávající kalich, bílá, nebo trochu nažloutlá koruna, semeník složený ze dvou plodolistů a červené (zřídkaždy oranžové či nahnědlé) plody bez sklereidů (Challice and Kovanda, 1978; Májovský, 1992; Rich et al., 2010).

Agregát je chápán různými autory odlišným způsobem a navíc se vzhledem ke komplexnosti skupiny většina autorů vyjadřuje pouze k druhům, které se nacházejí na jimi

---

<sup>1</sup> nejsou myšleny hybridogenní mikrospecie vzniklé křížením s taxony z jiných podrodů

<sup>2</sup> *S. aria* s.str. je obvykle označení pro diploidní cytotyp. *S. aria* s.l. může být označení pro tetraploidní cytotyp nebo bývá použit jako synonymum k *S. aria* agg.

studovaném území. Například Nelson-Jones et al., 2002 chápou agregát jako synonymum k *S. aria* s.l. a podrodu *Aria*. Jmenovitě však do skupiny řadí jen ty druhy, které se vyskytují ve Velké Británii, a dále potom *S. graeca*, který je udáván na jedné lokalitě v Anglii (Proctor and Groenhof, 1992), jehož určení jako *S. graeca* však bylo zpochybněno (Chester et al., 2007). Ostatní druhy z podrodu nejsou v Nelson-Jones et al. zmíněny.

V Británii je agregát nejčastěji chápán jako skupina druhů odvozená od *S. aria* s.str. polyploidizací a dále vzájemnou hybridizací mezi taxony ve skupině. Do agregátu je na Britských ostrovech v současné době řazeno asi 20 druhů (Proctor et al., 1989; Chester et al., 2007; Houston et al., 2009; Rich and Proctor, 2009; Rich et al., 2009a,b). Rich et al. (2010) navíc doporučují zařadit stromy nejasného určení prozatímně do *S. aria*, dokud se neprokáže jejich původ.

Německé pojetí je založeno na dvou základních druzích, *S. aria* a *S. graeca*, a dvou hybridogenních druzích (odvozených od těchto dvou a *S. umbellata*) vyskytujících se v Německu – *S. danubialis* (Jávorka) Kárpáti a *S. pannonica* Kárpáti (Bresinsky, 1978; Meyer et al., 2005). Obdobně udává Májovský (1992) šest druhů ze skupiny *S. aria* agg. ze Slovenska. Jde o *S. aria* s.str., *S. graeca* a hybridogenní druhy vzniklé křížením mezi *S. graeca* a *S. aria*, respektive *S. umbellata*: *S. danubialis*, *S. pannonica*, *S. subdanubialis* a *S. thaiszii* (Soó) Kárpáti.

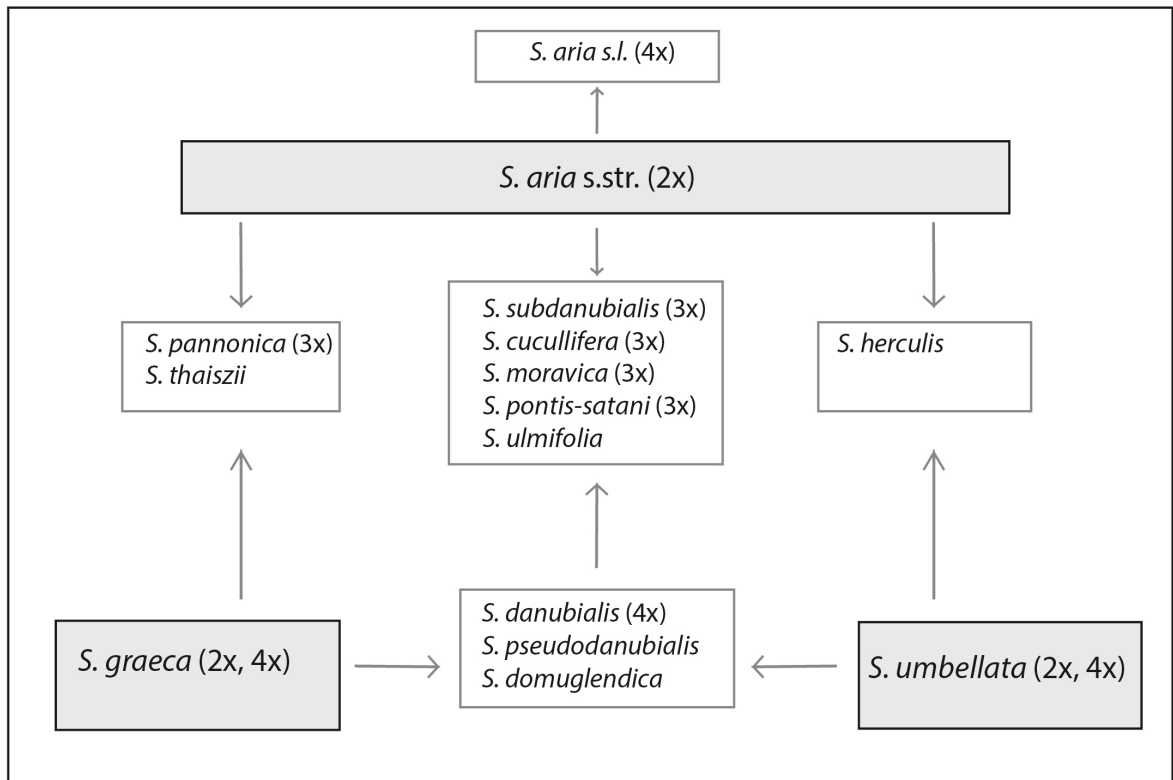
Český autor Šefl (2007) používá poněkud širší pojetí agregátu. Řadí do něj druhy nikoliv podle příbuznosti, nýbrž podle vzhledu – tedy druhy podobné muku. Do agregátu tak podle něj patří i *S. austriaca* (Beck) Prain et al. (taxon vzniklý hybridizací mezi *S. aria* a *S. torminalis*) a *S. carpatica* Borbás (hybridogenní druh vzniklý zpětným křížením *S. austriaca* se *S. aria*) vyskytující se v Národním parku Podyjí.

Odlišný koncept od doposud uvedených mají Španělé Aldasoro et al. (2004). Nerozlišují totiž mikrospecie odvozené od jeřábu muku, neboť všechny podle nich spadají do jeho variability. Nerozeznávají tak například ani *S. graeca*, který řadí pod *S. umbellata*. Jako agregát je v jejich pojetí chápán apomiktický komplex tří taxonů z podrodu *Aria*: *S. umbellata*, *S. aria* a *S. subfusca* (Ledebour) Boissier. Tento komplex je podle nich kvůli své velké variabilitě jen těžko analyzovatelný, a proto tedy nedoporučují rozlišovat jednotlivé mikrospecie.

V České republice se setkáme se sedmi druhy ze skupiny *S. aria*. Jedná se o *S. aria*, *S. collina* M. Lepší, P. Lepší et N. Meyer, *S. cucullifera* M. Lepší, P. Lepší, *S. danubialis*, *S. moravica* M. Lepší, P. Lepší, *S. pontis-satani* M. Lepší, P. Lepší a *S. thayensis* M. Lepší, P. Lepší (Kovanda, 2002; Šefl, 2003; Lepší et al., in press.). Dříve udávané taxony *S. graeca* (Kovanda, 1997) a *S. subdanubialis* (Šefl, 2003) nebyly při nejnovější revizi této skupiny potvrzeny – šlo pravděpodobně o nepřesné určení jedinců (Lepší et al., in press.). Vztahy vybraných druhů v rámci celého agregátu jsou nastíněny níže viz Obr. 1.



### Skupina *S. aria* agg.



**Obr. 1:** Schéma vztahů ve skupině *Sorbus aria* agg. (dle Kárpáti, 1960; Kutzelnigg, 1994; Aldasoro et al., 2004; Lepší et al., in press.)

#### 2.2.2. Základní druhy agregátu

Základní druhy ze skupiny *S. aria* agg. jsou velmi variabilní a jejich odlišení tak bývá velmi obtížné. V následujících popisech jsou uvedeny především znaky, díky kterým lze tyto taxony odlišit. U údajů týkajících se listů jsou vždy myšleny listy ze střední části sterilního brachyblastu.

##### *S. aria* (L.) Crantz (jeřáb muk)

Pupeny jsou dlouhé 6-9 mm, vejčitého až kuželovitého tvaru a řídce chlupaté. Listy jsou 10-12 cm dlouhé, výjimečně však až 14 cm. Listová čepel je tenká a velmi variabilní. Její tvar může být od vejčitého, přes obvejčitý, eliptický až k okrouhlému. Okraj listu jeřábu muku je jednoduše nebo dvojitě pilovitý, většinou nelaločnatý, ale jeho variabilita obsahuje i mírně laločnaté typy. Spodní strana listu je rovnoměrně bíle chlupatá. Žilek je 8-13 párů. Kališní lístky nabývají trojúhelníkovitého tvaru, jsou vytrvávající, za plodu překroucené, nebo rozprostřené, stejné délky jako češule, nebo kratší. Plody velikosti 8-15 mm jsou rozličně tvarované, zpravidla však delší než širší. Obvykle jsou posety mnoha malými lenticelami. V rámci velmi variabilního druhu *S. aria* je popsáno několik variet, které ale rozsahem morfologických znaků tvoří téměř kontinuum (Kovanda, 1961b, 1992; Warburg and Kárpáti, 1968; Aldasoro et al., 2004; Rich et al., 2010).

Areálem výskytu *S. aria* je střední a jižní Evropa a v roztroušené formě také severní Afrika. Rozsah rozšíření sahá od Španělska po Balkán a od severní Afriky po Británii. U nás najdeme jeřáb muk pouze na jižní Moravě (Meusel et al., 1965; Warburg and Kárpáti, 1968; Slavík, 1998; Lepší et al., in press.).

#### ***S. graeca*** (Spach) Schauer (jeřáb řecký)

Jeřáb řecký má pupeny jen 5-7 mm dlouhé, tedy menší než jeřáb muk. Pupeny jsou vejčité a téměř lysé. Listy jsou 5-9 cm dlouhé, 4-7 cm široké, obvejčité či okrouhlé, dvojitě pilovité, nelaločnaté a kožovité. List je na spodní straně zelenobíle chlupatý. Najdeme na něm 7-9 párů vystupujících žilek. Kališní lístky jsou vždy delší než češule, úzce trojúhelníkovité, vzpřímené za plodu. Plody jsou malvice, více méně kulovitěho tvaru, menší než 12 mm a jsou řídce pokryté velkými lenticelami (Warburg and Kárpáti, 1968; Májovský, 1992).

*Sorbus graeca* je velmi rozporuplný taxon. Není často vůbec odlišován, bývá řazen pod *S. umbellata* či pod *S. aria*. Jeho rozšíření není tudíž vzhledem k odlišným pojetím autorů v různých zemích zcela jasné (Gabrielian, 1972; Kovanda, 1997; Aedo and Aldasoro, 1998; Aldasoro et al., 2004). Z potvrzených výskytů se jeřáb řecký vyskytuje ve střední a jižní Evropě a jihozápadní Asii. V České republice byl Kovandou (1997) udáván v Národním parku Podyjí a v Moravském krasu. Novější studie jeřábů na jižní Moravě však ukázaly, že moravští jedinci pokládání za *S. graeca* spadají do variability *S. danubialis* (Šefl, 2007; Lepší et al., in press.).

#### ***S. umbellata*** (Desf.) Fritsch (jeřáb okoličnatý)

Pupeny jsou 4-6 mm velké, vejcovité a chlupaté. Listy jsou 4-6 cm (maximálně 10 cm) dlouhé a 5,5-6,5 cm široké, obvejčité až okrouhlé, dvojitě pilovité až mělce laločnaté, kožovité a ze spodu bíle plstnaté. Na listu je 5-7 párů postranních žilek. Kališní lístky jsou vytrvávající. Plodem jsou 9-16 mm dlouhé malvice, kulovitěho tvaru s výraznými i nevýraznými lenticelami. Některé typy *S. umbellata* jsou díky jeho polymorfii popsány jako variety (Kárpáti, 1960; Gabrielian, 1972; Aldasoro et al., 2004).

*S. umbellata* se vyskytuje ve východním mediteránu. Na sever dosahuje na Balkánský poloostrov a do jihozápadního Rumunska (Gabrielian, 1972; Aldasoro et al., 2004).

### 2.2.3. Studované hybridogenní druhy agregátu

#### → tetraploidní

*S. collina* M. Lepší, P. Lepší et N. Meyer (j. chlumní)

Čepel listů jeřábu chlumního je kožovitá, široce eliptická až okrouhlá (připomínající tvarem tenisovou raketu), dlouhá 9-10 cm a široká 7-7,5 cm. Okraj listu je pravidelně jednoduše nebo dvojitě, výjimečně i trojitě pilovitý. Postranních žilek má tento druh 9-10 na každé straně. Mezi 2. a 3. žilkou je na okraji čepele 8-9 zubů (Lepší et al., in press.).

Jeřáb chlumní se vyskytuje ve střední Evropě – od severovýchodního Bavorska po severozápad Maďarska. V České republice ho najdeme pouze ve středních Čechách (Lepší et al., in press.).

*S. danubialis* (Jávorka) Kárpáti (j. dunajský)

Udává se jako kříženec *S. umbellata* a *S. graeca*. Listy jeřábu dunajského jsou okrouhle kosníkovitého tvaru a kožovité. Čepel má 7-9 (maximálně 10) cm dlouhou a 6-7 cm širokou s 8-10 páry postranních žilek. Okraj čepele bývá jednoduše nebo dvojitě pilovitý, výjimečně i trojitě. Počet zubů mezi 2. a 3. žilkou od báze je 6-8 (Kárpáti, 1960; Lepší et al., in press.).

Jeho rozšíření je ostrůvkovité v celé střední a jihovýchodní Evropě. V České republice roste roztroušeně ve středních a severozápadních Čechách a na jižní Moravě (Kárpáti, 1960; Kovanda, 1992).

*S. thayensis* M. Lepší et P. Lepší (j. podyjský)

Listy jeřábu podyjského mají tvar více méně široce eliptický až téměř okrouhlý. Čepel je kožovitá, dlouhá 10-12 cm a široká 7-8,5 cm, pravidelně, jemně a ostře dvojitě či trojitě pilovitá na okraji. Mezi 2. a 3. žilkou od báze je 8-11 zubů. Počet žilek na každé straně se pohybuje v rozmezí 9-10 (Lepší et al., in press.).

*Sorbus thayensis* je vázaný pouze na kaňon řeky Dyje v blízkosti města Hardegg. Vyskytuje se jak na levém břehu (tedy v NP Podyjí), tak na pravém (v NP Thayatal), kde je o něco málo hojnější (Lepší et al., in press.).

#### → triploidní

*S. cucullifera* M. Lepší et P. Lepší (j. kornoutolistý)

Listová čepel jeřábu kornoutolistého je více méně široce eliptická až obvejčitá, kožovitá, spíše matná, 8-10 cm dlouhá a 5-5,5 cm široká a může být na okraji zvlňená. Listy osluněných jedinců jsou typicky vzpřímené a překrývají se a připomínají tak kornout. Okraje listů jsou pravidelně jemně dvojitě až trojitě pilovité. Zuby, ve kterých končí hlavní žilky,

jsou ostřejší a větší než ostatní. Počet zubů mezi 2. a 3. žilkou od báze je 9-10. Na každé straně se nachází 9-10 žilek (Lepší et al., in press.).

*Sorbus cucullifera* se vyskytuje v širším okolí města Hardegg v kaňonu řeky Dyje a jejího přítoku Fugnitz. Pravděpodobně vznikl křížením *S. aria* s.str. a *S. danubialis* (Lepší et al., in press.).

#### ***S. moravica*** M. Lepší et P. Lepší (j. moravský)

Jeřáb moravský má listy široce eliptické až podlouhle široce eliptické a také kožovité. Čepel je u tohoto druhu dlouhá 8-9 cm a široká 4,5-5,5 cm a po okraji pravidelně dvojitě či trojitě pilovitá. Zuby, ve kterých končí hlavní žilky, jsou ostřejší a větší než ostatní. Mezi 2. a 3. žilkou od báze je 6-8 zubů. Na listu je průměrně 9 párů žilek (Lepší et al., in press.).

*Sorbus moravica* je stenoendemitem Suchého Žlebu v Moravském krasu. Pravděpodobně vznikl křížením *S. aria* s.str. a *S. danubialis* (Lepší et al., in press.).

#### ***S. pontis-satani*** M. Lepší et P. Lepší (j. čertův)

Listy jeřábu čertova jsou široce eliptické a kožovité. Čepel je 6,5-8 cm dlouhá a 4,5-5 cm široká, obvykle zvlněná na okraji s pravidelným jemným dvojitým až trojitým pilováním. Zuby, ve kterých končí hlavní žilky, jsou ostřejší a větší než ostatní. Mezi 2. a 3. žilkou od báze je 8-10 zubů. Na každé straně listu je většinou 8 žilek (Lepší et al., in press.).

*Sorbus pontis-satani* se vyskytuje pouze v Suchém Žlebu v Moravském krasu. Pravděpodobně vznikl křížením *S. aria* s.str. a *S. danubialis* (Lepší et al., in press.).

#### ***S. subdanubialis*** (Soó) Kárpáti

Jedná se o křížence *S. aria* s.str. a *S. danubialis* jehož listy jsou kopinaté či deltovitě kopinaté, u vrcholu hrubě pilovité a nezřetelně až mírně laločnaté. Čepel je téměř kožovitá, dlouhá nejvýše 7,6 cm a široká do 5,5 cm. Postranních žilek je 9-10 párů (Kárpáti, 1960; Májovský, 1992).

Vyskytuje se v panonské oblasti v Maďarsku s přesahem na Slovensko (Kárpáti, 1960; Májovský, 1992).

## 2.3. | Zdroje variability u jeřábů

Komplikovaný rod *Sorbus* je řazen mezi „TCGs“ (taxonomically complex groups, Ennos et al., 2005). Složitost jeřábů je dána jejich schopností mezidruhové hybridizace a polyploidizace a v neposlední řadě i širokým spektrem reprodukčních způsobů včetně apomixie (Liljefors, 1955; Kovanda, 1961a, b).

### 2.3.1. Mezidruhová hybridizace

Hybridizace může být chápána na různých úrovních – uvnitř či mezi populacemi, druhy či rody. Nejčastějším pojetím je hybridizace mezidruhová, při které dochází ke splynutí gamet od dvou různých druhů (Wisseemann, 2007).

U rostlin je hybridizace (nadále ve smyslu mezidruhového křížení) fenoménem, který je soustředěný do relativně omezeného počtu čeledí (16-34 %) a rodů (6-16 %). Skupiny, ve kterých se druhy mezi sebou kříží, jsou převážně cizosprašné, mají vytrvalou životní formu a schopnost nepohlavního rozmnožování. Tyto vlastnosti jsou potřebné pro úspěšné přežití a rozšíření vzniklých hybridů (Ellstrand et al., 1996).

Hybridní linie se stabilizuje, pokud mezi ní a mateřským druhem vznikne reprodukčně izolační bariéra. Ta může být dvojího typu: prezygotická či postzygotická. Prezygotické mechanismy brání, aby nedošlo k oplodnění. Můžou to být různé ekologické, fenologické a etologické bariéry nebo gametická kompetice či inkompatibilita. Postzygotické bariéry fungují až po oplodnění – snižují viabilitu a fertilitu hybridních zygot, případně až dalších generací hybridních potomků (Rieseberg and Carney, 1998). K úplné izolaci přispívají více prezygotické bariéry, které jsou také prokazatelně silnější (Ramsey et al., 2003; Lowry et al., 2008).

Při zkoumání znaků hybridů je zřejmé, že tyto potomky nelze popsat pouze pomocí Mendelových zákonů (o uniformitě potomků hybridizace a jejich intermediárním charakteru). Kříženci jsou spíše mozaikou znaků obou rodičů a znaků přechodných. Také byla pozorována aditivní dědičnost, například u obsahu sekundárních metabolitů (Rieseberg and Ellstrand, 1993; Rieseberg and Carney, 1998; Wisseemann, 2007). Aditivní dědičnost může figurovat i u kvantitativních znaků, které jsou kódovány více geny. Kříženci mohou obývat intermediární prostředí, ale pokud získají kombinaci genů ovlivňujících kvantitativní znak ve stejném směru od obou rodičů, můžou získat fenotyp vhodný i do extrémního prostředí (Rieseberg and Willis, 2007).

### Hybridní speciace

Hybridizace může reprezentovat důležitý mechanismus saltační speciace, kdy nový taxon vzniká naráz a v kontaktu s mateřskými druhy (tj. sympatricky; Briggs and Walters, 2001). Mezidruhové křížení může být důležitým stimulem pro speciaci především v malých nebo okrajových populacích (Rieseberg, 1997). Hybridní speciace může mít dvě podoby – homoploidní a polyploidní.

Při homoploidní hybridní speciaci je ploidní úroveň hybridu shodná s jeho rodiči (Rieseberg and Willis, 2007). Homoploidní kříženci mívají problémy s párováním chromozomů při meióze, což způsobuje jejich častou sterilitu (Briggs and Walters, 2001). Pokud kříženec zůstane alespoň z části plodný a vytvoří si reprodukční bariéru proti rodičovským druhům (např. rychlou evolucí karyotypu, prostorovou izolací či ekologickou diferenciací), dojde k oddělení hybridní linie a vzniku nového druhu (Rieseberg and Willis, 2007). Tento způsob vzniku nového druhu je u rostlin patrně velice vzácný, neboť doposud bylo uspokojivě potvrzeno jen osm případů (Rieseberg, 1997). Častým východiskem z problémů s nevyváženým genomem homoploidních kříženců je jejich následná polyploidizace – znásobení celé sady chromozomů – čímž vznikne allopolyploid (Hegarty and Hiscock, 2005).

Allopolyploidní hybrid vzniká také přímo při polyploidní hybridní speciaci. Díky rozdílné ploidii je nově vzniklý kříženec okamžitě reprodukčně izolován od svých rodičů, neboť při zpětném křížení vzniklého polyploida (např. tetraploida jako nejjednoduššího případu) s diploidním mateřským jedincem vznikne triploidní jedinec. Rostliny s lichým ploidním stupněm jsou často neplodné, protože nejsou schopny produkce redukováných gamet (Hegarty and Hiscock, 2005; Rieseberg and Willis, 2007; Flegr, 2009). Udržení nové hybridní linie je také značně závislé na typu reprodukčního mechanismu. Výhodou pak bývá nepohlavní rozmnožování pomocí apomixie (Wissemann, 2007).

Vznik nového druhu prostřednictvím hybridní speciace může být velmi rychlý. Například výsledky studie zabývající se hybridy v rodu *Helianthus* L. uvádí, že ke stabilizaci nového hybridního druhu může dojít i za méně než šedesát generací (Ungerer et al., 1998). K hybridizaci následované speciací dochází často opakovaně. Díky tomu jsou potomci stejných rodičů často fenotypově rozdílní a bývají označeni jako různé druhy (Hegarty and Hiscock, 2005).

Mezidruhová hybridizace může hrát roli v adaptivní evoluci. Tento fakt byl potvrzen například při studiu již zmíněného rodu *Helianthus*. Porovnáním dávných a umělých hybridů divokých slunečnic byly nalezeny shodné znaky (tedy znaky vzniklé přímo při křížení, ne až pozdějším vývojem), které umožňují přizpůsobení různým ekologickým podmínkám (Rieseberg et al., 2003).

### **Introgrese**

Při introgresi dochází k přenosu genů jednoho druhu do genomu druhého druhu prostřednictvím spontánní hybridizace následované zpětným křížením (Briggs and Walters, 2001). Tento fenomén je častý v disturbovaném prostředí, ať už se jedná o přirozeně či antropogenně narušované habitáty. Hybridi tak pomocí introgrese geneticky modifikují sousední populace rodičovských druhů (Anderson and Stebbins Jr, 1954).

### **Hybridizace v rodu *Sorbus***

Hybridizace je velmi častým jevem nejen v rodu *Sorbus*, ale i v celé čeledi Rosaceae (Ellstrand et al., 1996). V rámci podčeledi Maloideae dochází k mezidruhovému, ale i mezirodovému křížení. Přítomnost hybridizace velice stěžuje fylogenetickou rekonstrukci

v rámci této skupiny. Mezidruhové křížení v podčeledi pravděpodobně neznačí evoluční příbuznost jednotlivých rodů, ale je spíše dáno slabými reprodukčními bariérami (Robertson et al., 1991; Campbell et al., 1995).

K hybridizaci u jeřábů dochází mezi fenotypicky odlišnými, ale geneticky blízkými druhy. Jediný ze základních druhů rodu, který se nekříží, je *Sorbus domestica*. Z ostatních taxonů se *S. torminalis*, *S. aucuparia* a *S. chamaemespilus* kříží s jedinci ze skupiny *S. aria* agg., ale nekříží se mezi sebou navzájem (Kovanda, 1961b, 1999; Warburg and Kárpáti, 1968). Analýzou plastidové DNA byly u dvou hybridogenních skupin vyskytujících se v Británii (podrody *Soraria* a *Tormaria*) určeny rodičovské taxony – u všech hybridů byl mateřským druhem *S. aucuparia*, respektive *S. torminalis* a otcovským vždy *S. aria* (Chester et al., 2007). Dále je skupina *S. aria* agg. výjimečná tím, že dochází i k četným hybridizacím mezi jednotlivými druhy v rámci této skupiny (Kárpáti, 1960).

Vzniklé křížence lze rozdělit na primární hybridy (F1 generace) a hybridogenní druhy. Primární hybridy jsou vzácní. Bývají z části, nebo úplně neplodní a vyskytují se společně s rodičovskými taxony. Pravděpodobně nemají velký význam z evolučního hlediska, ale výrazně přispívají k fenotypové variabilitě v rámci populace (Kovanda, 1961b, 1999). V České republice se primární kříženci jeřábů vyskytují jen sporadicky. Najdeme zde např. *S. ×kitaibeliana* Baksay et Kárpáti či *S. ×abscondita* Kovanda (Kovanda, 1999). Hybridogenní druhy jsou linie o větším počtu jedinců, kteří se vyskytují i osamoceně od svých rodičů. Tyto druhy se vyznačují ustálenou kombinací znaků, nízkou variabilitou a bývají plně plodné (Kovanda, 1961b, 1999).

Opakovaný vznik některých hybridogenních druhů jeřábů v zahraničí byl zkoumán pomocí molekulárních analýz mikrosatelitů. Výsledky ukazují na možný mnohonásobný původ druhů, neboť u některých taxonů byla nalezena větší variabilitu, než by se dala očekávat u apomikticky se rozmnožujících jedinců. Další zdroj rozmanitosti těchto druhů jsou mutace a také ponechání si alespoň zbytkové sexuality (Nelson-Jones et al., 2002; Robertson et al., 2004a, 2010).

Druhy ze skupiny *Sorbus aria* agg. se mohou zpětně křížit se vzniklými hybridy za vzniku ještě většího počtu nových linií. Schopnost zpětné hybridizace ovšem umožňuje genový tok od ostatních základních druhů rodu *Sorbus* směrem k *S. aria* agg. (Liljefors, 1955; Kovanda, 1961b; Warburg and Kárpáti, 1968). Introgresivní hybridizace byla studována pomocí morfologického srovnávání, zjišťování fertility nebo molekulárních markerů (analýzou chloroplastové DNA, která je dědičná po mateřské linii). Jednosměrná introgrese od *S. torminalis* do *S. aria* byla zaznamenána ve střední Evropě a Velké Británii (Aas et al., 1994; Price and Rich, 2007). Ve Francii byla pozorována i opačná introgrese, tedy ze *S. aria* k *S. torminalis*, ale jen v minimální míře. Převládajícím směrem introgresivní hybridizace je i tam k *S. aria* (Oddou-Muratorio et al., 2001).

Mezidruhová hybridizace a zpětné křížení jsou primárním zdrojem genetických novinek v apomiktickém komplexu rodu *Sorbus*. Fixací nově vzniklých genotypů prostřednictvím apomixie vznikají navzájem reprodukčně izolované mikrospecie. Ty si ovšem často ponechávají částečnou schopnost sexuálního rozmnožování a příležitostně se tak mohou účastnit další hybridizace. Tyto procesy tvoří komplexní „pattern“ probíhající retikulární evoluce rodu *Sorbus* (Robertson et al., 2010).

### 2.3.2. Polyploidizace

Při polyploidizaci dochází ke zmnožení celé chromozomové sady (Stebbins, 1971). Je známa u velkého spektra eukaryotních organismů. Výskyt polyploidie je častý hlavně v říši rostlin, lze se s ní však setkat i u živočichů – především ryb a obojživelníků (Briggs and Walters, 2001; Chen, 2007; Suda, 2009). Překvapivým nálezem dvou polyploidních hlodavců v Argentině bylo vyvráceno přesvědčení, že polyploidie není u savců slučitelná se životem (Gallardo et al., 1999).

Nápadně vzácný je výskyt polyploidie u hub a nahosemenných rostlin. U řas a mechorostů byl pozorován ve více případech, ovšem opravdu častý je u kaprad'orostů. Přibližně 95% ze všech druhů kaprad'orostů má znásobený genom a najdeme mezi nimi zároveň i rostlinu s nejvyšší ploidií. Některé populace tropické kapradiny *Ophioglossum reticulatum* L. mají genom zmnožený dokonce 96 krát (Khandelwal, 1990; Briggs and Walters, 2001).

U krytosemenných rostlin je určení frekvence výskytu polyploidie velmi obtížné. Díky různému pojetí základního chromozomového čísla  $x$  se odhady pohybovaly v rozpětí 30-70 % polyploidních druhů krytosemenných rostlin (Briggs and Walters, 2001; Soltis et al., 2003). Poslední výzkumy pomocí molekulárních metod ale ukázaly, že za polyploidní můžeme považovat všechny krytosemenné rostliny s výjimkou primitivního druhu *Amborella trichopoda* Baill., který je sesterský k ostatním taxonům krytosemenných. U rodu *Amborella* nebyla žádná duplikace genomu prokázána. K polyploidní události ale došlo krátce po diverzifikaci krytosemenných (a po oddělení druhu *A. trichopoda*), takže všechny ostatní druhy jsou dávnými polyploidy (Soltis et al., 2009). Studium polyploidizace je však zaměřeno především na mladší, jasně odlišitelné neopolyploidy. Z hlediska rozšířenosti polyploidie a její důležitosti pro člověka je zajímavé, že většina lidské civilizace je závislá na konzumaci polyploidních rostlin. Čtyři nejrozšířenější hospodářské plodiny – pšenice, rýže, kukuřice a sója – jsou polyploidní (Suda, 2009).

Podle způsobu vzniku lze polyploidy rozdělit na dvě skupiny: autopolyploidy a allopolyploidy. Autopolyploidní genom je odvozen z chromozomové sady jediného druhu. Allopolyploid obsahuje více různých chromozomových sad, neboť vzniká mezidruhovou hybridizací (Briggs and Walters, 2001; Soltis et al., 2003; Hegarty and Hiscock, 2008). V přírodě se ale lze setkat i s mnoha přechodnými typy, které není možné kategorizovat takto jednoduše (Leitch and Bennett, 1997). Dále můžeme polyploidy označit za neopolyploidy, pokud k jejich vývoji došlo v průběhu mladších čtvrtohor, nebo za paleopolyploidy, jsou-li starší (Ramsey and Schemske, 2002; Vít and Suda, 2006).

Polyploidie u auto- i allopolyploidních rostlin může vzniknout třemi cestami. Při první z nich vzniká somatická genomová duplikace způsobená narušením mitotického dělení (například tepelným šokem nebo experimentálně působením kolchicinu), díky čemuž se chromozomy nerozejdou do dceřiných buněk, ale zůstanou v jedné. Tímto způsobem vznikají polyploidní části (větve, výhony) na diploidních rostlinách. Dalším způsobem vzniku polyploidie je tzv. triploidní most. Nejprve dojde ke spojení redukované ( $1n$ ) a neredukované ( $2n$ ) gamety a vznikne triploidní jedinec. Triploidi jsou převážně sterilní, ale výjimečně mohou tvořit neredukované gamety ( $3n$ ). Pokud je tato neredukovaná triploidní



gameta oplodněna redukovanou gametou pocházející od diploidního předka, vznikne již stabilní tetraploid. Posledním a nejčastějším mechanismem vzniku polyploida je spojení neredukovaných gamet. Ty vznikají nejčastěji při narušení prvního redukčního dělení při meióze (Ramsey and Schemske, 1998; Briggs and Walters, 2001; Rieseberg and Willis, 2007; Flegr, 2009).

Polyploidní rostliny obvykle vykazují odlišné vlastnosti než jejich diploidní předci. Nejuniverzálnějším efektem je nárůst velikosti buňky, který ovšem nemusí vždy ústít ve zvětšení celé rostliny, neboť při zdvojení genomu je často snížen počet dělení buněk. Tzv. „efekt gigas“ pozorujeme hlavně v orgánech, které mají determinovaný počet buněk, ze kterých jsou složeny, např. květy či semena. Někteří polyploidi se od svých předků liší i ve tvaru orgánů, nejčastěji listů (Stebbins, 1971; Levin, 1983).

Nově vzniklí autopolyploidi jsou kvůli problémům při redukčním dělení většinou sterilní. Každý chromozom v genomu autopolyploida má při meióze možnost spárovat se se třemi dalšími, takže kromě bivalentů vznikají i univalenty a multivalenty. Chromozomy se tak do dceřiných buněk nerozdělí rovnoměrně a vzniknou nevyvážené sterilní gamety. U allopolyploidů se takové problémy s meiózou nevyskytují, protože každý chromozom jejich genomu má jen jeden protějšek. Při meióze tak vzniká jen dvojnásobný počet bivalentů, které se ovšem do dceřiných buněk rozdělí rovnoměrně (Stebbins, 1971; Briggs and Walters, 2001). Další častou výhodou allopolyploidů je, že díky odlišným ekologickým nárokům vůči svým rodičům si s nimi nekonkurují (Briggs and Walters, 2001). Řada polyploidů vykazuje větší genetickou variabilitu než jejich diploidní předci (Soltis et al., 2003). To může být způsobeno polytopním vznikem, nebo následným křížením mezi polyploidy, jež vznikly z různých populací stejných rodičovských druhů (Briggs and Walters, 2001). Polyploidie u rostlin ovlivňuje jejich interakci s živočichy – opylovači a herbivory. Zatím ale nebyl popsán obecný směr vlivu (Thompson et al., 2004).

Po zdvojení genomu následují jeho další přestavby a reorganizace. Nejčastější přestavbou je umlčování genů („gene silencing“; Soltis and Soltis, 1999; Hegarty and Hiscock, 2008). Geny z „nadbytečných“ chromozomových sad jsou k dispozici molekulární evoluci. Mohou snadno mutovat bez ztráty důležitých funkcí (ty zastávají geny z druhého genomu) a sloužit jako substrát pro vznik nových genů. Polyploidizace tak může usnadnit vznik adaptivních vlastností (Chen, 2007; Flegr, 2009).

Nově vzniklý polyploid musí na cestě ke stabilizaci překonat spoustu překážek, na což potřebuje čas. Pro polyploidní rostliny je tedy výhodný dlouhý životní cyklus – polyploidi jsou převážně víceleté byliny. Další výhodou je schopnost vegetativního rozmnožování, a to buď fragmentací (oddenky, pacibulkami apod.) nebo apomixií (Stebbins, 1971; Briggs and Walters, 2001). Jsou-li polyploidní rostliny plodné, mají v populaci „nevýhodu malých čísel“. S větší pravděpodobností se k nim přenesou pyl rodiče, než jiného polyploida (také může být polyploid v populaci jediný). Aby tomu zabránili, jsou ve větší míře autogamní. Samosprašnost u diploida vede k rychlé inbrední depresi a vzniku nevýhodné homozygotnosti, ale u polyploida vzniká homozygotní stav až po daleko větším počtu autogamních křížení, samoopylení tudíž nepředstavuje tak závažný problém. Obecně je tedy znásobení genomu u rostlin často spojeno se změnou reprodukčního způsobu (Briggs and Walters, 2001).

## **Polyploidní speciace**

Pokud dojde ke stabilizaci polyploidní linie, mluvíme o polyploidní speciaci. Stejně jako hybridní speciace, patří i tento způsob vzniku druhu do saltačních a sympatrických mechanismů (Briggs and Walters, 2001). Plně izolovaný polyploidní druh může vzniknout velice rychle – i v jediné či ve dvou generacích (Rieseberg and Willis, 2007). Polyploidizace je u rostlin nejběžnějším mechanismem sympatrické speciace. Odhady hovoří o 2-4 % speciálních událostí u krytosemenných rostlin a dokonce o 7 % u kaprad'orostů způsobených polyploidizací (Otto and Whitton, 2000).

U mnohých, polyploidních taxonů byl prokázán opakovaný vznik – na různých místech a z různých populací rodičů (Briggs and Walters, 2001; Soltis et al., 2003). U polyploidního jedince může dojít k dalšímu zdvojení genomu a jednotlivé skupiny rostlin se tak mohou lišit v míře polyploidizace (Stebbins, 1971; Rieseberg and Willis, 2007).

Zdvojení genomu je často spojené s vnitrodruhovou či mezidruhovou hybridizací. Pro úspěšnost polyploidizace je tak důležitá i stabilizace hybrida a útěk z hybridní sterility (Levin, 1983; Ramsey and Schemske, 1998).

## **Polyploidizace v rodu *Sorbus* a ve skupině *S. aria* agg.**

Základní chromozomové číslo celé podčeledi Maloideae je  $x=17$ , což představuje neobvykle vysoké číslo v rámci čeledi Rosaceae. Dříve byla široce rozšířená teorie o vzniku této podčeledi prostřednictvím hybridizace mezi vzdálenými jedinci z jiných podčeledí (Campbell et al., 1995). Poslední studie však ukázala na monofyletický vznik Maloideae (prostřednictvím polyploidizace a hybridizace mezi jedinci stejné linie) a vysvětluje vznik lichého základního chromozomového čísla aneuploidii z čísla  $x=18$  (Evans and Campbell, 2002).

Polyploidizace je u jeřábů velmi běžná. Hybridogenní ustálené druhy jsou zpravidla polyploidní (jedná se tedy o allopolyploidy). Výjimkou jsou například někteří diploidní jedinci *S. latifolia* (Lam.) Pers. udávaní z Velké Británie a Francie (Bailey et al., 2008). Všechny hybridogenní druhy udávané z České republiky jsou triploidní nebo tetraploidní (Vít, 2006; Lepší et al., 2008, 2009; Vít et al., 2012). V Evropě byli nalezeni i pentaploidní jedinci, kteří jsou ovšem velice vzácní. Ve Velké Británii se jedná o dva ploidně homogenní taxony (Pellicer et al., 2012), kdežto v Maďarsku bylo zatím nalezeno jen několik jedinců (Németh and Bílá unpubl.).

Rodičovské druhy hybridů jsou nejčastěji diploidní. I mezi nimi se ale našly výjimky, například triploidní cytotypy u *S. chamaemespilus* (Liljefors, 1953) nebo tetraploidní cytotypy *S. torminalis* a *S. aria* ze Španělska (Aldasoro et al., 1998). V taxonu *S. aria* jsou ovšem v tomto pojetí španělských autorů zahrnuty i hybridogenní druhy, kterým pravděpodobně náleží udávaný tetraploidní cytotyp.

V rámci *Sorbus aria* agg. jsou udáváni jak autopolyploidní, tak allopolyploidní taxony a to všech výše zmíněných ploidních úrovní (Liljefors, 1955; Nelson-Jones et al., 2002; Vít, 2006; Bailey et al., 2008). Přehled publikovaných ploidních stupňů vybraných zástupců je uveden v Tab. 1, výsledky jednotlivých studií se často neshodují, což je pravděpodobně způsobeno rozdílným chápáním jednotlivých taxonů.

**Tab. 1:** Počty chromozomů u vybraných zástupců ze skupiny *S. aria* agg.

Druh	Počet	Zdroj	Doplnění	Zdroj
<i>S. aria</i> s.str.	34	Kutzelnigg, 1994	34	Lepší et al., in press.
	68	Aldasoro et al. 1998		
<i>S. graeca</i>	34, 68	Warburg and Kárpáti, 1968; Meyer et al., 2005		
<i>S. danubialis</i>	34	Warburg and Kárpáti, 1968; Jankun and Kovanda, 1987; Kutzelnigg, 1994	68	Vít, 2006
<i>S. subdanubialis</i>	51	Lepší et al. unpubl.		
<i>S. umbellata</i>	34, 68	Aldasoro et al., 2004		
<i>S. pannonica</i>	34	Májovský and Uhríková 1990		
	51	Feulner et al., 2013		

### 2.3.3. Reprodukční způsoby – přechod k apomixii

U rostlin můžeme rozlišit tři základní typy rozmnožování – cizosprašnost (allogamie), samosprašnost (autogamie) a nepohlavní rozmnožování. Rostliny dokážou, na rozdíl od většiny živočichů, kombinovat více typů rozmnožování, a tím efektivně reagovat na exogenní změny (Briggs and Walters, 2001).

U nepohlavního rozmnožování může probíhat pomocí vegetativního množení prostřednictvím fragmentace či speciálních propagulí, nebo formou apomixie (zde odpovídá užšímu pojetí termínu, tj. agamospermii). Při apomixii vzniká semeno, i když nedochází k oplození – embryo se tedy vyvíjí partenogeneticky a je klonem matky. Podle buňky/struktury, ze které embryo vzniká, lze rozdělit apomixii na sporofytickou a gametofytickou. V prvním případě vzniká embryo přímo ze somatické buňky ve vajíčku. Tento typ rozmnožování se také nazývá polyembryonie. V druhém případě, při gametofytické apomixii, se ve vajíčku vyvine – stejně jako u pohlavního rozmnožování – zárodečný vak, který je ovšem zpravidla neredukovaný. Pokud se zárodečný vak vyvíjí z neredukované megaspory, jedná se o diplosporní apomixii. Při aposporní apomixii vzniká ze somatické buňky vajíčka. Endosperm, potřebný pro výživu embrya, vzniká u některých apomiktických rostlin autonomně z centrálních jader zárodečného vaku. Pokud je ke správnému vývoji endospermu u apomiktické rostliny potřeba oplození těchto jader, jedná se o tzv. pseudogamii (Briggs and Walters, 2001; Grimanelli et al., 2001; Richards, 2003).

Pokud rostlina plně přejde na nepohlavní rozmnožování, jedná se o obligátního apomikta. Častější případ je pravděpodobně fakultativní apomixie, kdy si rostlina uchovává schopnost rozmnožovat se i pohlavně. Fakultativní apomikty jsou převážně buď sporofytického nebo gametofytického aposporního typu apomixie, neboť u nich není vyloučen současný vznik sexuálního redukováného zárodečného vaku, a tedy ani celé pohlavní rozmnožování. Naopak u diplosporních gametofytických apomiktů si sexuální

a asexuální rozmnožování konkuruje, takže je u nich apomixie převážně obligátní (Asker and Jerling, 1992; Whitton et al., 2008). Výjimku tvoří například triploidní hybridy z okruhu *Taraxacum officinale*, u kterých se část zárodečných vaků vyvíjí normální meiotickou cestou a část vzniká diplosporním vývojem (van Baarlen et al., 2002). Fakultativní apomixie zahrnuje různé přechody mezi pohlavním a nepohlavním rozmnožováním, od zvýšené tvorby neredukovaných gamet (např. v rodu *Potentilla* L.; Müntzing, 1958) až po částečné zachování některých fází meiózy u diplosporních apomiktů (např. v rodech *Taraxacum* Wigg. či *Arabis* L.; van Baarlen et al., 2000; Naumova et al., 2001), čímž se jasná hranice mezi těmito dvěma základními typy stírá.

Přechod z pohlavního na apomiktické rozmnožování vyžaduje změnu ve třech fázích. Prvním krokem je apomeióza, tedy ztráta meiotického dělení, které je nahrazeno diplosporií nebo aposporií (v případně gametofytické apomixie). Následuje partenogenetický vývoj embrya (bez oplození) a posledním krokem je vytvoření funkčního endospermu (Koltunow, 1993; Grimanelli et al., 2001; Naumova et al., 2001). Přestože si rostliny vytvořily mnoho způsobů, jak těchto změn dosáhnout, apomiktické rostliny obvykle mají následující společné znaky: jsou polyploidní (jediná potvrzená výjimka je zatím apomixie u diploidních jedinců z rodu *Boechnera* A. Löve et D. Löve; Schranz et al., 2006), obvykle je narušen pouze samičí reprodukční mechanismus (zatímco meiózou u samců je nepozměněna) a u většiny apomiktů není vyloučeno pohlavní rozmnožování (Koltunow, 1993; Grimanelli et al., 2001).

V apomixii se setkávají výhody sexuální a asexuální reprodukce. Na rozdíl od pohlavního rozmnožování dokážou předat osvědčený genotyp do další generace nepozměněný. Oproti vegetativnímu rozmnožování mají výhody spojené s propagací pomocí semen – šíření na velkou vzdálenost, přežívání nepříznivých období a očištění od většiny patogenů. Mezi nevýhody apomixie z dlouhodobého evolučního hlediska patří snížená variabilita (oproti příbuzným sexuálním taxonům) a neschopnost spojit mutace z různých linií v jednom genomu (Briggs and Walters, 2001; Grimanelli et al., 2001). Dále dochází k efektu tzv. Mullerovy rohatky, kdy se v genomu hromadí mírně negativní mutace (Richards, 2003; Flegr, 2009). Těmto (a pravděpodobně i dalším) negativům klonální reprodukce se ovšem dokážou apomiktické rostliny vyhnout, pokud si ponechají i částečné pohlavní rozmnožování. Z toho důvodu většina z nich směřuje k fakultativní apomixii (Asker and Jerling, 1992; Richards, 2003).

Za speciální případ apomixie může být považována haploidní partenogeneze, při které dochází meiotickému dělení a vzniku redukováného zárodečného vaku. Embryo se ovšem vyvíjí partenogeneticky z vaječné (redukované) buňky a má tedy jen poloviční počet chromozomů, než mateřská rostlina (Asker and Jerling, 1992). Tento způsob reprodukce je v rostlinné říši relativně vzácný, ale byl pozorován například v rodech *Potentilla* L. (Müntzing, 1958), *Dichanthium* Willemet (de Wet, 1968; de Wet and Harlan, 1970), *Ranunculus* L. (Nogler, 1984) či *Pilosella* Hill. (Krahulcová and Krahulec, 2000; Krahulec et al., 2011). U výše uvedených příkladů se jednalo o polyploidní rostliny. Prostřednictvím haploidní partenogeneze mohou apomiktické rostliny zvýšit variabilitu svých genomů. Například u zmíněného rodu *Pilosella* byl pozorován cyklus zahrnující haploidní partenogenezi a následné opětovné zdvojení genomu (cyklus polyploid – polyhaploid – polyploid) bez použití sexuálního rozmnožování. Při vzniku dihaploida dochází ke ztrátě poloviny genů, takže následně vzniklý polyploid má větší míru homozygotnosti, než

polyploid původní, a tedy odlišný genom a fenotyp (Krahulec et al., 2011). U jiných druhů (například u rodu *Dichanthium* či druhu *Panicum maximum* Jacq.) byly pozorovány obdobné cykly, ovšem se zahrnutím pohlavního rozmnožování. Takto mohou díky cyklu diploid – tetraploid – dihaploid rostliny přenášet geny i mezi ploidními úrovněmi (de Wet, 1968; Savidan and Pernès, 1982).

Na pomezí mezi apomiktickým a sexuálním rozmnožováním stojí také další vzácný typ – automixie. V tomto případě probíhá megasporogeneze normální, meiotickou cestou za vzniku redukovaných gamet. Zygota (a posléze embryo) vzniká fúzí dvou samičích gamet. Embryo sice není dokonalým klonem matky, ale genetická variabilita potomstva odpovídá situaci autogamního rozmnožování v rámci inbrední homozygotní linie. Tento způsob byl pozorován například u druhu *Rubus caesius* (Gerlach, 1965; Antonius and Nybom, 1995).

Apomiktické taxony jsou často spojeny nejen s polyploidizací, ale i s hybridizací, která umožňuje odstranění negativního vlivu recesivních mutací (Richards, 2003). Z druhé strany je apomixie mechanismem, který využívají polyploidní a hybridní jedinci k udržení své heterozygotnosti. Apomixie bývá jedinou možností reprodukce u rostlin s lichým či nevyváženým počtem chromozomů, takže i ty se můžou v populacích udržet (Asker and Jerling, 1992; Briggs and Walters, 2001).

Zatím se nepodařilo odhalit obecnou genetickou podstatu apomixie, ani zákony její dědičnosti. Výsledky studií ukazují, že u jednotlivých druhů se objevují různorodé mechanismy a zdá se, že ještě různorodější jsou genetické změny, které jsou za to odpovědné (Nogler, 1984; Grimanelli et al., 1998; Van Dijk et al., 1999; Bicknell et al., 2000; Noyes and Rieseberg, 2000; Pupilli et al., 2001). Rozluštění genetické podstaty apomixie je především cílem zemědělské výroby, která by tak mohla fixovat výhodné genomy u hospodářských plodin (Grimanelli et al., 2001; Douglas and Grossniklaus, 2008).

### **Reprodukční způsoby v rodu *Sorbus***

Jeřáby se rozmnožují, stejně jako ostatní rody podčeledi Maloideae, pomocí široké škály reprodukčních způsobů (Dickinson and Campbell, 1991). Sexuální druhy rodu *Sorbus* jsou především allogamické, ačkoli u *S. aucuparia* a *S. torminalis* byla výjimečně zaznamenána i autogamie (Pías and Guitián, 2006; Hoebee et al., 2007; Rich et al., 2010). Hybridogenní druhy jsou apomiktické. Většinou se jedná o gametofytickou aposporní apomixii s nutností oplodnění endospermu, tedy pseudogamii (Liljefors, 1953, 1955). U našich jeřábů byly pozorovány i další mechanismy – diplosporie u *S. bohemica*, autonomní vývin endospermu a haploidní partenogeneze u *S. sudetica* a polyembryonie u obou těchto českých hybridogenních druhů (Jankun and Kovanda, 1986, 1987). Dále byla pozorována i vegetativní reprodukce prostřednictvím spontánního hřížení u *S. sudetica* a vzácně i u jeho rodičů *S. chamaemespilus* a *S. aria* a je popsána i u *S. hardeggensis* (Kociánová and Štursová, 1986; Kovanda, 1999; Kociánová et al., 2005). Kromě typů apomixie byla u jeřábů studována i její míra, a to pomocí molekulárních markerů. Takto byli zaznamenáni jak obligátní tak fakultativní apomikté. Populace, kde je zachováno částečné pohlavní rozmnožování jsou většinou variabilnější ve srovnání s obligátními apomikty (Robertson, Newton and Ennos, 2004a; Robertson et al., 2010; Lepší et al., 2009). Dlouhou dobu byla také v rodu *Sorbus* udávána apomixie na diploidní úrovni – u *S. eximia* Kovanda

(Jankun and Kovanda, 1988). Při pozdější biosystematické revizi se však ukázalo, že pravděpodobně došlo k záměně materiálu, neboť *S. eximia* je čistě triploidním druhem (Vít et al., 2012).

### 3. | Metodika

#### 3.1. | Sběr materiálu

Na základě informací získaných z databáze FLDOK, Národní fytoecologické databáze, herbářových dokladů, literárních pramenů a údajů floristů bylo vybráno 89 lokalit s výskytem zástupců *Sorbus aria* agg. Z celkového počtu lokalit se 44 nacházelo v České republice, 4 populace v Rakousku, 5 v Německu, 8 na Slovensku, 17 v Maďarsku, 3 v Makedonii, 7 ve Francii, 2 ve Španělsku a 1 v Norsku. Z každé populace bylo odebráno v ideálním případě 10 jedinců. Při sběrech byl brán zřetel na stav populace. V některých případech byl tedy počet sbíraných jedinců vzhledem k velikosti populace nižší. Ze všech analyzovaných populací byly vybrány dvě modelové, které prokazovaly největší variabilitu v ploidních úrovních a reprodukčních způsobech ve svém regionu, populace na vrchu Ostrý v Českém středohoří a Bor u Hardeggu I v NP Thayatal. Zde byly odebrány vzorky ze všech dostupných jedinců a byly analyzovány všemi metodami (viz dále) pro zhodnocení jejich evolučního potenciálu. Pro možnost vstupu a sběru v zákonem chráněných oblastech (NP Podyjí, NP Thayatal, NPR Koda, PR Voškov) byly získány příslušné výjimky (viz Příloha 1).

Sběry probíhaly v letech 2012 až 2014. Některé lokality bylo nutné kvůli nezbytnosti získání materiálu z různých fenologických fází či špatnému stavu listů nebo plodů navštívit opakovaně. Pro opětovnou identifikaci byl každý jedinec označen kovovým štítkem s unikátním kódem a zaměřen pomocí systému GPS (etrex 30, Garmin). Listy určené k cytometrické analýze byly uzavřeny do plastických sáčků, skladovány v chladu a zanalyzovány do čtyř dnů. Materiál určený k analýze mikrosatelitů byl pro vysušení uložen do čajových sáčků a zasypán silikagelem nejméně na 14 dní. Malvice byly uchovány v chladu (při 5°C) a zpracovány během čtyř týdnů. Z každého plodícího stromu bylo analyzováno, pokud to bylo možné, 5-10 semen. Dále bylo vybráno 18 jedinců čtyř druhů jeřábů, u kterých byly odebrány květy pro analýzu pylu průtokovou cytometrií. Vzhledem k obtížnosti zachycení jedinců v době květu, byli vybráni jedinci z blízkých a snadno dostupných lokalit Českého středohoří. Pro pokrytí všech cytotypů byli pro pilotní analýzu vybráni nejen dva tetraploidní druhy ze skupiny *S. aria* agg. (*S. danubialis* a *S. collina*, jediné zde rostoucí), ale i diploidní *S. torminalis* a triploidní *S. bohemica*. Z každého vybraného jedince byly odebrány dvě větve s květenstvími, které stály do zpracování ve vodě v chladné místnosti (16°C). Pyl byl analyzován do dvou dnů.

Diplomová práce zčásti navazuje na výzkum Martina Lepšího (Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích), jehož nasbíraný a částečně zanalyzovaný materiál byl do práce začleněn a dále zpracován. Od Martina Lepšího pochází zahraniční sběry z Maďarska a Německa a část materiálu z NP Podyjí a CHKO Moravský

kras. U těchto vzorků provedl M. Lepší cytometrickou analýzu, zatímco já jsem vzorky zpracovala morfometrickými a molekulárními metodami. Dále jsem přibližně u poloviny ze všech vzorků zařazených do DP provedla izolaci DNA, další část izolací provedla Lenka Flašková (DNA laboratoř, PřF UK). Pro analýzy jsem také vybrala a použila některé již dříve vyizolované vzorky od Petra Víta (Botanický ústav Akademie věd ČR) pocházející z NP Podyjí. Analýzu mikrosatelitů, veškeré morfologické analýzy a zpracování a vyhodnocení všech získaných dat jsem provedla sama. Úplný přehled navštívených lokalit s počty analyzovaných jedinců je uveden v tabulce 2.

V roce 2014 bylo provedeno pilotní experimentální křížení 7 vybraných pěstovaných jedinců *S. aria* agg. v Dendrologické zahradě v Průhonicích (seznam křížených jedinců viz Tab. 6 níže). Experimentální křížení proběhlo ve spolupráci s Jiřím Velebilem (Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví). Hybridizace byly provedeny s cílem zjistit možnost oplodnění vajíčka či endospermu jiným druhem v rámci skupiny jeřábu muku. Semena vzniklá křížením byla následně podrobena cytometrické analýze.

**Tabulka 2:** Přehled lokalit s počty analyzovaných jedinců.

(**Tučně** jsou vyznačeny lokality, kde byli analyzováni všichni dostupní jedinci. + sběr a analýza provedena Martinem Lepším \* izolace DNA provedeny Lenkou Flaškovou, # izolace DNA provedeny Petrem Vítem)

lokality	země	region (jen ČR)	počet analyzovaných jedinců			
			FCM	FCSS	analýza mikrosatelitů	morfometrické analýzy
Beroun-nad nádražím	ČR	Český kras	7	7	7 *	7
Koda (NPR)	ČR	Český kras	10	9	10 *	10
Koněpruské jeskyně	ČR	Český kras	11	10	11 *	11
Nad císařskou roklí	ČR	Český kras	4	3	4 *	4
Suchomasty	ČR	Český kras	7	6	6 *	6
Sv. Jan pod skalou	ČR	Český kras	4	2	4 *	4
Voškov (PR)	ČR	Český kras	3	0	3 *	3
Bílé Stráně	ČR	České středohoří	12	11	12 *	12
Boreč	ČR	České středohoří	18	14	15 *	18
Dlouhý vrch	ČR	České středohoří	8	8	8 *	8
Malý Lovoš	ČR	České středohoří	3	1	3	3
Milešovka	ČR	České středohoří	26	2	14 *	25
Opárenské údolí	ČR	České středohoří	6	2	6	6
<b>Ostrý</b>	<b>ČR</b>	<b>České středohoří</b>	<b>68</b>	<b>40</b>	<b>66</b>	<b>60</b>
Plešivec	ČR	České středohoří	7	4	7 *	7
Stadické srázy	ČR	České středohoří	6	6	6	6
Strážiště	ČR	České středohoří	5	5	5 *	5
Sutomský vrch	ČR	České středohoří	9	3	9 *	9
Široký kámen	ČR	České středohoří	7	7	7	7
Nebesa	ČR	Doupovské vrchy	4	4	4	4
Perštejn	ČR	Doupovské vrchy	7	2	6	7
Radechov - borový les	ČR	Doupovské vrchy	5	0	5	5



lokality	země	region (jen ČR)	počet analyzovaných jedinců			
			FCM	FCSS	analýza mikrosatelitů	morfo-metrické analýzy
Džbán	ČR	Džbán	2	2	1 *	2
Čertova skála	ČR	Křivoklátsko	4	0	4	4
Skryjská jezírka	ČR	Křivoklátsko	4	0	4	4
Šlovice - L břeh potoka	ČR	Křivoklátsko	1	0	1	1
vrch Hřeben	ČR	Křivoklátsko	1	1	1	0
Zbecno	ČR	Křivoklátsko	5	0	5	5
Hornek	ČR	Moravský kras	5 +	0	5	5
Nad Srní jeskyní	ČR	Moravský kras	2 +	2	0	1
U Kateřinské jeskyně	ČR	Moravský kras	38 +	7 +	36	32
Děvín - Pálava	ČR	Pálava	1	0	1 *	0
Na Vyhlídce	ČR	Podyjí	9 +	8	9 #	9
Nad Celníci	ČR	Podyjí	11 +	11	11 *	9
Pod Hardeg. vyhlídkou	ČR	Podyjí	12	11	11 #	7
Dukovany - kaňon Jihlavy	ČR	Pojihlaví	6	5	6 *	6
Pod Sv. Floriánkem	ČR	Pojihlaví	2	2	2 *	2
Senorady	ČR	Pojihlaví	8	8	5	7
Vinařická hora (u rozcestí)	ČR	Pražská plošina	2	0	0	0
Kozí hřbet (Hamr na jezeře)	ČR	Ralsko-Bezděžská tabule	6	1	6	6
Slapy-u chatové oblasti	ČR	Střední Povltaví	7	0	6	7
Smetanova vyhlídka	ČR	Střední Povltaví	3	1	3	2
Střeblov (u Rabyně)	ČR	Střední Povltaví	5	0	5	4
Zvole	ČR	Střední Povltaví	4	0	4 *	4
Aosta - cestou k Pile	Francie		1	0	1	0
Col de Cabre	Francie		3	0	3	0
Eyguians, Francie	Francie		1	0	1	0
Le Gres d'Annot	Francie		3	0	3	0
Puy Griou (F6)	Francie		1	1	1	1
Rochebrune	Francie		1	0	1	0
St.Jacques des Blats	Francie		2	0	2	2
Bakony Mts, N of town	Maďarsko		10 +	0	10	10
Bakony Mts, Tekeres völgy	Maďarsko		1 +	0	1	1
Balaton region, ca 3.5 km NNW of centre of village	Maďarsko		5 +		5	5
Balaton region, Malomvölgy	Maďarsko		2 +	0	2	2
Balaton region, Szent György hill	Maďarsko		1 +	0	1	1
Budaors	Maďarsko		1	0	1	0
Kecske hegy	Maďarsko		3 +	0	3	3
Márkó, Malom hegy	Maďarsko		7 +	0	7	7

lokality	země	region (jen ČR)	počet analyzovaných jedinců			
			FCM	FCSS	analýza mikrosatelitů	morfo-metrické analýzy
Ördög oron	Maďarsko		3 +	0	3	2
Sas hegy	Maďarsko		4 +	0	4	4
Tündér hegy	Maďarsko		4 +	0	4	4
Vértes Mts, Fejér megye, Kőhányás, Németh-völgy	Maďarsko		4 +	0	4	3
Vértes Mts, Nagy-Vasak hegy	Maďarsko		7 +	0	7	7
Vértes Mts, NW of village	Maďarsko		2 +	0	2	1
Vértes Mts, Pamlag völgy	Maďarsko		2 +	0	2	2
Vértes Mts, Szedres völgy	Maďarsko		6 +	0	6	6
Veszprém	Maďarsko		2 +	0	2	2
Mavrovo	Makedonie		3	0	3	2
NP Galičica	Makedonie		2	0	2	2
Šarplanina	Makedonie		3	0	3	2
Dietfurt	Německo		1 +	0	1	1
Essing	Německo		1 +	0	1	1
Hebersdorf	Německo		1 +	0	1	1
Naab valley	Německo		1 +	0	1	1
Riedenburg	Německo		1 +	0	1	1
Bomlo	Norsko		1 +	0	1	1
<b>Bor u Hardegu</b>	<b>Rakousko</b>	<b>Podyjí</b>	<b>25 +</b>	<b>23</b>	<b>25 *</b>	<b>17</b>
Max Platau	Rakousko	Podyjí	9 +	9	9 #	9
Nad plovárnou	Rakousko	Podyjí	7 +	7	7 *	6
Belianske Tatry, Tatranská Kotlina	Slovensko		4	0	4	4
Hrádok	Slovensko		5	0	5 *	4
M. planina	Slovensko		1	0	1 *	1
Muráň	Slovensko		2	0	2 *	2
Muráňský hrad	Slovensko		2	0	2 *	2
Tisovec	Slovensko		3	0	3 *	2
Velká Stožka	Slovensko		1	0	1 *	1
La Riocha, Španělsko	Španělsko		1	0	1	1
Monserrat, Španělsko	Španělsko		1	0	1	1

## 3.2. | Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je hlavní metodický přístup předkládané diplomové práce. Relativní velikost genomu (resp. DNA ploidní úroveň, Suda and Trávníček, 2006) jedinců byla stanovena z živých pletiv řapíků. Ta se v předchozích analýzách ukázala jako nejvhodnější (Vít, 2006), neboť obsahují méně sekundárních metabolitů, které negativně ovlivňují kvalitu cytometrických analýz (Loureiro et al., 2007). Dále byla analýzou semen zjišťována DNA ploidní úroveň embrya a endospermu (Flow cytometry seed screen, FCSS; Matzk et al. 2000). Izolace a barvení buněčných jader byly provedeny modifikovanou metodikou podle Doležel et al. (2007), která se osvědčila v pilotních studiích z předchozích let (P. Vít et al. unpubl.). Ploidní úroveň samčích gamet byla zjištěna analýzou pylu touto ještě dále pozměněnou metodikou (viz níže).

### 3.2.1. Analýza pletiv řapíku

Přibližně 0,5 – 1 cm dlouhý kus řapíku byl dán do petriho misky. Bylo přidáno přibližně stejné množství listu standardu *Bellis perennis* L., jež má nejbližší velikost genomu ke studovanému rodu (3,38 pg; Schönswetter et al., 2007). Dále bylo přidáno 600 µl pufru Otto I (0,1 M monohydrát kyseliny citrónové, 0,5% Tween 20). Směs byla v Petriho misce rozsekána žiletkou a přefiltrována do zkumavky přes 42 µm nylonový filtr. Po půlhodinové inkubaci při pokojové teplotě následovalo přidání 1 ml barvicího roztoku, který se skládá z pufru Otto II (0,4M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O) fluorescenčního barviva DAPI (4 µg/ml) a antioxidantu β-mercaptoethanolu (2 µl/ml). Analýzy vzorků byly provedeny na cytometru CyFlow ML (UV LED 365 nm jako excitační zdroj) v laboratoři průtokové cytometrie Katedry botaniky PřF UK a Laboratoři molekulární biologie rostlin Katedry botaniky PřF JU.

### 3.2.2. Analýza semen

Semena byla analyzována obdobným způsobem, ovšem s dalšími modifikacemi z pilotních analýz (P. Vít unpubl., P. Koutecký unpubl.). Pro analýzu byla z boku semene žiletkou odříznuta malá část tak, aby se v ní nacházel endosperm a pletivo embrya (dělohy). Osemení je tvořeno mrtvými buňkami, bez jader, a v analýzách se vůbec neprojevovalo (tento fakt byl otestován analýzou samotného pletiva osemení). Oproti postupu při analýze listů bylo přidáno větší množství pufru Otto I, a to 700 µl. Dále byla změněna doba inkubace směsi na 1 hodinu, po které bylo odebráno 500µl supernatantu bez větších usazených částí materiálu. Supernatant byl poté znovu přefiltrován. Následovalo bezprostřední přidání 1 ml barvicího roztoku (Otto II, fluorescenční barvivo DAPI a antioxidant β-mercaptoethanol) a analýza vzorku.

Malvice jeřábů jsou často napadány hmyzími parazity. Pro odhalení případných kontaminací byla změřena relativní velikost genomu nalezených parazitů. Jednalo se o larvy

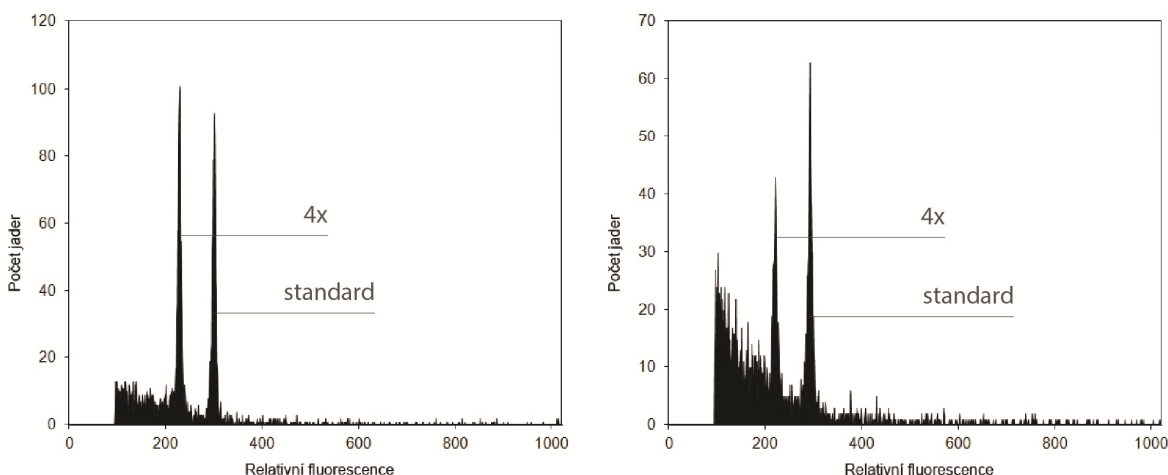
holometabolního hmyzu a dospělé z řádu Diptera. Vzorky nalezeného hmyzu měly vysokou výtěžnost jader a jejich píky měly nižší koeficient variance (píky byly výrazně užší) než vzorky jeřábů. Larvy byly endopolyploidní, tvořily píky odpovídající velikosti pentaploidního a dekaploidního jeřábu. Dospělec z řádu Diptera měl velikost odpovídající 2,5x jeřábu. Vzorky, ve kterých se takové píky objevily, byly vyřazeny.

### 3.2.3. Analýza pylu

Pro analýzu pylu bylo v Petriho misce s 600  $\mu$ l pufru Otto I smočeno 2-5 květů zbavených květních obalů, čímž se ze zralých prašníků vyplavila pylová zrna. Ta byla následně důkladně sekána žiletkou přibližně po dobu půl minuty. Dále byl postup stejný jako při analýze řapíků. Testován byl také postup analýzy pylu podle Kron and Husband (2012), který se ale pro vybrané druhy nepodařilo optimalizovat.

### 3.2.4. Analýza dat

Výstupem cytometrických analýz jsou histogramy znázorňující relativní intenzitu fluorescence (osa x) a počty jader (osa y; ukázka histogramu viz Obr. 2). K vyhodnocení výsledných histogramů byl použit program Partec FloMax 2.4b. Byl zaznamenán poměr fluorescence píky vzorku k píku standardu a hodnoty koeficientu variance (CV), které odrážejí kvalitu analýzy. Z poměru vzorku ke standardu byla odvozena ploidní úroveň vzorku. Tyto poměry jsou pro jednotlivé ploidní úrovně známy a byly již dříve ověřeny na vzorcích se známými chromozomovými počty (Vít, 2006; Lepší et al., 2008, 2013)(Vít 2006, Lepší et al. 2008, Lepší et al. 2013).



**Obr. 2:** Ukázka výsledných histogramů analýz řapíků tetraploidního *S. danubialis*. Nalevo – kvalitní analýza bez výraznějšího pozadí. Napravo – analýza se zhoršenou kvalitou způsobenou s největší pravděpodobností sekundárními metabolity.

### 3.3. | Molekulární analýzy

Pro analýzu molekulárními markery bylo vybráno 5 jedinců z každé populace, a to přednostně těch, u kterých byl zjištěn způsob reprodukce pomocí průtokové cytometrie. Jako molekulární marker byly zvoleny mikrosatelitové úseky. Jedná se o krátké repetitivní sekvence DNA - opakující se jednotky jsou tvořeny 1 až 6 nukleotidy. Tyto úseky snadno podléhají mutacím a jsou tedy vysoce polymorfní. Alela mikrosatelitového úseku je definována jako délka úseku, tedy počet opakování repetice spolu s tzv. *flanking regions*, okolními sekvencemi, které se nachází před a za vlastním repetitivním úsekem a kde nasedají primery (Mandák, 2011). Primery k mikrosatelitovým úsekům jsou druhově specifické, ale u blízce příbuzných druhů či rodů mohou být homologické a lze je „crossamplifikovat“ (přenést) a použít (Mandák, 2011). Pro rod *Sorbus* a jeho blízce příbuzné rody jsou mikrosatelitové primery vyvinuty, viz dále. Některé z nich byly také již vyzkoušeny pro studium českých jeřábů (Vít, 2006; Lepší et al., 2008, 2009). V dřívějších studiích se osvědčily lokusy vytvořené pro rod *Sorbus* (Mss5, Mss6, Ms6g, Ms14; Oddou-Muratorio et al., 2001; Nelson-Jones et al., 2002) a rod *Malus* (CH02D11; Gianfranceschi et al., 1998). Nově byly testovány mikrosatelity Mss13, Mss16, SA01, SA02, SA03, SA06, SA07, SA08, SA09, SA14 a SA191 (Oddou-Muratorio et al., 2001; González-González et al., 2010), které byly vyvinuty pro *S. torminalis* (Mss13 a Mss16) a přímo pro *S. aria* (ostatní). Nejprve byly optimalizovány PCR reakce pro všechny výše uvedené úseky s použitím neznačených primerů (Sigma-Aldrich). Lokusy SA01 a Ms14 se nepodařilo amplifikovat ani při gradientové optimalizaci PCR reakce a byly vyřazeny. Dále byly otestovány fluorescenčně značené ostatní primerové kombinace (označené pomocí dye setu DS33 – NED, 6FAM, HEX, barva ROX byla použita pro standard; Applied Biosystems). Zbylé mikrosatelitové úseky byly teoreticky otestovány pro možnost použití více primerů v 1 PCR reakci (tzv. multiplexové PCR) pomocí programu Fast PCR (ver. 6.1; Kalendar et al., 2011) a Vector NTI 11 (Life Technologies). Primerové páry byly na základě těchto výsledků, znalosti délky fragmentů a fluorescenčního značení rozděleny do 3 skupin. Při optimalizaci jednotlivých multiplexů musel být vyřazen další úsek – Mss6, který při testech rozřazování primerů do různých multiplexů vykazoval vždy jen nespecifické reakce. Seznam 13 použitých primerů včetně jejich parametrů, fluorescenčního značení a zařazení do multiplexu je uveden v tabulce 3.

Tab. 3: Použité primerové kombinace pro jednotlivé úseky.

Lokus	Sekvence primeru R / F	Délka fragmentu (bp)	typ repetitivní sekvence	T annealingu (°C)	Fluorofor	Multiplex	Citace
<b>CH02D11</b>	AGGTTCCAGAGCAACAGC	108-200	AG	55	ned	3	Gianfranceschi et al. 1998
	AACAAAAGCAGATCCGTTGC				-		
<b>Ms6g</b>	CGGAGGGTGCTGCCGAA	152-176	?	55	hex	1	Nelson-Johnes et al. 2002
	GCCAGGCCATATCTGCT				-		
<b>MSS13</b>	TATGCGTCTTCCATTCCG	210-268	CA	55	6fam	1	Oddou-muratorio et al. 2001
	GCGTTTGACTCACTCAGATTTG				-		
<b>MSS16</b>	CTCCCCCTTGTTGATGCC	140-194	CT=GA	55	hex	2	Oddou-muratorio et al. 2001
	TTGCCCTCAAAGAATGCC				-		
<b>Miss5</b>	CCCCAACAAATTTTCTCC	112-148	GA	55	hex	1	Oddou-muratorio et al. 2001
	CCCTCGCTCTTTGCCCTCT				-		
<b>SA02</b>	CTAGGTATCATCTCCGACCA	270-338	GA	55	6fam	2	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
	ACGTAGCACTGAATGGTATAG				-		
<b>SA03</b>	CACITCTCCTGCTGTTGG	212-250	GA	55	hex	3	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
	ACTACTGCTACTTCTGTGGG				-		
<b>SA06</b>	ATTTGATCCATGTCGACTGCA	246-299	GA	55	ned	3	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
	TGCAGCGGTTGCAGATTGCA				-		
<b>SA07</b>	ACGTTTTAGTATGATGGCC	324-362	GA	55	hex	2	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
	TTGCGAGTTTCAAGCAC				-		
<b>SA08</b>	CAGAGAGAGTGCACTGCCT	234-278	CT	55	hex	1	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
	GAATTCCTGGCAGTTTGCCT				-		
<b>SA09</b>	CTTGTGGACGGATTTCTTC	158-206	AG	55	6fam	2	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
	CCAATACTTGAGTAGCATAAC				-		
<b>SA14</b>	ATGGATTTAGGTTAACAGTTGTC	160-242	TC	55	ned	2	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
	GAGTAAAACTACCAGTATAC				-		
<b>SA191</b>	AAGTTTACAAGAGTGTTCAG0	211-258	GA	55	6fam	3	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
	GAATTCATGAAAAGCAGCTAATG				-		

### 3.3.1. Izolace DNA

Celková DNA byla izolována pomocí modifikované metody CTAB (Pfosser et al., 2006), celý postup extrakce DNA byl pro rod *Sorbus* již optimalizován (Vít, 2006; Lepší et al., 2008, 2009) a obsahuje další drobné změny.

Pro izolaci DNA byl použit materiál z mladších listů vysušených v silikagelu (Silcarbon). Přibližně 2×1 cm velký kousek čepele byl pomocí 2 wolfram-karbidových kuliček nadrcen pomocí mlýnku Mixer Mill 400 (Retsch) při frekvenci 27 ot./s po dobu 3 minut. K rozdrčenému materiálu bylo přidáno 700 µl roztoku CTAB (cetyltrimetylamonium bromidu) s 2% merkaptoethanolem, špetka PVP-K30 (polyvinylpyrrolidon; Roth) a 5 µl RNasy A (10 µg/ml, Thermo Scientific). Směs byla inkubována po dobu 30 minut na termomixeru (Eppendorf Thermomixer Comfort) při 60 °C a 1400 rpm. Poté k ní bylo přidáno 500 µl směsi chloroformu a isoamylalkoholu (v poměru 24:1). Dále byly zkumavky pro promíchání 3× převráceny a nechány 5 minut stát při laboratorní teplotě. Následovalo 6 minut centrifugování při 13200 rpm. Vzniklý supernatant byl přepipetován do nových eppendorfek a bylo k němu přidáno 500 µl vychlazeného isopropanolu. Zkumavky byly opět 2× převráceny a nechány cca 30 minut stát v -20 °C. Poté byly vzorky opět centrifugovány 3 minuty při 13,200 rpm. Dále byl supernatant slit do kádinky a otevřené eppendorfky, s peletem DNA na dně, byly dnem nahoru položeny na filtrační papír. Po osušení bylo přidáno 400 µl vychlazeného 96% ethanolu a směs byla inkubována po dobu 15 minut na termobloku při 37 °C a 1,200 rpm. Poté byly vzorky 5 minut centrifugovány. Následovalo opět slití supernatantu a přidání 200 µl vychlazeného 70% ethanol, po němž se vzorky nechaly 5 minut stát při laboratorní teplotě. Dále byly vzorky 3 minuty centrifugovány při 13,200 rpm, supernatant opět slit a eppendorfky byly položeny na ubrousek dnem vzhůru, aby se odstranily zbytky ethanolu. Pelety DNA byly vysušeny inkubací otevřených eppendorfek na termobloku při 65 °C po dobu 6 minut. Vysušený pelet byl rozpuštěn ve 150 µl TE pufru.

U získaných vzorků byla změřena koncentrace DNA pomocí přístroje Nanodrop (Thermo Scientific). Vzorky byly dále naředěny na koncentraci 10 ng/µl pro použití v PCR reakci.

### 3.3.2. Multiplexová PCR

Třináct vybraných primerových kombinací bylo sestaveno do 3 skupin pro analýzu pomocí multiplexové PCR. Rozdělení párů primerů do jednotlivých multiplexů spolu s informací o jejich fluorescenčním značení uvádí Tab. 3.

Pro každý vzorek byly provedeny 3 multiplexové PCR amplifikace s použitím Qiagen multiplex PCR kitu. Každá reakce probíhala v celkovém objemu 12 µl, přesné složení pro každý multiplex uvádí Tab. 4. Rozdíl mezi multiplexy byl dán odlišným počtem primerů v jednotlivých multiplexech a také tím, že některých primerů se do reakce použilo menší množství z důvodu příliš vysoké amplifikace daného úseku. Primerů pro úseky SA09, Mss16 a D11 bylo do reakce dáno jen 0,07 µl, zatímco ostatních 0,1 µl.

**Tab.4:** Složení PCR směsí jednotlivých multiplexových reakcí pro 1 vzorek.

\* V multiplexu 2 bylo použito 0,1 µl R i F primerů úseků SA02, SA07 a SA14 a jen 0,07 µl primeru R i F úseků SA09 a Mss16. ■ V multiplexu 3 bylo použito 0,1 µl R i F primerů úseků SA03, SA06 a SA191 a jen 0,07 µl R i F primerů úseku CH02D11.

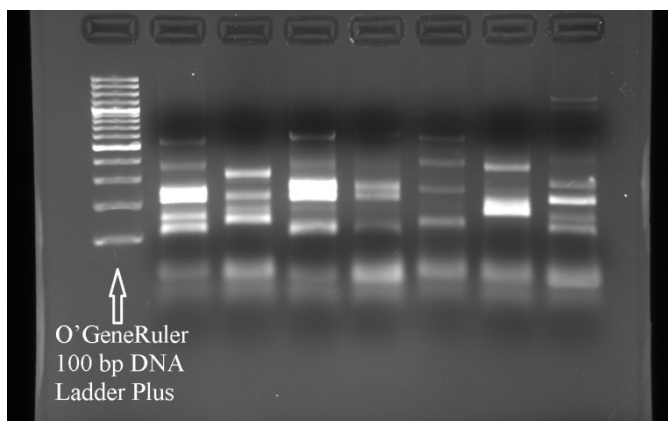
<b>Multiplex 1</b>	
Qiagen M.mix .....	6 µl
primer R (25 ng/µl).....	4×0,1 µl
primer F (25 ng/µl).....	4×0,1 µl
ddH <sub>2</sub> O .....	4,2 µl
DNA (10 ng/µl)	1 µl
<b>celkem:</b>	12 µl
<b>Multiplex 2</b>	
Qiagen M.mix .....	6 µl
primer R (25 ng/µl)*.....	3×0,1 µl, 2×0,07 µl
primer F (25 ng/µl)*.....	3×0,1 µl, 2×0,07 µl
ddH <sub>2</sub> O .....	4,12 µl
DNA (10 ng/µl)	1 µl
<b>celkem:</b>	12 µl
<b>Multiplex 3</b>	
Qiagen M.mix .....	6 µl
primer R (25 ng/µl)■.....	3×0,1 µl, 1×0,07 µl
primer F (25 ng/µl)■.....	3×0,1 µl, 1×0,07 µl
ddH <sub>2</sub> O .....	4,26 µl
DNA (10 ng/µl)	1 µl
<b>celkem:</b>	12 µl

Vzorky byly v PCR mikrokumavkách dány do termocykléru (Eppendorf Mastercycler Pro) s následujícím programem:

95°C .....	15:00	
94°C .....	0:30	} 35 ×
55°C .....	1:30	
72°C .....	1:00	
60°C.....	30:00	
10°C.....	hold.	



Úspěšnost amplifikace u každého běhu termocykléru byla kontrolována pomocí elektroforézy jen na několika vybraných vzorcích z daného běhu. Na 1,8% agarosový gel (s pufrům TBE) byly naneseny 4  $\mu$ l PCR produktu spolu s 1  $\mu$ l loading dye (Thermoscientific). Jako žebříček byl použit 1,5  $\mu$ l O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus, ready-to-use (Thermoscientific). Výsledný gel byl vyfotografován pomocí dokumentačního systému Kodak Gel Logic 100 (příklad viz Obr. 3).



**Obr. 3.** Vizualizace úspěšně naamplifikovaných mikrosatelitových lokusů na 1,8% agarózovém gelu. V každém vzorku se nachází 4 – 5 úseků. Jako velikostní standard byl použit O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus.

### 3.3.3. Vizualizace fragmentů

Po úspěšné PCR amplifikaci následovalo připravení vzorků pro fragmentační analýzu. Na každý vzorek byla vytvořena směs obsahující 9,75  $\mu$ l deionizovaného formamidu a 0,25  $\mu$ l GeneScan-ROX 500 size standard (20:1; Applied Biosystems). K celkovým 10  $\mu$ l této směsi pro každý vzorek byl přidán 1  $\mu$ l PCR produktu. Výsledná směs byla zdenaturována v termocykléru při 95°C po dobu 3 minut. Vlastní fragmentační analýza byla provedena Laboratoří sekvenace DNA PřF UK na šestnáctikapilárovém analyzátoru 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### 3.3.4. Vyhodnocení dat

Data získaná ze sekvenátoru (formát \*.fsa) byla zpracována v programu GeneMarker (ver. 2.6.0; SoftGenetics). Alely byly skórovány manuálně. Jelikož mezi analyzovanými jedinci byla většina polyploidů, u kterých nelze zjistit přesný genotyp s frekvencemi alel u jedince, byla získaná data vyhodnocována jako tzv. alelické fenotypy prostřednictvím metod pro dominantní markery. Tento způsob vyhodnocení již byl pro mikrosatelitová data polyploidů použit, a to i polyploidů z rodu *Sorbus* (Becher et al., 2000; Vít, 2006; Lepší et al., 2008, 2009). Nejprve byly zaznamenány délky fragmentů pro každého jedince. Z této primární matice byla vytvořena matice binární, se zaznamenáním prosté presence/absence všech fragmentů pro každého jedince.

Během vyhodnocení dat musel být vyřazen úsek SA06, neboť se díky opravným analýzám ukázalo, že se při multiplexové PCR neamplifikuje stabilně. Dále byla kvůli přítomnosti nespecificky amplifikovaného úseku vyřazena alela 122 z úseku Mss5.

Pro zobrazení struktury v datech a odlišení jednotlivých skupin byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA) v programu PAST (v. 2.17; Hammer et al., 2001) s použitím Jaccardova koeficientu podobnosti, který je určen pro binární data a nepočítá s negativní shodou. Tato analýza byla provedena jak pro všechny jedince, tak pro jednotlivé skupiny tvořené jednou ploidní úrovní.

Matrice binárních dat byla následně zpracována v programu Arlequin (ver. 3.5; Excoffier et al., 2005), kde byla nejprve provedena identifikace shodných alelických fenotypů, při které program prostým porovnáním zjišťuje shodné fenotypy jak v rámci druhu, tak mezi druhy. Dále byly data analyzovány procedurou AMOVA (analýza molekulární variability; Weir and Cockerham, 1984). Tato procedura byla provedena se dvěma modifikacemi rozdělení jedinců do dvou úrovní (v programu nazvaných „groups“ a „samples“). Pro zjištění variability mezi skupinami druhů byly jako první úroveň dělení „groups“ nastaveny stupně ploidie, a jako druhá úroveň „samples“ jednotlivé druhy. Pro odhalení mezidruhové a mezipopulační variability byly jako „groups“ nastaveny druhy a jako „samples“ populace. Tato analýza byla ovšem provedena jen u hojnějších druhů, které tvoří více populací, a jejich porovnání tedy má vypovídací hodnotu (*S. aria* s. str., *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*). V analýze molekulární variability byl sledován fixační index  $F_{ST}$  a procentuální rozdělení variability mezi skupiny. Programem Arlequin byla dále hodnocena vnitropopulační a vnitrodruhová diverzita pomocí celkového počtu alel, počtu polymorfních lokusů a AGD („Average gene diversity over all loci“; Nei, 1987).

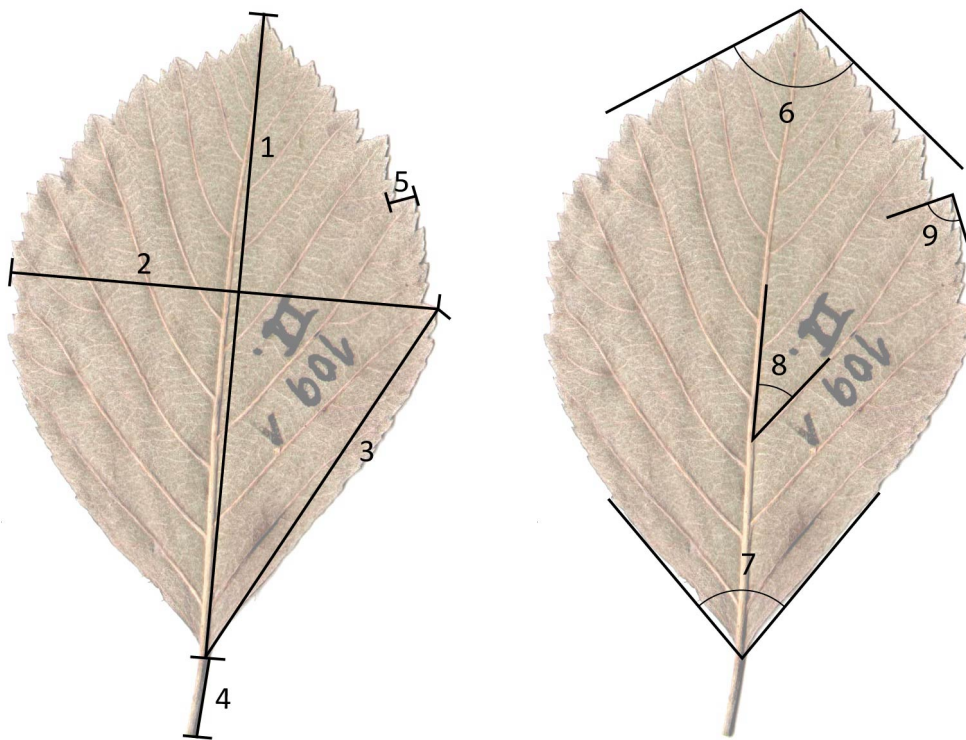
### 3.4. | Morfometrické analýzy

Pro morfometrické analýzy byly sbírány sterilní větve s brachyblasty ze středně osluněné části koruny stromu, neboť jsou na nich listy nejlépe vyvinuty a vykazují nejmenší variabilitu způsobenou vnějšími podmínkami (Aas et al., 1994; Lepší et al., 2008). Větve byly následně herbářovány. Analýze byly podrobeny prostřední listy z brachyblastů (tedy nikoli nejmladší ani nejstarší), neboť vykazují nejmenší ontogenetickou a ekologickou variabilitu (Meyer et al., 2005; Lepší et al., 2009). Herbářové položky budou uloženy v herbáři Přírodovědecké fakulty UK (PRC) a v herbáři Jihočeského muzea České Budějovice (CB).

Měřené znaky byly vybrány podle předchozích studií rodu *Sorbus*, z literárních pramenů a na základě konzultací se specialisty. Vybrány byly pouze znaky, které jsou použitelné k determinaci taxonů (Lepší et al., in press; viz tab. 5 a délkové a úhlové znaky viz také obr. 4). Listy byly naskenovány pomocí stolního skeneru v kvalitě 300 dpi s přiloženým měřítkem.

**Tab. 5:** Měřené morfometrické znaky.

číslo znaku	kód	znak	jednotky	vzorec (pokud složený znak)
1	<b>L</b>	délka čepele	cm	
2	<b>W</b>	šířka čepele	cm	
3	<b>WB</b>	délka mezi nejširším místem a bází čepele	cm	
4	<b>P</b>	délka řapíku	cm	
5	<b>T3</b>	hloubka zářezu mezi 3. a 4. žilkou od báze	cm	
6	<b>AA</b>	úhel vrcholu	stupně	
7	<b>AB</b>	úhel báze	stupně	
8	<b>A3V</b>	úhel mezi 3. a hlavní žilkou	stupně	
9	<b>A3T</b>	úhel zubu, ve kterém končí 3. žilka	stupně	
10	<b>T34</b>	počet zubů mezi 4. a 3. žilkou od báze	počet	
11	<b>NV</b>	průměrný počet žilek na 1 straně listu	počet	(počet žilek napravo+nalevo)/2
12	<b>L/W</b>	poměr délky a šířky čepele	počet	=1/2
13	<b>L/WB</b>	relativní délka mezi nejširším místem a bází čepele		=1/3
14	<b>T3/L</b>	relativní hloubka zářezu mezi 3. a 4. žilkou od báze		=5/1
15	<b>T34/L</b>	relativní počet zubů mezi 4. a 3. žilkou od báze		=10/1
16	<b>NV/L</b>	relativní počet žilek		=11/1
vyřazeno	<b>NVP</b>	počet párů žilek	počet	
vyřazeno	<b>T3/W</b>	relativní hloubka zářezu mezi 3. a 4. žilkou od báze II		5/2



**Obr. 4:** Znaky 1 až 9 měřené na listech jeřábů (bez počtů a znaků poměrových a složených). Názvy znaků viz tabulka 5.

### 3.4.1. Klasická morfometrika

Pro každého jedince byly pomocí programu imageJ (v1.48; Schneider et al., 2012) změřeny výše uvedené znaky na 2 listech. Výsledná matice dat pro analýzu pomocí multivariačních metod byla vytvořena výpočtem průměru z 2 naměřených hodnot u každého jedince. U 7 % jedinců byly použity hodnoty pouze z jednoho listu, protože více listů vhodných k morfometrickým analýzám nebylo k dispozici. Jedinci s chybějícími údaji byli vyloučeni z analýzy. Morfometrická data byla zpracována v programu R s rozšiřujícími balíčky *ade4*, *class*, *permut*, *scatterplot3d* a *vegan* (R Core Team, 2013) pomocí sady funkcí *MorphoTools* (Koutecký, 2015).

V matici dat byli jedinci rozděleni do skupin podle dvou úrovní: populace a taxon. Jako taxon byl zvolen buď stupeň ploidie (při analýze všech jedinců dohromady) nebo taxon odvozený na základě zjištěné ploidie a alelického fenotypu (při analýze jednotlivých ploidních úrovní zvlášť). U naměřených dat byly nejprve spočítány základní statistiky (funkce *descr.tax*). Dále byly jednotlivé znaky testovány na normální rozdělení dat pomocí Shapiro-Wilk testu (funkce *shapiro.test*). Znaky s nenormálním rozdělením byly transformovány pomocí dekadického logaritmu. Vztahy znaků byly zjištěny pomocí Pearsonova korelačního koeficientu (funkce *corr.p*). Dvojice znaků s koeficientem  $>0,95$

byly považovány za těsně korelované (Marhold and Suda, 2002; Koutecký, 2015) a jeden z dvojice byl z dalších analýz vyřazen.

Pro odhalení základní struktury dat byla provedena analýza hlavních komponent (PCA; funkce *pca.calc*). Součástí této analýzy byla standardizace dat na nulový průměr a jednotkovou směrodatnou odchylku. Pro zjištění znaků, které nejlépe odlišují skupiny (definované na základě stupně ploidie a alelického fenotypu), byla provedena kanonická diskriminační analýza (funkce *disc.calc*).

### 3.4.2. Geometrická morfometrika (eliptická Fourierova analýza)

Pro zhodnocení tvarů listů byl vybrán vždy jen jeden list na jedince s celistvým okrajem (bez vykousnutí od hmyzu apod.). V programu Shape (ver. 1. 3; Iwata and Ukai, 2002) byly listy podrobeny obrysově analýze založené na eliptických Fourierových deskriptorech. Tvar listu byl nejprve převeden na tzv. řetězový kód (podprogram ChainCoder), který byl dále převeden na koeficienty Fourierových deskriptorů za pomoci 20 harmonických os (podprogram CHc2Nef). Z těchto koeficientů byla poté vypočítána skóre celkem 4 hlavních komponent a byla vytvořena rekonstrukce průměrného tvaru listu odpovídající poloze na hodnotě -2 a +2 směrodatné odchylky dané osy (podprogram PrinComp). Vizualizace první a druhé komponenty (PC1 a PC2) byla provedena pomocí sady funkcí MorphoTools (Koutecký, 2015) v programu R (R Core Team, 2013).

## 3.5. Experimentální křížení

Květenství byla ve stadiu poupat (30.4.2014) izolována pomocí sáčků z tkaniny Norinu (Hedva). Po rozkvětu (15.5.2014) bylo provedeno opylení mezi izolovanými květenstvími. Seznam hybridizací je uveden v Tab. 6. Po opylení byla květenství opět izolována Norinovými sáčky, které na nich zůstaly až do doby zralosti plodů. Malvice byly sebrány v září a semena z nich byla analyzována na průtokovém cytometru (viz výše).

**Tab. 6:** Seznam uskutečněných experimentálních křížení.

donor vajíčka		X	donor pylu		označení potomstva
označení stromu	druh (ploidie)		označení stromu	druh	
O-II-174 III/3	<i>S. danubialis</i> (4x)	X	O-II-178 IV/3	<i>S. aria</i> s.str.	D-A_1
O-II-174 III/1	<i>S. danubialis</i> (4x)	X	O-II-178 IV/4	<i>S. aria</i> s.str.	D-A_2
G-II-5 II/22	<i>S. cuculifera</i> (3x)	X	O-II-218 IV/20	<i>S. aria</i> s.str.	C-A_1
G-II-5 II/21	<i>S. cuculifera</i> (3x)	X	O-II-218 IV/20	<i>S. aria</i> s.str.	C-A_2

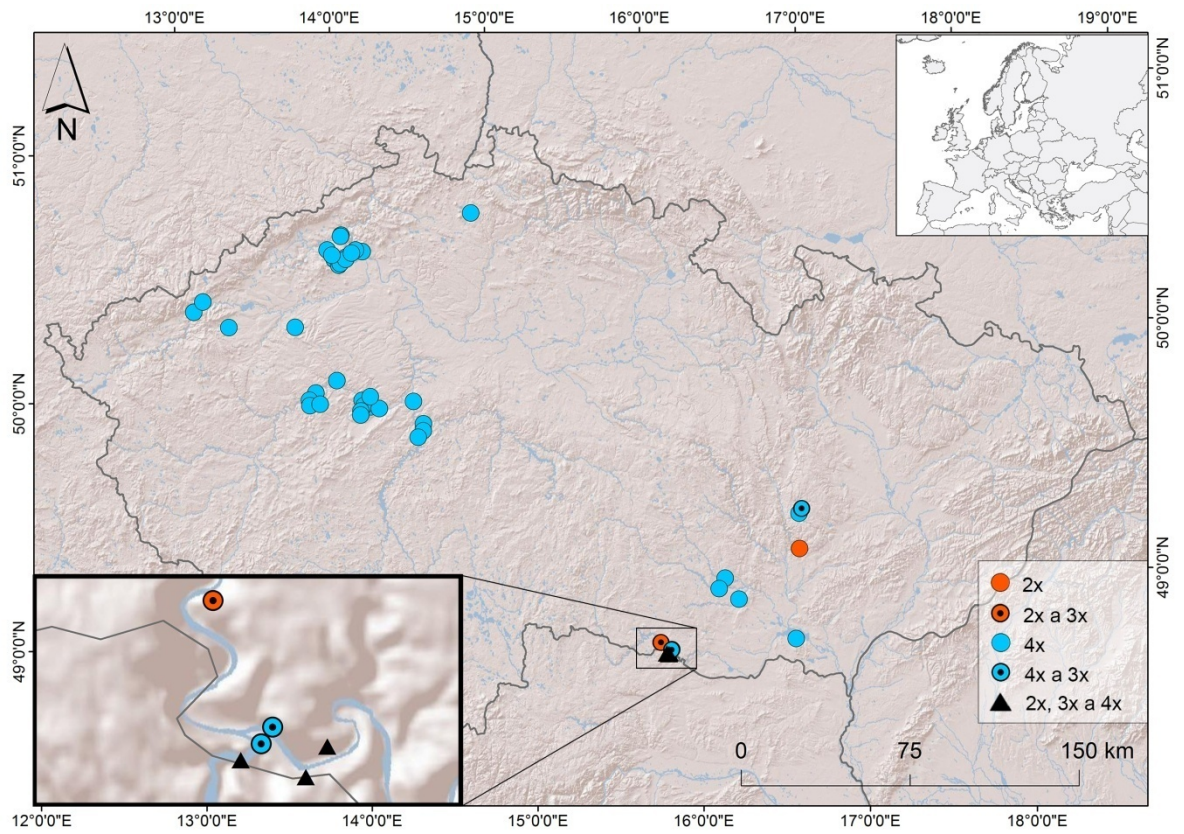
### 4.1. | Průtoková cytometrie

V letech 2012-2014 bylo navštíveno 90 lokalit s výskytem jeřábů ze skupiny *J. muku*, kde byly odebrány vzorky z 556 jedinců. Všichni jedinci byli podrobeni cytometrické analýze pro zjištění DNA ploidie. U 244 rostlin, které plodily, byla analyzována semena pro stanovení reprodukčních systémů (FCSS). Morfometrické analýzy byly provedeny u 465 jedinců (klasická morfometrika) a 454 jedinců (geometrická morfometrika). Molekulární analýza pomocí mikrosatelitových markerů byla uskutečněna u 496 jedinců. Studovaní jedinci byli pomocí těchto analýz zařazeni do 9 taxonů (viz kapitola Literární rešerše), 1 podskupiny (*S. pannonica* agg.) a 2 apomiktických hybridogenních linií, rozpoznaných M. Lepším v NP Podyjí (linie s pracovním názvem „*evanida*“ a „*pinetorum*“). Dále byla testována analýza pylu průtokovou cytometrií u 18 jedinců z Českého středohoří (*S. collina*, *S. danubialis*, *S. bohemic* a *S. torminalis*). V Dendrologické zahradě v Průhonicích bylo uskutečněno pilotní křížení 3 vybraných taxonů (7 jedinců patřících do druhů *S. cucullifera*, *S. danubialis* a *S. aria* s.str.) pro zjištění možnosti oplodnění vajíčka či endospermu cizím pylem.

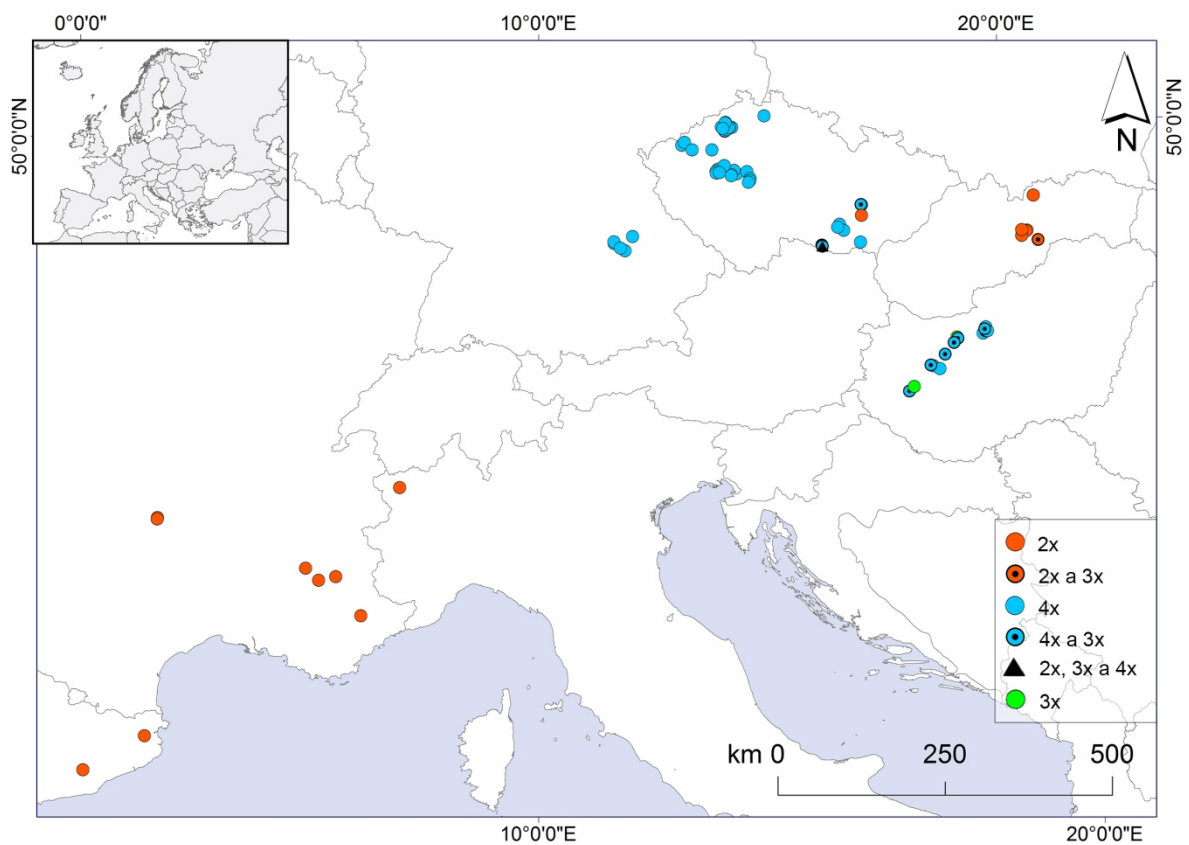
Část výsledků předkládané práce je zahrnuta v publikaci přijaté do tisku (Lepší et al., in press.; abstrakt viz Příloha 2).

#### 4.1.1. Cytogeografie

Cytometrickou analýzou jedinců ze skupiny *S. aria* agg. nalezených v České republice i zahraničí (viz Tab. 2 v kapitole Metodika) byly stanoveny 3 ploidní úrovně: diploidní ( $2n=34$ ), triploidní ( $2n=51$ ) a tetraploidní ( $2n=68$ ). Relativní velikost genomu pro jednotlivé ploidní úrovně byla  $0,3686 \pm 0,0090$  SD u diploidů,  $0,5582 \pm 0,0059$  SD u triploidů a  $0,7535 \pm 0,0102$  SD u tetraploidů, což plně zapadá do intervalů pro jednotlivé ploidie stanovené počítáním chromozomů (Vít, 2006; Lepší et al., 2008, 2013). Koefficienty variance u jednotlivých analýz nepřesahovaly 4,97 % (průměr 2,61 %) pro vzorek a 2,99 % (průměr 1,61 %) pro standard. Vzhledem k obsahu sekundárních metabolitů v pletivech čeledi Rosaceae jde o velmi nízké hodnoty ve srovnání s ostatními studii (např. Jedrzejczyk and Sliwinska, 2010). V rámci České republiky bylo více ploidních úrovní nalezeno pouze na jižní Moravě (kde byly nalezeny všechny tři cytotypy), kdežto všichni analyzovaní jedinci z Čech byly ploidně uniformní (tetraploidní). Detailní rozšíření cytotypů v ČR zobrazuje mapa na Obr. 5, rozšíření cytotypů analyzovaných jedinců v rámci evropského prostoru mapa na Obr 6.



Obr. 5: Rozšíření cytotypů skupiny *Sorbus aria* agg. v České republice.



Obr. 6: Rozšíření studovaných cytotypů v Evropském prostoru.

Taxonomické zařazení analyzovaných jedinců k jednotlivým druhům či liniím bylo potvrzeno molekulárními markery (viz dále). Až na jednu výjimku byly všechny studované taxony a linie ploidně homogenní. *S. aria* s.str. byl z analyzovaných taxonů jediným diploidním druhem. Čistě triploidních skupin bylo 5: taxony *S. cucullifera*, *S. moravica*, *S. pontis-satani* a linie „*evanida*“ a „*pinetorum*“. Plně tetraploidní druhy byly 3: *S. collina*, *S. danubialis* a *S. thayensis*. Cytotypová variabilita byla nalezena pouze u maďarských jedinců řazených do širší skupiny *S. pannonica* agg., kde byly nalezeni triploidní a jeden tetraploidní jedinec. Přehled ploidních úrovní u jednotlivých taxonů a linií ukazuje Tab. 7.

Nejširší rozšíření v České republice mají tetraploidní *S. danubialis* (Čechy, Pojihlaví, jižní Morava) a *S. collina* (Čechy). Diploidní druh *S. aria* s.str. se nachází pouze v Podyjí, kde je ovšem běžný. Z triploidních taxonů je nejhojnější *S. cucullifera*, který je v Podyjí (NP Podyjí a NP Thayatal) spolu s *S. aria* s.str. nejrozšířenějším druhem jeřábů. Ostatní triploidní druhy a linie (*S. moravica*, *S. pontis-satani*, „*evanida*“, „*pinetorum*“), stejně jako tetraploidní *S. thayensis* jsou svým výskytem vázány pouze na několik málo lokalit na jižní Moravě (v Podyjí, respektive Moravském krasu).

**Tab. 7:** Porovnání stanovených DNA ploidních úrovní analyzovaných taxonů a linií s počty chromosomů udávanými v literatuře.

taxon	počet měřených jedinců	DNA ploidní úroveň	udávaný počet chromosomů	literatura
<i>S. aria</i> s.str.	56	2x	34	Kutzelnigg 1994
<i>S. danubialis</i>	231	4x	68	Kutzelnigg 1994
<i>S. collina</i>	119	4x	51	Lepší et al. in press.
<i>S. cucullifera</i>	20	3x	51	Lepší et al. in press.
<i>S. thayensis</i>	12	4x	68	Lepší et al. in press.
<i>S. moravica</i>	13	3x	51	Lepší et al. in press.
<i>S. pontis-satani</i>	11	3x	51	Lepší et al. in press.
<i>S. graeca</i>	19	4x	68	Warburg and Kárpáti 1968, Meyer et al. 2005
<i>S. pannonica</i> agg.	15	3x, 4x	51	Májovský and Uhríková 1990
<i>S. subdanubialis</i>	3	3x	-	-
" <i>evanida</i> "	7	3x	-	-
" <i>pinetorum</i> "	8	3x	-	-

Kromě molekulárně a morfologicky jasně definovaných taxonů a linií bylo analyzováno i 7 singulárních jedinců, tj. apomiktických linií, které se od popsanych taxonů liší jak morfologicky, tak geneticky a jsou reprezentovány většinou pouze jednou rostlinou. Čtyři analyzovaní singulární jedinci se nacházeli v NP Thayatal (lokalita Bor u Hardeggu) a tři v CHKO Moravský kras (lokalita Nad Kateřinskou jeskyní). Pět singulárních jedinců bylo tiploidních (3 z NP Thayatal a 2 z M. krasu) a 2 tetraploidní (na každé lokalitě jeden). Jejich ploidní úrovně jsou uvedeny v Tab. 8.



**Tab. 8:** DNA ploidní úrovně a lokality singulárních jedinců ze skupiny *S. aria* agg.

číslo jedince	DNA ploidní úroveň	lokality
250	3x	Bor u Hardeggu
253	3x	Bor u Hardeggu
M138	3x	Bor u Hardeggu
b.204	4x	U začátku cesty na Bory
172-13	4x	Nad Kateřinskou jeskyní
659-11	3x	Nad Kateřinskou jeskyní
655-11	3x	Nad Kateřinskou jeskyní

#### 4.1.2. Reprodukční způsoby (FCSS)

Analýzou semen průtokovou cytometrií (FCSS; Matzk et al., 2000) byl zjišťován způsob reprodukce u 244 plodících jedinců: 16 diploidních (druh *S. aria* s.str.), 44 triploidních (druhy/linií *S. cucullifera*, *S. moravica*, *S. pontis-satani*, *S. thayensis*, "*evanida*" a "*pinetorum*") a 184 tetraploidních (*S. collina* a *S. danubialis*). Celkem bylo analyzováno 1476 semen. U 1193 z nich byla zjištěna ploidie embrya i endospermu, z jejichž poměru byl následně odvozen způsob vzniku semene (viz Tab. 9). U zbylých 283 semen bylo detekováno pouze embrya, endosperm nebyl zřetelný.

**Tab. 9:** Typy reprodukce stanovené na základě poměru ploidií embrya a endospermu u skupiny *S. aria* agg. (Upraveno podle Matzk et al. 2000.)

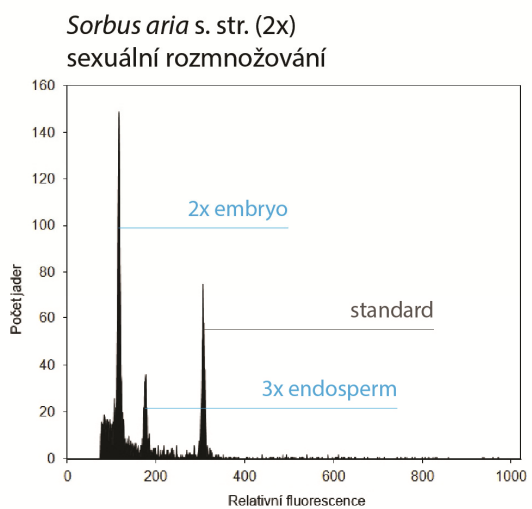
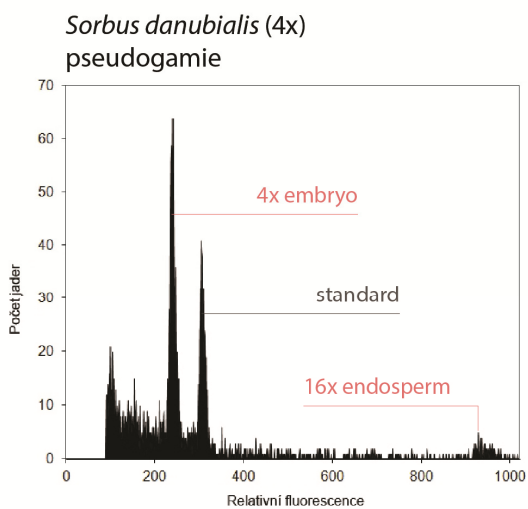
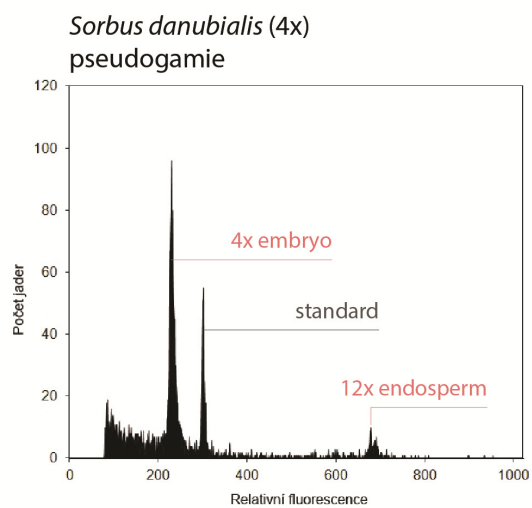
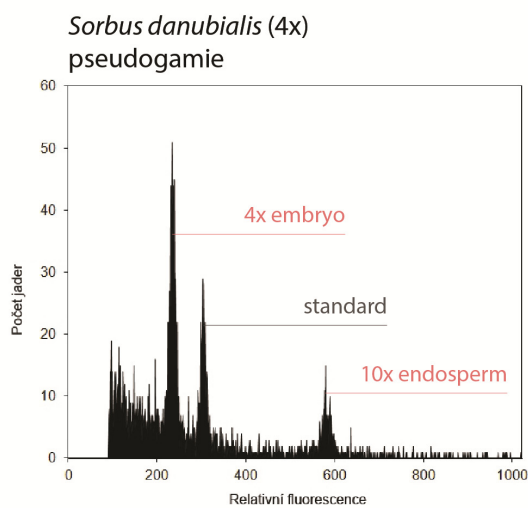
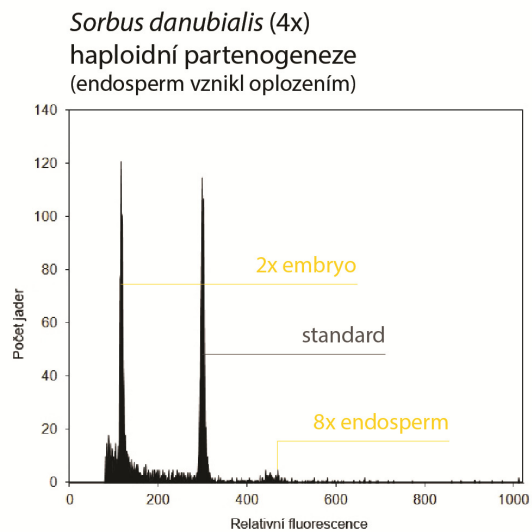
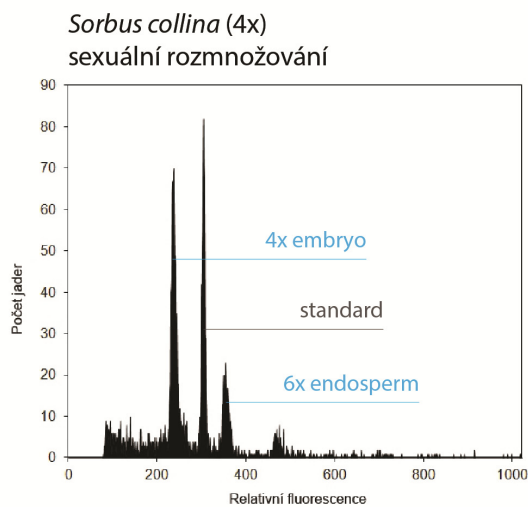
poměr embrya a endospermu (1C hodnot)	samíčí gameta		EMBRYO		ENDOSPERM		samíčí gameta		TYP REPRODUKCE
	reduk.	nereduk.	oplozené	partenogenetické	oplozením	autonomně	reduk.	nereduk.	
2:3	x		x		x		x		sexuální, redukované samčí gamety
3:5		x	x		x		x		neredukované sexuální
2:4		x		x		x			autonomní apomixie
2:5		x		x	x		x		pseudogamie, redukované samčí gamety
2:6		x		x	x			x	pseudogamie, neredukované samčí gamety
1:3	x			x	x		x		pseudogamní haploidní partenogeneze, redukované samčí gamety
1:4	x			x		x			pseudogamní haploidní partenogeneze, nereduk. samčí gamety

Z poměrů embrya a endospermu u analyzovaných semen bylo zjištěno 7 reprodukčních mechanismů: sexuální rozmnožování s redukovanými gametami (poměr 2:3), sexuální rozmnožování s účastí neredukované samičí gamety (poměr 3:5), pseudogamie s redukovaným pylem (poměr 2:5), pseudogamie s neredukovaným pylem (poměr 2:6) a haploidní partenogeneze spojená s pseudogamií (poměr 1:3, respektive 1:4 – podle typu samčí gamety – redukovaná/neredukovaná). Reprodukční způsob autonomní apomixie (poměr 2:4) nemohl být s jistotou určen, protože ploidy endospermu je v tomto případě nerozlišitelná od jader buněk embrya v G2 fázi buněčného cyklu (DNA je v tu chvíli zcela replikovaná, ale buňka se ještě rozdělila), a proto s ním nebylo počítáno. Všechny ploidy embryí a endospermů a jejich poměry nalezené u jednotlivých druhů jsou uvedeny v Tab. 10. Interpretace těchto poměrů je shrnuta v Tab. 11 a procentuální zastoupení jednotlivých způsobů u studovaných druhů a linií uvádí Tab. 12. Histogramy nejčastějších poměrů u všech ploidii jsou na Obr. 7 a 8. Některé z nalezených poměrů neodpovídaly žádnému ze základních reprodukčních způsobů (uvedených v Tab. 9), ale jelikož byly detekovány opakovaně, byly zařazeny do analýz (jejich možný vznik je diskutován níže v kapitole Diskuze). Poměr 4:16 (2:8) zjištěný opakovaně u semen jedinců všech tetraploidních druhů (*S. collina*, *S. danubialis* i *S. thayensis*) naznačuje možnost vzniku endospermu oplozením 2 samčích gamet. Pro lepší interpretaci vzniklých poměrů s předpokládanou účastí neredukovaných samčích gamet byla testována analýza pylu (viz dále).

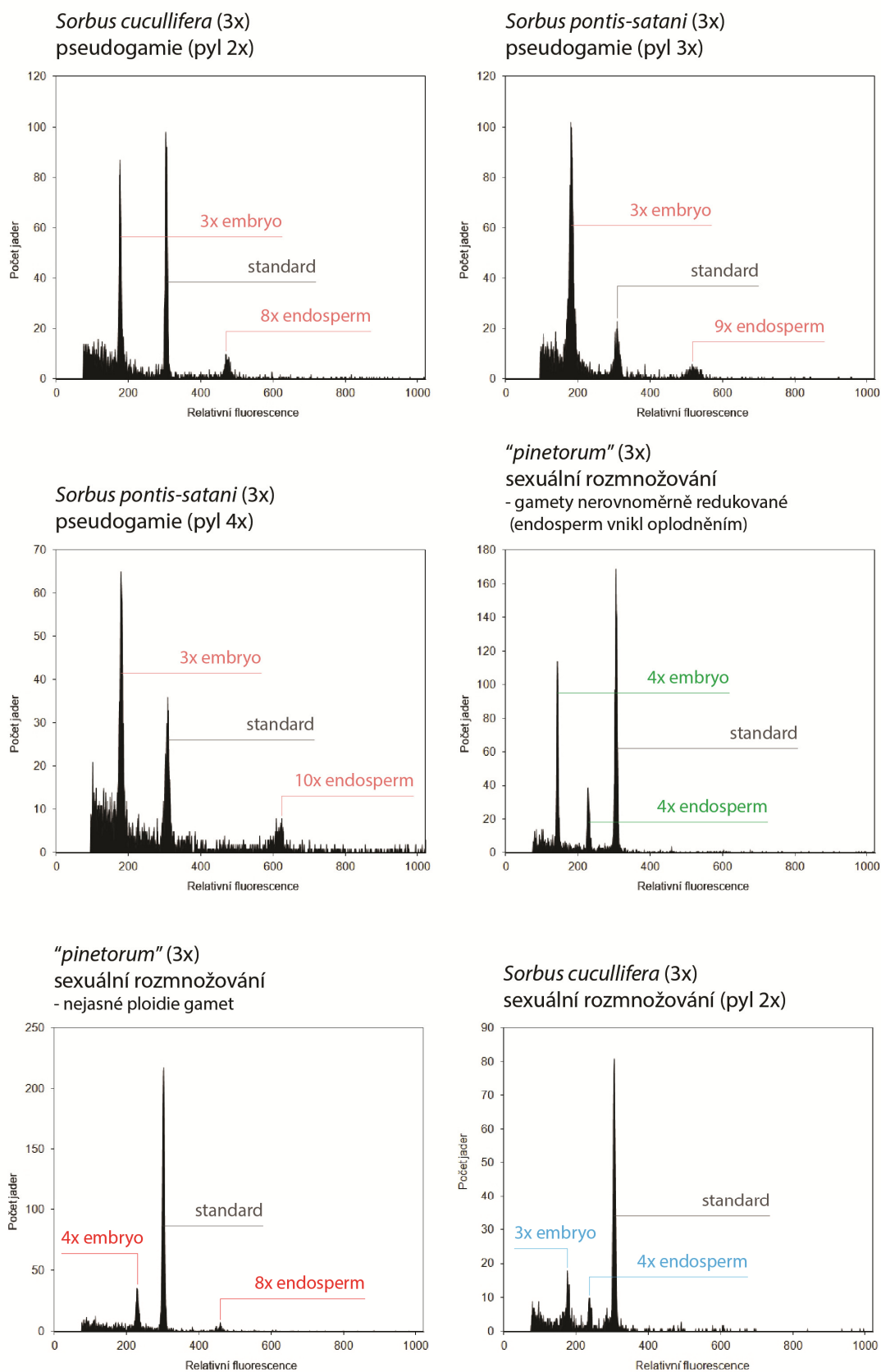


**Tab. 11:** Odvození reprodukčních způsobů z poměru ploidií embrya a endospermu pro jednotlivé cytotypy.  
 \* U vypočítané velikosti samčí gamety  $m=2$  nelze často rozhodnout, jedná-li se o neredukovanou gametu  $2x$  jedince či redukovanou gametu  $4x$  jedince. Případně je také možné, že byl endosperm oplozen dvěma spermatickými jádry, tedy  $2 \times 1n$  (tento případ je pravděpodobně relativně častý, viz níže kapitola Diskuze). Stejný případ je i u  $m=4$ , buď se jedná o neredukovanou gametu od  $4x$  otce nebo 2 redukované.

ploidie matky	typ reprodukčního způsobu	ploidie embrya	ploidie endospermu	vznik embrya	vznik endospermu	samičí gameta (f)	samčí gameta (m)*
2x	sexuální, redukované gamety	2	3	f+m	2f+m	1	1
4x	haploidní partenogeneze + pseudogamie (reduk. samčí gameta)	2	6	f	2f+m	2	2
	haploidní partenogeneze + pseudogamie (nereduk. samčí gameta)	2	8	f	2f+m	2	4
	sexuální, redukované gamety	4	6	f+m	2f+m	2	2
	pseudogamie, redukované samčí gamety	4	10	f	2f+m	4	2
	pseudogamie, neredukované samčí gamety	4	12	f	2f+m	4	4
3x	haploidní partenogeneze + pseudogamie	2,5	7	f	2f+m	2,5	2
	sexuální, redukované gamety I	3	4	f+m	2f+m	1	2
	sexuální, redukované gamety II	2,5	4	f+m	2f+m	1,5	1
	sexuální, neredukovaná samičí gameta I	4	7	f+m	2f+m	3	1
	sexuální, neredukovaná samičí gameta II	5	8	f+m	2f+m	3	2
	pseudogamie, redukované samčí gamety	3	7	f	2f+m	3	1
	pseudogamie, neredukované samčí gamety I	3	9	f	2f+m	3	3
	pseudogamie, neredukované samčí gamety II	3	10	f	2f+m	3	4



**Obr. 7:** Ukázka výsledných histogramů cytometrických analýz semen u tetraploidních a diploidních druhů pro jednotlivé reprodukční způsoby.



**Obr. 8:** Ukázka výsledných histogramů cytometrických analýz semen u triploidních druhů a linií pro jednotlivé reprodukční způsoby.

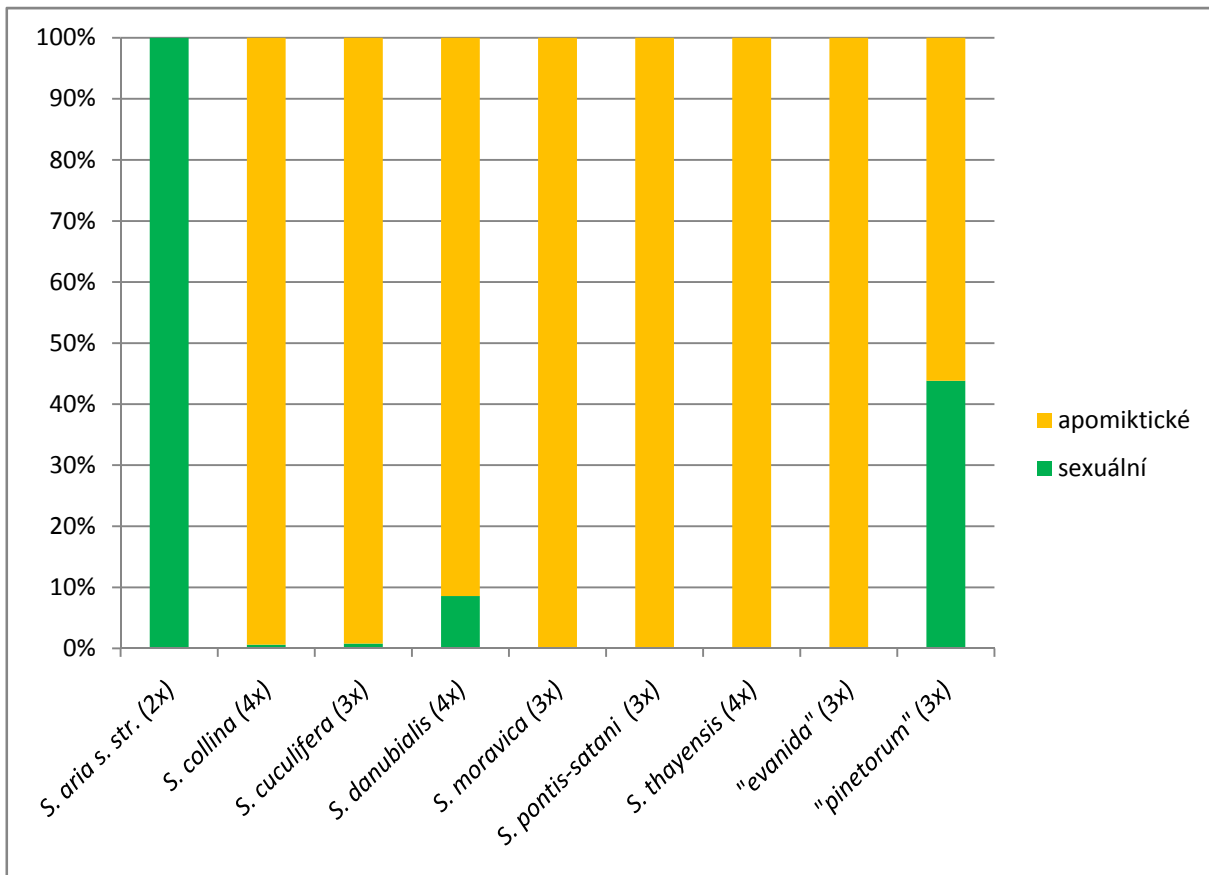
**Tab. 12:** Procentuální zastoupení typů reprodukčních způsobů u jednotlivých druhů a linií. Hodnoty jsou počítány z celkového počtu semen, u kterých byly detekovány embryo i endosperm. Semena, která měla odchýlený poměr ploidie embrya a endospermu od standardních hodnot, jsou uvedeny ve sloupci „ostatní“.  
\* U linie „*pinetorum*“ (3x) je 26% semen sice s nejasným poměrem, jedná se ale zcela určitě o produkty sexuálního procesu, protože embryo je tetraploidní, avšak poměr ploidii embrya a endospermu tomu neodpovídá.

druh/linie	haploidní partenogeneze - všechny možnosti dohromady	sexuální, redukované gamety	sexuální, neredukovaná samičí gameta	pseudogamie, redukované samčí gamety	pseudogamie, neredukované samčí gamety	ostatní poměry
<i>S. aria</i> s.str. (2x)	-	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>S. collina</i> (4x)	0,0	0,6	0,0	11,2	83,4	4,7
<i>S. cucullifera</i> (3x)	0,0	0,8	0,0	89,0	8,7	1,6
<i>S. danubialis</i> (4x)	0,5	8,6	0,0	8,2	77,6	5,1
<i>S. moravica</i> (3x)	0,0	0,0	0,0	14,9	83,0	2,1
<i>S. pontis-satani</i> (3x)	0,0	0,0	0,0	12,5	87,5	0,0
<i>S. thayensis</i> (4x)	0,0	0,0	0,0	8,4	80,0	11,6
" <i>evanida</i> " (3x)	0,0	0,0	0,0	85,7	14,3	0,0
" <i>pinetorum</i> " (3x)	1,4	11,0	6,8	54,8	0,0	26,0*

Všichni analyzovaní diploidní jedinci *S. aria* s.str. byli obligátně sexuální. Mezi polyploidními jedinci byli nalezeni jak fakultativní apomikti (*S. danubialis*, „*pinetorum*“), tak stabilizované a téměř zcela obligátně apomiktické linie (*S. moravica*, *S. pontis-satani*, *S. thayensis* a „*evanida*“). Dva druhy (*S. collina* a *S. cucullifera*) mají pravděpodobně jen zbytkovou sexualitu – bylo u nich nalezeno jen 1 semeno vzniklé pohlavním rozmnožováním, zbylá (168, respektive 126 semen) byla apomiktického původu. Procentuální vyjádření míry sexuality a apomixie u studovaných druhů a linií uvádí Tab. 13 a Obr. 9.

**Tab. 13:** Zařazení studovaných druhů a linií *S. aria* agg. podle převažujícího reprodukčního mechanismu.  
\* Vzhledem k menšímu počtu analyzovaných semen se nedá vyloučit možnost zbytkové sexuality, která byla nalezena u *S. collina* a *S. cucullifera*.

druh	počet měřených semen	% sexu	% apomixie	klasifikace druhu
<i>S. aria</i> s.str. (2x)	50	100,0	0,0	sexuální druh
<i>S. collina</i> (4x)	169	0,6	99,4	stabilizovaná apomiktická linie s reziduální sexualitou
<i>S. cucullifera</i> (3x)	127	0,8	99,2	stabilizovaná apomiktická linie s reziduální sexualitou
<i>S. danubialis</i> (4x)	548	8,6	91,4	fakultativní apomikt
<i>S. moravica</i> (3x)	47	0,0	100,0	stabilizovaná apomiktická linie *
<i>S. pontis-satani</i> (3x)	32	0,0	100,0	stabilizovaná apomiktická linie *
<i>S. thayensis</i> (4x)	95	0,0	100,0	stabilizovaná apomiktická linie *
" <i>evanida</i> " (3x)	14	0,0	100,0	stabilizovaná apomiktická linie *
" <i>pinetorum</i> " (3x)	73	43,8	56,2	fakultativní apomikt



**Obr. 9:** Procentuální zastoupení sexuálního a /nebo apomiktického způsobu rozmnožování u studovaných druhů a linií *S. aria* agg.

Ze 7 singulárních jedinců byly v letech 2012-2014 plodní jen 3, a to triploidní jedinci 250, 253 a M138 z lokality Bor u Hardeggu I. Všechna semena jedinců 250 a M138 byla pseudogamického původu s 3x embryem a 8x či 10x endospermem (vzniklým po oplodnění 2x nebo 4x pylem). Vzhledem k vysoké variabilitě semen jedince 253 jich bylo analyzováno větší množství než u ostatních jedinců (22 semen). Embrya tohoto singulárního jedince měla velikost odpovídající dvou až tři a půl násobku ploidní úrovně s plynulým přechodem. U 4 semen se endosperm detekovat nepodařilo. U zbylých semen z poměru ploidie embrya a endospermu vyplývá, že 17 semen vzniklo sexuálním rozmnožováním a jen jedno semeno obsahovalo embryo a endosperm odpovídající haploidní partenogenezi spojené s pseudogamií. Ploidie embrya a endospermu s odvozením reprodukčního způsobu pro všechna semena jedince 253 uvádí Tab. 14.



**Tab. 14:** Výsledky cytometrické analýzy semen u singulárního jedince 253 z lokality Bor u Hardeggu I.  
 \* 2x samčí gameta může být buď neredukovaná gameta od 2x jedince (*S. aria* s.str.) nebo redukovaná gameta od 4x (*S. danubialis*) případně 3x jedince (*S. cucullifera*/ „*pinetorum*“/ jedinec 253). Také se může jednat o oplození endospermu dvěma redukovanými spermatickými jádry od 2x jedince (2×1n)

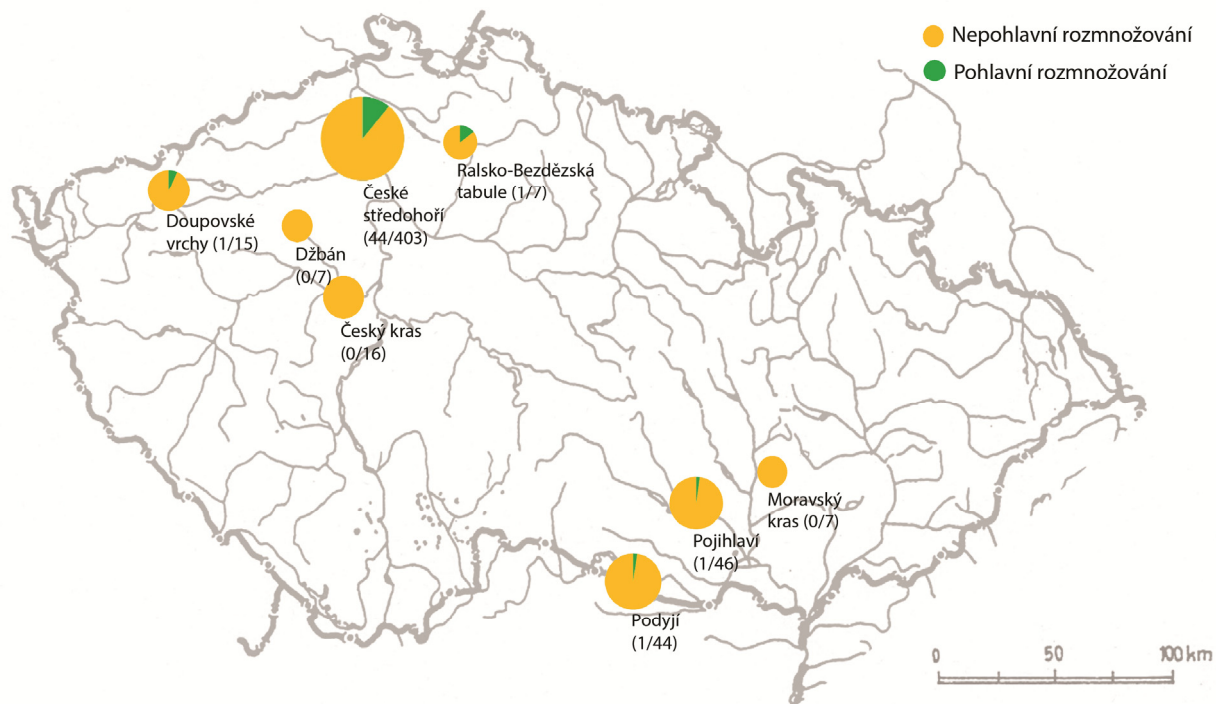
semeno	ploidie embrya	ploidie endospermu	typ reprodukčního způsobu	vznik embrya	vznik endospermu	samčí gameta (f)	samčí gameta (m)
253-1	2,06	-	-	-	-	-	-
253-2	2,19	6,95	haploidní partenogeneze + pseudogamie (reduk. samčí gameta)	f	2f+m	2,19	2,58
253-3	2,23	3,55	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,32	0,92
253-4	2,25	3,62	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,37	0,88
253-5	2,32	3,58	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,26	1,06
253-6	2,40	3,81	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,41	0,98
253-7	2,41	3,86	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,45	0,96
253-8	2,43	3,91	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,48	0,94
253-9	2,44	3,89	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,45	0,99
253-10	2,45	4,09	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,64	0,80
253-11	2,45	3,94	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,49	0,96
253-12	2,46	3,77	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,31	1,14
253-13	2,47	3,91	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,44	1,03
253-14	2,50	3,99	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,49	1,01
253-15	2,52	4,15	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,64	0,88
253-16	2,56	-	-	-	-	-	-
253-17	2,62	4,32	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,70	0,92
253-18	2,66	4,40	sexuální, redukované gamety	f+m	2f+m	1,75	0,91
253-19	2,81	-	-	-	-	-	-
253-20	3,37	4,73	sexuální*	f+m	2f+m	1,36	2,01*
253-21	3,49	4,97	sexuální*	f+m	2f+m	1,48	2,01*
253-22	3,55	-	-	-	-	-	-

#### 4.1.3. Geografická vazba míry sexuality u *S. danubialis* na regiony ČR

Většina studovaných druhů České republiky je svým výskytem vázána jen na malou oblast (s výjimkou *S. danubialis* a *S. collina*) a u velké části ze zkoumaných taxonů byl navíc nalezen pouze jeden typ rozmnožování (sexuální u *S. aria* s.str. a obligátní apomixie u *S. moravica*, *S. pontis-satani*, *S. thayensis*, „*evanida*“). Z apomiktů s reziduální sexualitou se *S. cucullifera* vyskytuje jen v NP Podyjí (0,8 % zjištěné reziduální sexuality). Druhý taxon, *S. collina*, je sice v Čechách široce rozšířený, ale opět zbytková sexualita je velmi vzácná (0,6 % analyzovaných semen, a to pouze na lokalitě Ostrý v Českém středohoří). Fakultativně apomiktická linie „*pinetorum*“ s téměř 50% sexualitou je vázána jen na oblast Podyjí (NP Thayatal). Z důvodu nízké sexuality u široce rozšířeného *S. collina* a omezeného rozšíření taxonů s vysokou mírou variability v reprodukčních systémech byla analýza zastoupení reprodukčních způsobů v jednotlivých regionech ČR provedena jen u široce rozšířeného a fakultativně apomiktického druhu *S. danubialis*. Procentuální zastoupení sexuálního a apomiktického rozmnožování u tohoto druhu v jednotlivých regionech a fytochorionech České republiky ukazuje Tab. 15 a Obr. 10. Největší zastoupení sexuálního rozmnožování (14 %) bylo nalezeno ve fytochorionu Ralsko-Bezděžská tabule, kde byl ale analyzován jen velmi malý počet semen – pouze 7. Druhé největší zastoupení pohlavního rozmnožování vykazuje region Českého středohoří (11 %), kde byl vzorek analyzovaných semen naopak největší (403 semen), protože *S. danubialis* je zde nejhojnějším druhem agregátu a také bylo v této oblasti velké procento jedinců plodných v letech, kdy byly vzorky sbírány. V regionech Český kras, Džbán a Moravský kras nebylo nalezeno žádné semeno jeřábu dunajského, které by vzniklo pohlavní cestou.

**Tab. 15:** Poměr pohlavního a nepohlavního rozmnožování u *S. danubialis* v jednotlivých regionech České republiky (plus NP Thayatal v Dolních Rakousech přilehlý k NP Podyjí, viz \*).

oblast	fytochorion	celkový počet semen	pohlavní rozmnožování [%]	apomixie [%]
<b>Český kras</b>	Český kras	16	0	100
<b>Doupovské vrchy</b>	Doupovské vrchy	15	7	93
<b>Džbán</b>	Džbán	7	0	100
<b>České středohoří</b>	Labské středohoří, Milešovské středohoří	403	11	89
<b>Moravský kras</b>	Moravský kras	7	0	100
<b>Podyjí</b>	Moravské podhůří Vysočiny, Dolní Rakousy*	44	2	98
<b>Pojihlaví</b>	Moravské podhůří Vysočiny	46	2	98
<b>Ralsko-Bezděžská tabule</b>	Ralsko-Bezděžská tabule	7	14	86



**Obr. 10:** Procentuální zastoupení sexuálního a apomiktického rozmnožování u *S. danubialis* v jednotlivých regionech České republiky (mapový podklad převzatý z <http://geoportal.alej.cz>).

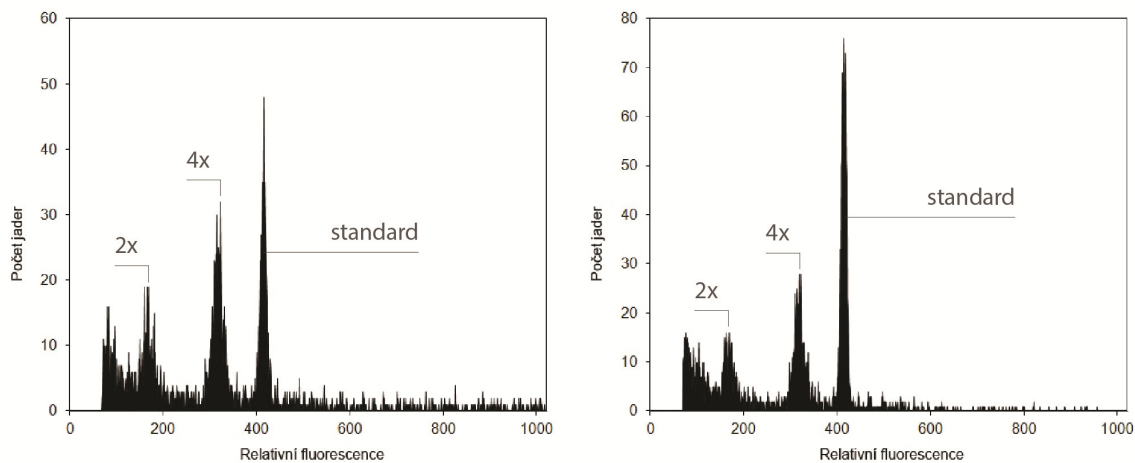
#### 4.1.4. Analýza pylu

Pro přesnější interpretaci výsledků analýzy semen byla vyzkoušena analýza pylu průtokovou cytometrií. Postup publikovaný autory Kron et al. (2012) se nepodařilo optimalizovat pro testované jedince a analýzu s fluorescenčním barvivem DAPI. Modifikovanou metodikou podle Doležel et al. (2007; viz kapitola Metodika) se analýza alespoň částečně zdařila. Výtěžek jader byl sice velice nízký, ale jednotlivé píky na výsledném histogramu byly jasně rozpoznatelné. Pyl byl analyzován u 18 jedinců: 8 jedinců *S. danubialis* (4x), 5 jedinců *S. collina* (4x), 4 jedinci *S. bohémica* (3x) a 1 jedince *S. torminalis* (2x). Celkem bylo provedeno 59 analýz, z čehož 16 bylo úspěšných (byla detekována generativní i vegetativní jádra), 12 jen částečně úspěšných (byla detekována jen generativní jádra) a zbylých 31 neúspěšných.

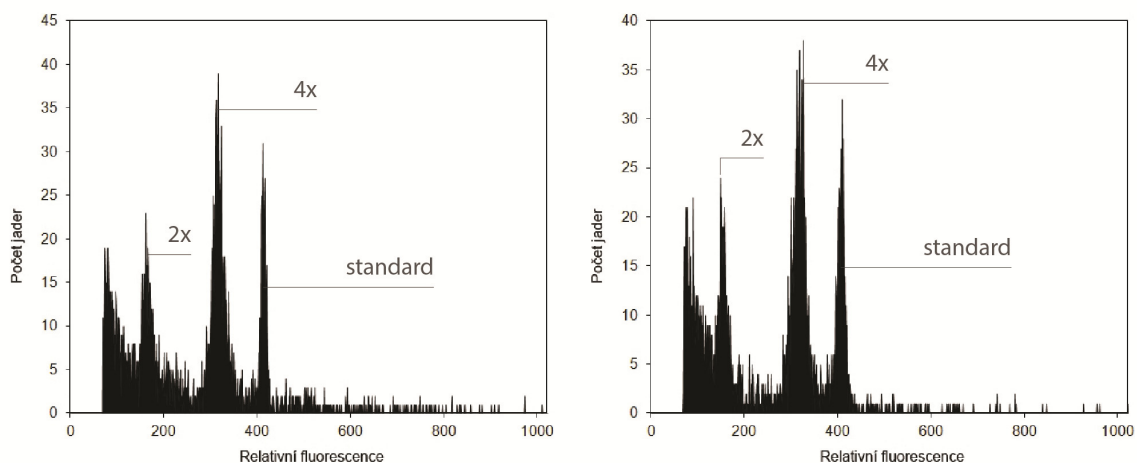
Rod *Sorbus* má tzv. binukleární (dvoujaderný) pyl, který obsahuje až do stadia pylové láčky jen 2 buňky: jádro buňky vegetativní o velikosti 1n a druhé jádro buňky generativní o velikosti 2n, které se až po vyklíčení pylu rozdělí na 2 jádra spermatická (o velikosti 1n). Analýza pylu byla úspěšná u tetraploidních druhů *S. collina* a *S. danubialis*, kde byla ve většině analýz detekována pylová jádra o velikosti 1n (2x, vegetativní jádra) a 2n (4x, generativní jádra), odpovídající redukovanému pylu (ukázkové histogramy viz Obr. 11). Třetina analýz byla jen částečně úspěšná – obsahovala jen 2n (4x) jádra generativní buňky. V žádné z analýz se neobjevila jádra o velikosti 4n (8x), která by odpovídala neredukovanému pylu. U diploidního druhu *S. torminalis* se analýza pylu zdařila

jen částečně. Pík vegetativních jader o velikosti 1n (1x) byl ve všech analýzách nezřetelný, takže byl znatelný jen pík generativních jader (1n=2x; viz Obr. 12). U triploidních jedinců *S. bohemica* se nepodařilo detekovat žádná jádra.

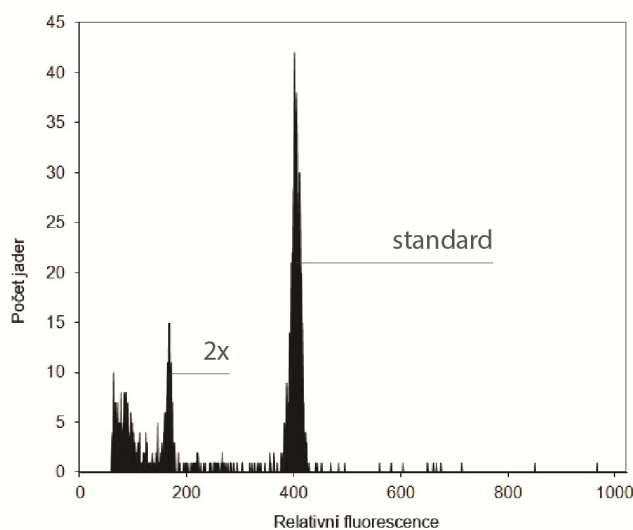
### *Sorbus collina*



### *Sorbus danubialis*



**Obr. 11:** Analýza pylu průtokovou cytometrií. Výsledné histogramy pro druhy *S. collina* a *S. danubialis*. Pylová zrna obsahují jádro buňky vegetativní (2x) a jádro buňky generativní (4x), která při klíčení pylové láčky dá vznik dvěma 2x spermatickým jádrům. Jedná se o redukovaný pyl.



**Obr. 12:** Analýza pylu průtokovou cytometrií. Na výsledném histogramu pro druh *S. torminalis* je zřetelné pouze jádro generativní buňky (2n, 2x), která dá při klíčení pylové láčky vznik dvěma 1n spermatickým jádřům. Jádro buňky vegetativní (1n) není v analýze zřetelné. Jedná se o redukovaný pyl.

#### 4.1.5. Experimentální křížení

Ze čtyř provedených křížení byla úspěšná jen 2, a to obě křížení druhů *S. cucullifera* (3x) a *S. aria* s.str. (2x). Diploidní jedinec *S. aria* s.str. byl v obou případech donorem pylu. Jedinci *S. danubialis* oplodnění druhem *S. aria* s.str. nevytvořili žádné malvice. Uskutečněná křížení s označením potomstva a počty vzniklých semen viz Tab. 16.

Celkem bylo zanalyzováno 20 semen, u kterých byla zjištěna ploidie jak embrya, tak endospermu. Všechna semena obsahovala 3x embryo a 8x endosperm. Jen jedno semeno z potomstva C-A\_2 obsahovala kromě 3x embrya a 8x endospermu ještě jeden pík navíc – odpovídající 16x. Pravděpodobně se jednalo o G2 fázi buněčného cyklu endospermu. Všechny zjištěné poměry odpovídají pseudogamii, apomiktickému rozmnožování spojenému s oplozením centrálních jader zárodečného vaku. Samičí gameta (od 3x *S. cucullifera*) byla v tomto případně neredukovaná (3x), samčí (od 2x *S. aria* s.str.) měla velikost 2n (2x), což mohla být 1 neredukovaná gameta či 2 redukované gamety.

**Tab. 16:** Potomstvo pocházející z pokusných křížení. Vzniklá semena byla analyzována metodou průtokové cytometrie.

A – *S. aria* s.str., C – *S. cucullifera*, D – *S. danubialis*.

donor vajíčka			X	donor pylu			označení potomstva	počet semen	poměr ploidii embrya a endospermu
označení stromu	druh	ploidie		označení stromu	druh	ploidie			
O-II-174 III/3	D	4x	X	O-II-178 IV/3	A	2x	D-A_1	0	-
O-II-174 III/1	D	4x	X	O-II-178 IV/4	A	2x	D-A_2	0	-
G-II-5 II/22	C	3x	X	O-II-218 IV/20	A	2x	C-A_1	15	3x : 8x
G-II-5 II/21	C	3x	X	O-II-218 IV/20	A	2x	C-A_2	5	3x : 8x

## 4. | Výsledky

### 4.2. | Molekulární analýzy – mikrosatelity

Molekulárním analýzám bylo podrobena 495 jedinců všech studovaných skupin rodu *Sorbus*. Navíc byli do analýzy přidáni jedinci z Norska, Slovenska a Makedonie, kteří nespádají do přímo studovaného středoevropského regionu, avšak mohou přinést dodatečné informace a pomoci při interpretacích získaných dat (viz Tab. 17). Celkem bylo analyzováno 12 mikrosatelitových úseků, které obsahovaly 232 alel. Jelikož většina taxonů je polyploidních (resp. vyskytuje se více ploidních úrovní - 2x, 3x, 4x), ze skórování alel výsledků byla vytvořena binární matice dat, která byla dále vyhodnocena metodami analýzy pro dominantní markery.

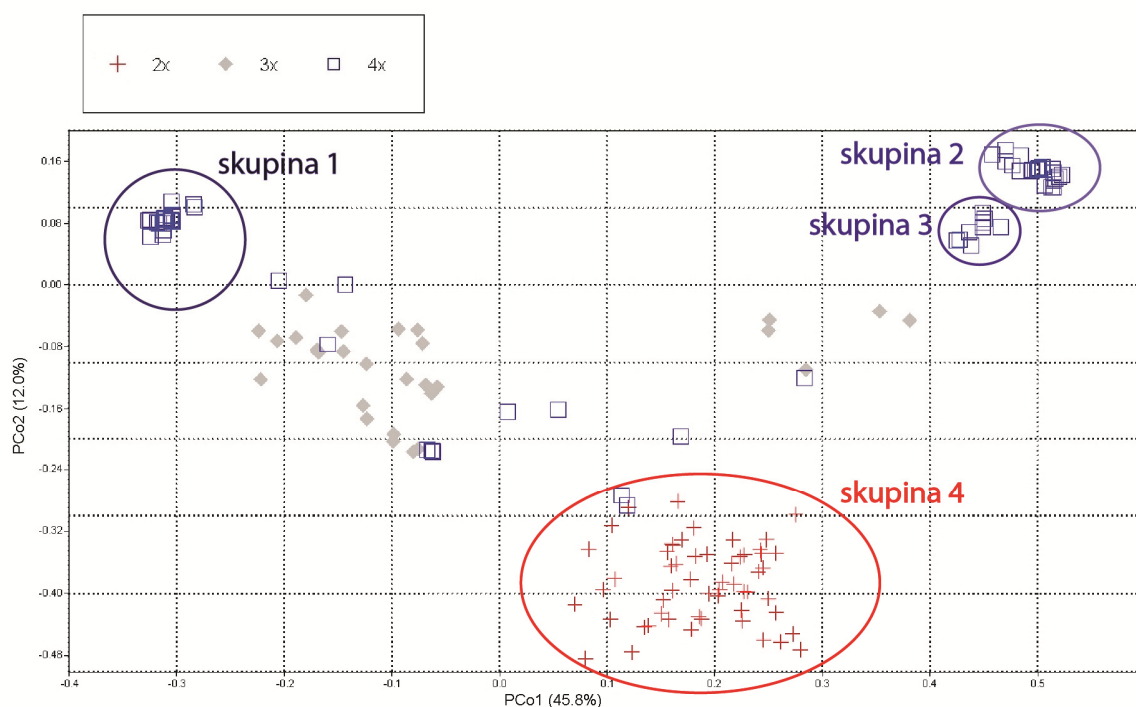
**Tab. 17:** Seznam druhů a linií, u kterých byla provedena analýza mikrosatelitů.  
\* Jedinci blíže neurčení z Maďarska a Norska, zařazení do analýzy pro získání dodatečných informací užitečných při interpretaci dat.

skupina	Počet analyzovaných jedinců
<i>S. aria</i> s.str.	56
<i>S. collina</i>	105
<i>S. cucullifera</i>	20
<i>S. danubialis</i>	210
<i>S. graeca</i>	20
<i>S. moravica</i>	12
<i>S. pannonica</i> agg.	14
<i>S. pontis-satani</i>	11
<i>S. subdanubialis</i>	3
<i>S. thayensis</i>	11
singulární jedinci (3x)	5
singulární jedinci (4x)	2
hybrid <i>aria</i> × <i>danubialis</i>	2
<i>S. sp.</i> *	9
" <i>evanida</i> "	7
" <i>pinetorum</i> "	8

celkem: 495

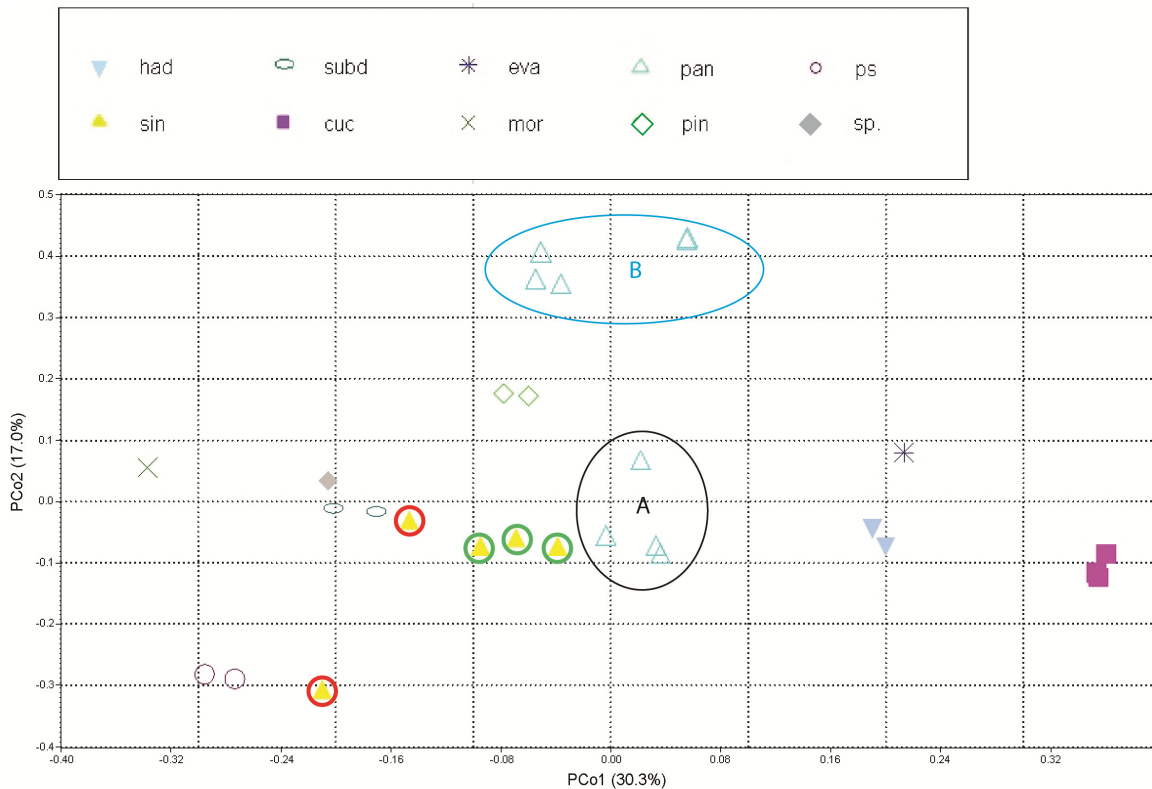
#### 4.2.1. Analýza hlavních koordinát

Analýzou hlavních koordinát (PCoA) byly jasně odlišeny všechny studované taxony a linie. Nejprve byli testováni všichni jedinci rozdělení do skupin podle ploidního stupně (Obr.13). V této analýze se podle prvních dvou os (vysvětlující 45,8 % a 12,0 % celkové variability) jasně odlišují 3 skupiny tetraploidních jedinců, následně označené jako *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*. Další kompaktní skupina je tvořena všemi diploidními (*S. aria* s.str.) a dvěma tetraploidními jedinci, kteří jsou umístěni na okraji. Triploidní a zbylí tetraploidní jedinci tvoří izolované skupiny až při zobrazení 3. až 5. osy. Pro lepší zobrazení struktury obou polyploidních skupin byla tedy provedena PCoA separátně pro triploidní a tetraploidní rostliny.



**Obr. 13:** Ordinační diagram analýzy PCoA všech studovaných jedinců rozdělených podle stupně ploidie. Osy vysvětlují 45,8 % a 12,0 % celkové variability. Z analýzy je patrné odlišení 3 skupin tetraploidů (1- *S. danubialis*, 2 – *S. collina*, 3 – *S. graeca*) a jedné skupiny tvořené diploidními jedinci (*S. aria* s.str.).

Při samostatné analýze triploidních jedinců došlo k jednoznačnému oddělení všech studovaných skupin již podle prvních dvou os (vysvětlující 30,3 % a 17,0 % variability, Obr.14). Odlišily se tedy taxony *S. cucullifera*, *S. moravica*, *S. pannonica* agg., *S. pontis-satani*, *S. subdanubialis* a linie „*evanida*“ a „*pinetorum*“. Jelikož je většina triploidních druhů obligátně apomiktická, tvoří často jen jeden genotyp a jedinci se tak v grafu překrývají (například *S. moravica* a linie „*evanida*“). Dva hybridní jedinci (*aria*×*danubialis*) tvoří samostatnou skupinu. V prostoru prvních dvou os jsou si blízcí tři singulární jedinci z Podyjí, kdežto jeden singulární jedinec z Moravského krasu spadá do okolí *S. subdanubialis* a druhý k *S. pontis-satani*. Rostliny s předpokládanou příslušností k *S. pannonica* agg. vytvořily dvě skupiny, a to poměrně vzdálené (viz také níže Obr. 16).

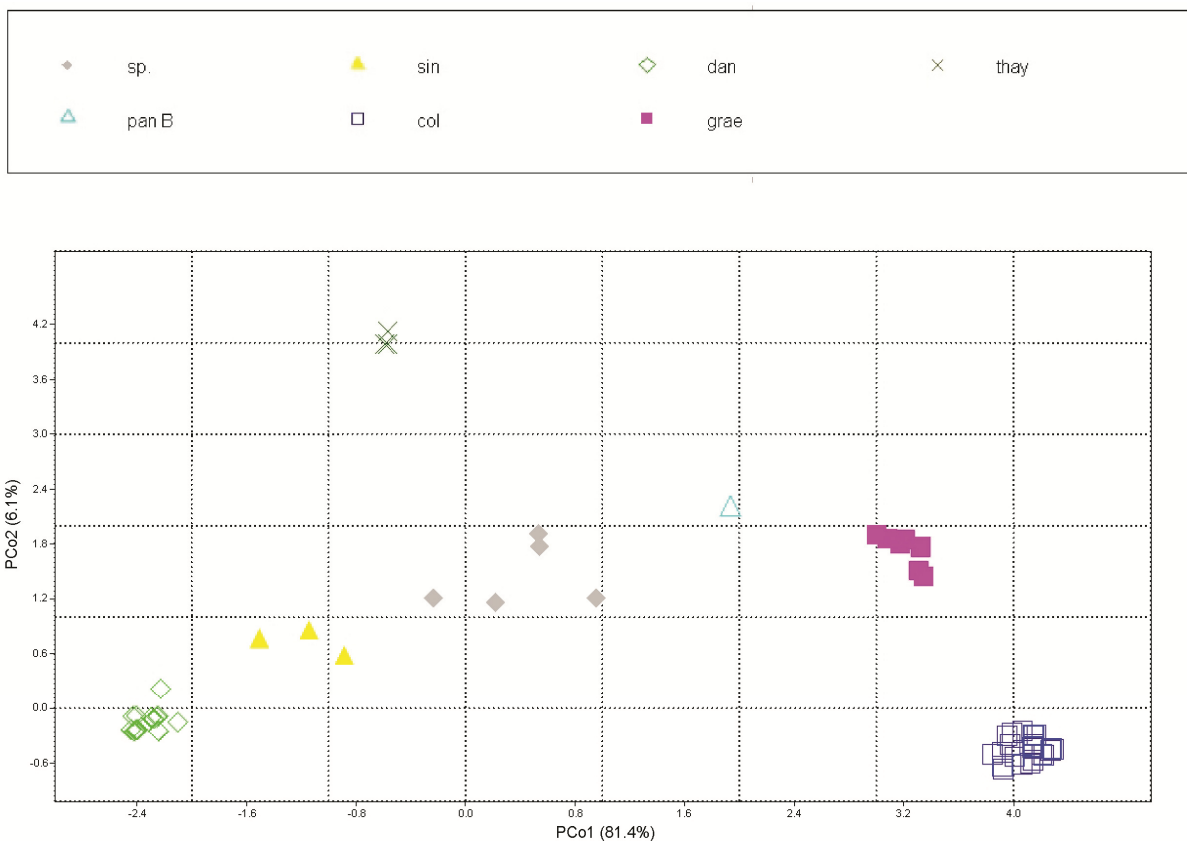


**Obr. 14:** Ordinační diagram analýzy PCoA triploidních jedinců: hybrid *aria*×*danubialis* (had), singulární jedinci (*sin*), *S. subdanubialis* (subd), *S. cucullifera* (cuc), „*evanida*“ (eva), *S. moravica* (mor), *S. pannonica* agg. (pan), „*pinetorum*“ (pin), *S. pontis-satani* (ps) a jeden blíže neurčený jedinec ze Slovenska (sp.). Osy vysvětlují 30,3 % a 17,0 % celkové variability.

Zelený kroužek – singulární jedinci z Podyjí. Červený kroužek – singulární jedinci z Moravského krasu. Černý kruh – skupina *S. pannonica* agg. A. Modrý kruh – *S. pannonica* agg. B.

Při analýze hlavních koordinát zahrnující pouze tetraploidní jedince (první dvě osy vysvětlují 81,4% a 6,1% celkové variability; Obr. 15) se jednoznačně oddělily všechny předpokládané druhy: *S. collina*, *S. danubialis*, *S. graeca* a *S. thayensis*. Tři singulární jedinci vytvořili také samostatnou skupinu, přestože se jedná o geograficky vzdálené jedince (z Podyjí, Moravského krasu a Ördog Oron v Maďarsku). Jediný tetraploidní zástupce *S. pannonica* agg. je blízký druhu *S. graeca* a při analýze všech jedinců byl součástí skupiny B (viz níže Obr. 16). Dále byli do analýzy zařazeni jedinci z Makedonie, kteří vytvořili samostatnou variabilní skupinu. Při analýze všech jedinců spadaly tyto makedonské vzorky do blízkosti *S. aria* s.str.

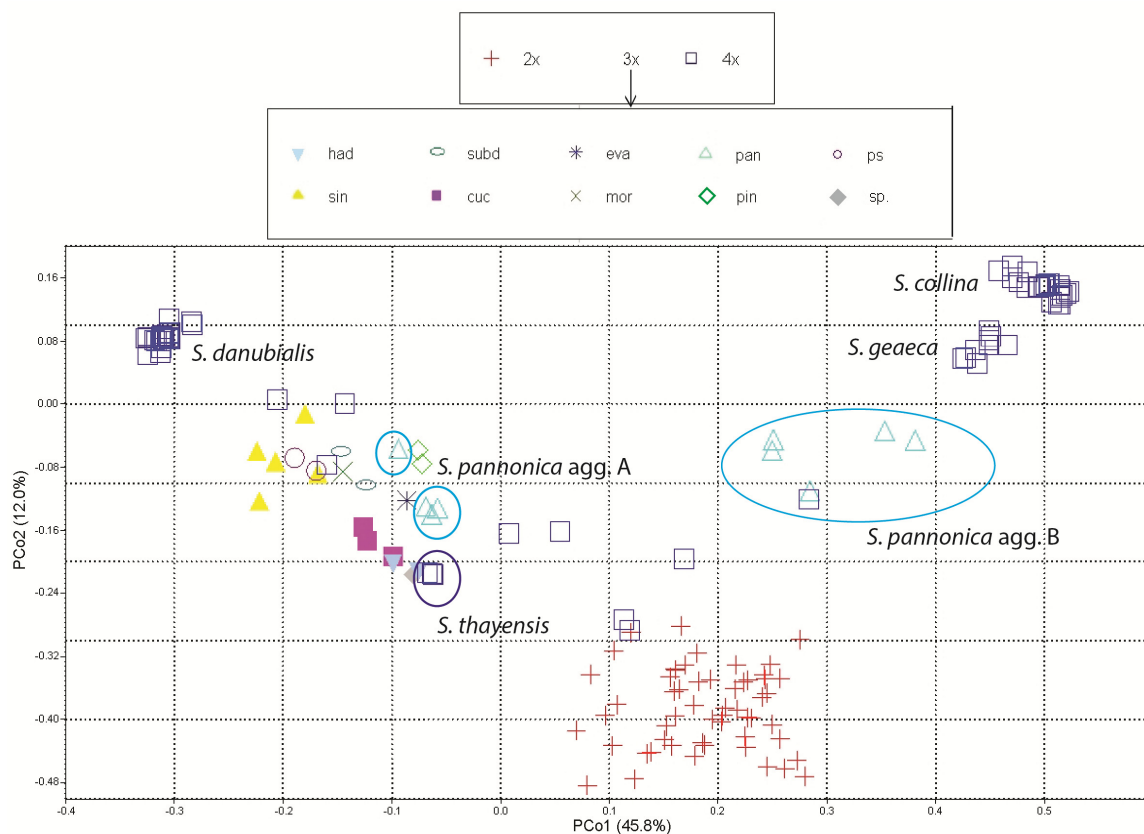




**Obr. 15:** Ordinační diagram analýzy PCoA tetraploidních jedinců: *S. collina* (col), *S. danubialis* (dan), *S. graeca* (grae), *S. thayensis* (thay), *S. pannonica* agg. (pan B) a singulární jedinci (sin) a jeřáby z Makedonie a Norska (sp.). První osa vysvětluje 81,4 % a druhá 6,1 % celkové variability.

Rozložení všech jedinců v prostoru prvních dvou koordinát (vysvětlující 45,8% a 12% variability) naznačuje, jaké druhy by mohly být rodiči hybridogenních polyploidů ze skupiny *S. aria* agg. (viz Obr. 16). Většina triploidů se nachází mezi diploidním taxonem *S. aria* s.str. a tetraploidním *S. danubialis*. Pouze jediná triploidní skupina – *S. pannonica* agg. B – leží mezi *S. aria* s.str. a taxony *S. graeca* a *S. collina*. Druh *S. thayensis* (4x) je z hybridogenních druhů nejbližší *S. aria* s.str.

Při porovnání velikosti shluků jednotlivých taxonů je zřetelné, že největší variabilitu má sexuální *S. aria* s.str. Fakultativně apomiktický druh *S. danubialis* se překvapivě jeví méně variabilní než téměř obligátní apomikt *S. collina*. Druhý fakultativní apomikt, linie „*pinetorum*“, tvoří stejně kompaktní shluk jako ostatní triploidní skupiny (obligátně apomiktické), ale tomuto výsledku asi nelze přikládat velkou váhu, neboť byl analyzován jen malý počet jedinců těchto druhů/linií.



**Obr. 16:** Ordinační diagram analýzy hlavních koordinát všech studovaných jedinců rozlišených podle stupně ploidie. Osy vysvětlují 45,8 % a 12,0 % celkové variability. Triploidní taxony: hybrid aria×danubialis (had), singulární jedinci (sin), *S. subdanubialis* (subd), *S. cucullifera* (cuc), „evanida“ (eva), *S. moravica* (mor), *S. pannonica* agg. (pan), „pinetorum“ (pin), *S. pontis-satani* (ps) a jeden blíže neurčený jedinec ze Slovenska (sp.).

#### 4.2.2. Sdílené alelické fenotypy

Skupiny definované na základě PCoA a stupně ploidie byly následně analyzovány pomocí programu Arlequin. Nejprve byly zjištěny shodné alelické fenotypy mezi všemi jedinci. Stejný fenotyp vykazovaly pouze vzorky patřící do jednoho druhu, nenašly se žádné mezidruhově sdílené fenotypy.

Podrobnější analýze populací byly podrobeny pouze široce rozšířené taxony – *S. aria* s.str., *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*. U sexuálního druhu *S. aria* s.str. se nenašly žádné sdílené alelické fenotypy mezi populacemi, dokonce ani mezi jedinci v rámci populace, tj. všech 55 analyzovaných jedinců mělo unikátní skladbu alel.

Populace *S. collina* (téměř obligátní apomikt) z Českého středohoří sdílí alely pouze mezi sebou, nikoli s ostatními regiony. Naproti tomu u populací z Českého krasu, Křivoklátska a Středního Povltaví byly nalezeny alelické fenotypy sdílené těmito oblastmi. Výjimkou byly populace Smetanova vyhlídka (Střední Povltaví), Sv. Jan pod Skalou (Čs. kras) a Zbečno (Křivoklátsko), které vykazovaly shodný alelický fenotyp pouze s populacemi v rámci svého regionu. Pouze jediná lokalita, Šlovice na Křivoklátsku, měla unikátní složení alel, které nebylo nalezeno nikde jinde. Jedná se o zanikající lokalitu, kde byla (oproti literárním pramenům) nalezena pouze jediná rostlina.

U druhu *S. danubialis* byla odhalena vazba jednotlivých alelických fenotypů na zemi původu. České, maďarské a německé populace většinou nesdílejí identické sady alel mezi sebou, ale pouze v rámci země. Výjimky tvoří populace Vértes Mts – Szedres völgy (Maď.), jejíž jedinci mají shodné fenotypy s většinou českých populací, a populace údolí řeky Naab (Něm.), která sdílí sadu alel s českou populací na Plešivci (České středohoří). V rámci České republiky mají identické alelické fenotypy rostliny z populací napříč všemi regiony, tedy Českým středohořím, Doupovskými horami, Džbánem, Českým krasem, Křivoklátskem, Středním Povltavím, Pojihlavím, Moravským krasem i Podyjím. Jediná unikátní sada alel je vázána pouze na dvě populace, a to na lokalitách Kozinecká stráž (Džbán) a Milešovka (Čs. Středohoří).

#### 4.2.3. Analýza molekulární variance (AMOVA)

Nejprve byla provedena AMOVA se skupinami podle ploidy úrovně a dalším rozdělení jedinců do taxonů. Z výsledků (uvedených v Tab.18) je patrné, že největší podíl variability se nachází mezi taxony se stejnou ploidy úrovní. Menší podíl variability je dán rozdíly mezi jedinci v rámci druhů. Fixační index  $F_{ST}$  (0,82538) naznačuje vysokou míru diferenciace mezi ploidy.

**Tab. 18:** Analýza molekulární variance (AMOVA) – porovnání skupin podle ploidy úrovně a jednotlivých taxonů studovaných druhů/linií rodu *Sorbus*.

zdroj variability	d. f.	suma čtverců	variační komponenty	procento variability
mezi skupinami (ploidy)	2	992,938	-3,62528 Va	-21,62
mezi taxony v rámci skupin	16	4812,095	17,46692 Vb	104,16
uvnitř taxonů	476	1393,937	2,92844 Vc	17,46
celkem	494	7198,971	16,77008	100,00

$F_{ST}$ : 0,82538 ( $p < 0,001$ )

Druhý běh analýzy AMOVA byl proveden s rozdělením jedinců do skupin podle taxonů a do podskupin podle populací. Do této analýzy byly opět zahrnuty jen široce rozšířené druhy tvořící větší počet populací: *S. aria* s.str., *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*. Z výsledků (viz Tab. 19) je patrné, že největší procento variability (85,8 %) se nachází mezi těmito taxony. Přibližně stejný díl pak připadá na mezipopulační (6,79 %) a vnitropopulační (7,41 %) variabilitu. Fixační index  $F_{ST}$  byl u této analýzy mírně vyšší (0,925594) než u analýzy předchozí, což ukazuje na vyšší míru diferenciace mezi taxony než mezi ploidy.

**Tab. 19:** Analýza molekulární variance (AMOVA) – porovnání vybraných, široce rozšířených taxonů a jejich populací.

zdroj variability	d. f.	suma čtverců	variační komponenty	procento variability
mezi taxony	3	4199,301	17,29915 Va	85,8
mezi populacemi v rámci taxonů	92	631,788	1,36892 Vb	6,79
uvnitř populací	295	440,481	1,49316 Vc	7,41
Celkem	390	5271,57	20,16123	100,00

$F_{ST}: 0,92594$  ( $p < 0,001$ )

#### 4.2.4. Variabilita v rámci druhů

Porovnání variability jednotlivých druhů bylo provedeno pomocí počtu genotypů, počtu polymorfních lokusů a indexu AGD („Average gene diversity over all loci“, Nei, 1987; viz. Tab. 20). Podle očekávání vykazuje největší variabilitu diploidní sexuální druh *S. aria* s.str. (AGD=0,127), kde má každý jedinec svou unikátní sadu alel. Některé apomiktické skupiny mají naopak jediný genotyp, a tedy nulový počet polymorfních lokusů i AGD. Jedná se o druh *S. moravica* a linii „*evanida*“.

Překvapivým výsledkem je pak porovnání fakultativních apomiktů s obligátními apomikty. Tetraploidní druh *S. danubialis* (téměř 9 % pohlavního rozmnožování; AGD=0,0048) vykazuje nižší variabilitu než *S. collina* (apomikt s reziduální sexualitou 0,6 %; AGD=0,0097), a dokonce i než obligátně apomiktický *S. thayensis* (AGD=0,0062; i když vzhledem k řádově menšímu počtu analyzovaných jedinců *S. thayensis* nemusí být tento výsledek signifikantní). Linie „*pinetorum*“ s vysokým podílem sexuálního rozmnožování (44 %) má nečekaně ještě nižší hodnotu AGD (0,0018) než *S. danubialis*, i než *S. cucullifera* (apomikt s reziduální sexualitou 0,8 %; AGD=0,0031).

Vysoké počty polymorfních lokusů a řádově vyšší hodnoty AGD oproti českým polyploidům mají druh *S. graeca* a skupiny *S. pannonica* agg. A i B. Tyto zahraniční skupiny bohužel nebyly podrobeny analýze reprodukčních způsobů. U skupiny *S. pannonica* agg. ale vyšší variabilita očekávána byla, neboť se nejedná o jasně vymezenou skupinu, jde o sběrnou skupinu velice blízkých taxonů.

**Tab. 20:** Porovnání genetické variability mezi jednotlivými druhy a liniemi *S. aria* agg. s ohledem na jejich reprodukční mechanismus.

AGD = „Average gene diversity over all loci“ (pravděpodobnost, že dvě náhodně vybrané homologní alely jsou rozdílné), S.E. = standardní chyba AGD.

skupina	počet jedinců	počet genotypů	celkový počet alel	počet polymorfních lokusů	AGD	s. d.	reprodukční způsob
<i>S. aria</i> s.str.	55	55	213	154	<b>0,127257</b>	+/- 0,062787	sexuální druh
<i>S. collina</i>	105	23	231	31	0,009722	+/- 0,005976	apomixie s reziduální sexualitou
<i>S. cucullifera</i>	20	3	232	3	0,003131	+/- 0,00272	apomixie s reziduální sexualitou
<i>S. danubialis</i>	210	28	232	21	0,004782	+/- 0,003474	fakultativní apomixie (9 % pohl. rozmn.)
<i>S. graeca</i>	20	9	232	18	0,01284	+/- 0,007821	-
<i>S. moravica</i>	12	1	232	0	0	+/- 0	obligátní apomixie
<i>S. pannonica</i> agg. A	5	4	232	32	0,056034	+/- 0,035666	-
<i>S. pannonica</i> agg. B (3x)	9	5	232	41	0,076149	+/- 0,042441	-
<i>S. pontis-satani</i>	11	2	232	1	0,000784	+/- 0,001232	obligátní apomixie
<i>S. subdanubialis</i>	3	2	210	4	0,012698	+/- 0,011397	-
<i>S. thayensis</i>	11	3	232	4	0,00627	+/- 0,00464	obligátní apomixie
" <i>evanida</i> "	7	1	232	0	0	+/- 0	obligátní apomixie
" <i>pinetorum</i> "	8	2	232	1	0,001847	+/- 0,002104	fakultativní apomixie (44 % pohl. rozmn.)

#### 4.2.5. Vnitropopulační variabilita široce rozšířených druhů

Výsledky analýzy variability uvnitř populací uvádí Tab. 21. U sexuálního druhu *S. aria* s.str. jsou hodnoty AGD pro jednotlivé populace nejvyšší, pohybují se v rozpětí 0,132 a 0,065. Stejně tak minimální (28) i maximální (46) počty polymorfních lokusů v populaci jsou u tohoto druhu řádově vyšší než u ostatních. Na variabilitu populací jeřábu muku navazují s jistým odstupem populace *S. graeca*, s maximální hodnotou AGD 0,017 a počtem polymorfních lokusů 6. Populace *S. collina* jsou podle těchto ukazatelů variabilnější, než populace *S. danubialis* (nejvyšší AGD 0,0115 oproti 0,0065). Tři nejvariabilnější populace u jeřábu dunajského jsou z Maďarska. U každého polyploidního druhu se vyskytují populace tvořené rostlinami se shodným genotypem, mají tedy nulový počet polymorfních lokusů i nulový index AGD. U *S. collina* je ovšem počet takovýchto

populací relativně nízký (10 %), kdežto u *S. graeca* je takových populací 46 % a u *S. danubialis* 64 %.

**Tab. 21:** Porovnání genetické variability mezi jednotlivými populacemi vybraných, široce rozšířených druhů *S. aria* agg.

AGD = „Average gene diversity over all loci“ (pravděpodobnost, že dvě náhodně vybrané homologní alely jsou rozdílné), S.E. = standardní chyba AGD.

druh		populace	počet jedinců	počet genotypů	celkový počet alel	počet polymorfních lokusů	AGD	S.E.
<i>S. aria</i> s.str.	max	Col de Cabre (FR)	3	3	232	46	0.132184	+/- 0.100433
	min	Belianske Tatry	4	4	232	28	0.064655	+/- 0.043992
<i>S. collina</i>	max	Sutomský vrch	3	3	232	4	0.011494	+/- 0.010316
	min	Skryjská jezírka	4	1	231	0	0	+/- 0
<i>S. danubialis</i>	max	Sas Hegy	4	3	232	3	0.006466	+/- 0.005770
	min	(29 populací ze 45)	-	-	-	-	0	-
<i>S. graeca</i>	max	Bakony - N of town	3	3	232	6	0.017241	+/- 0.014652
	min	Balaton - Malom völgy	3	1	232	0	0	+/- 0

## 4. | Výsledky

### 4.3. | Morfometrika

Celkem bylo morfometrickými metodami zhodnoceno 462 (numerická morfometrika), respektive 449 jedinců (geometrická morfometrika) patřících do všech studovaných druhů. Listy jeřábů jsou často napadány a ničeny fytofágním hmyzem, proto jsou počty analyzovaných jedinců pro některé méně rozšířené druhy velice nízké – během dvou let sběrů nebyly u některých nalezených jedinců (především druhu *S. pontis-satani* a linie „*pinetorum*“) žádné vhodné listy pro morfometrické zpracování. Počty měřených jedinců jednotlivých skupin uvádí Tab. 22.

Tab. 22: Počty jedinců hodnocené v morfometrických analýzách.

druh/linie	počty analyzovaných jedinců	
	klasickou morfometrikou	geometrickou morfometrikou
<i>S. aria</i> s.str.	37	31
<i>S. collina</i>	107	107
<i>S. cuculifera</i>	16	16
<i>S. danubialis</i>	217	216
<i>S. graeca</i>	19	19
<i>S. moravica</i>	13	8
<i>S. pannonica</i> agg.	14	14
<i>S. pontis-satani</i>	8	7
<i>S. subdanubialis</i>	2	2
<i>S. thayensis</i>	11	11
" <i>evanida</i> "	7	7
" <i>pinetorum</i> "	5	5
singulární jedinci	5	5
hybrid <i>aria</i> × <i>danubialis</i>	1	1
celkem:	462	449

#### 4.3.1. Klasická (numerická) morfometrika

Při analýze numerických morfologických dat byl nejprve proveden test na normální rozdělení jednotlivých znaků. Znaky P, T3, A3V, T34, NV, NVP, L/W, L/WB, T3/L, T3/W, T34/L a NV/L neměly normální rozdělení, byly tedy transformovány pomocí dekadického

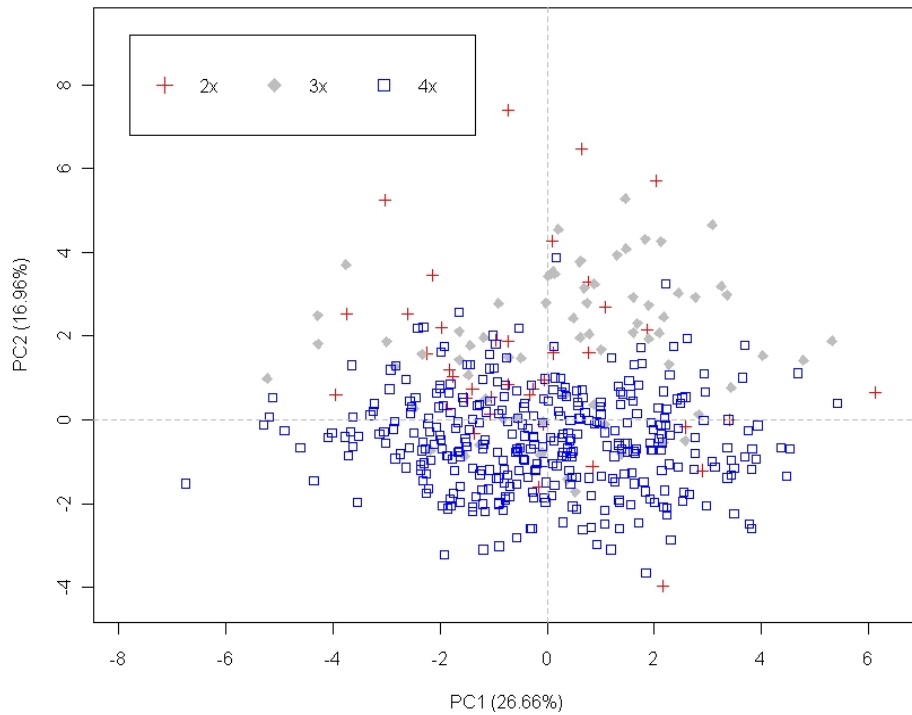
logaritmu (zkratky znaků viz výše Tab. 5, kapitola Metodika). Test korelace znaků pomocí Pearsonova korelačního koeficientu odhalil těsnou vazbu (hodnota koeficientu  $> 0,95$ ; Marhold and Suda, 2002) znaků NV-NVP (0,97) a znaků T3/L a T3/W (0,96). Znaky NVP a T3/W byly vyřazeny. Další nejtěsnější korelaci, která ovšem nepřekročila stanovenou hranici, prokazovaly znaky L-WB (0,92), T3-T3/L (0,91) a NV/L-WB (0,84).

Analýzy numerických dat byly provedeny nejprve na celém souboru dat, kde byli jedinci označeni podle ploidního stupně. Poté byly testovány jednotlivé podsoubory: 1. rozšířené druhy, 2. tetraploidní d. a 3. triploidní d. V těchto podsouborech byli dále jedinci rozděleni podle taxonů definovaných stupněm ploidie, reprodukčním způsobem a mikrosatelitovým pattern. Při analýzách jednotlivých podskupin byla vždy data opětovně testována na normální rozdělení a korelaci znaků.

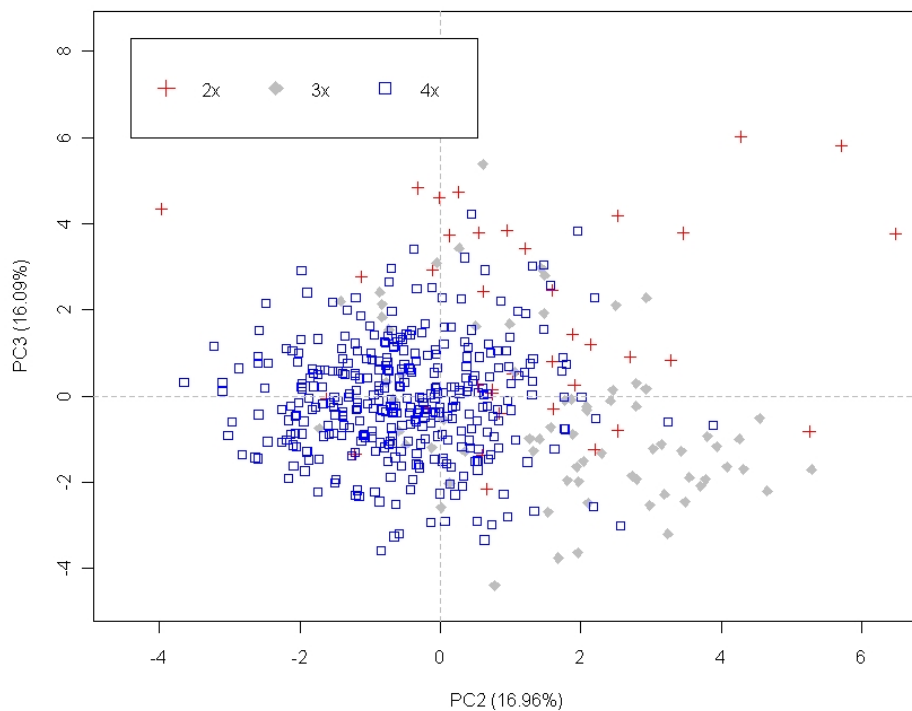
### **Analýza všech jedinců**

Analýza hlavních komponent pro všechna data (465 jedinců, 16 znaků) s rozdělením jedinců na 3 skupiny podle ploidního stupně (2x, 3x, 4x) ukázala částečné oddělení jednotlivých skupin podle prvních 3 os, které dohromady vysvětlovaly 59,71 % variability (viz Obr. 17 a 18). Dále byl vytvořen diagram znázorňující první 2 osy, kde jsou jedinci spojeni s centroidem své skupiny (Obr. 19). Hlavní znaky, které přispívají k oddělení diploidů od triploidů podél 1. osy, jsou délka mezi nejširším místem a bází čepele (WB), délka čepele (L), relativní počet žilek (NV/L) a šířka čepele (W). S druhou osou, která odlišuje tetraploidy od zbylých dvou ploidních úrovní, jsou nejvíce korelované znaky poměr délky a šířky čepele (L/W), úhel báze (AB) a relativní hloubka zářezu mezi 3. a 4. žilkou od báze (T3/L). Korelace jednotlivých znaků s prvními dvěma osami ukazuje Obr. 20 a jejich korelace s prvními třemi osami je uvedena v Tab. 23.

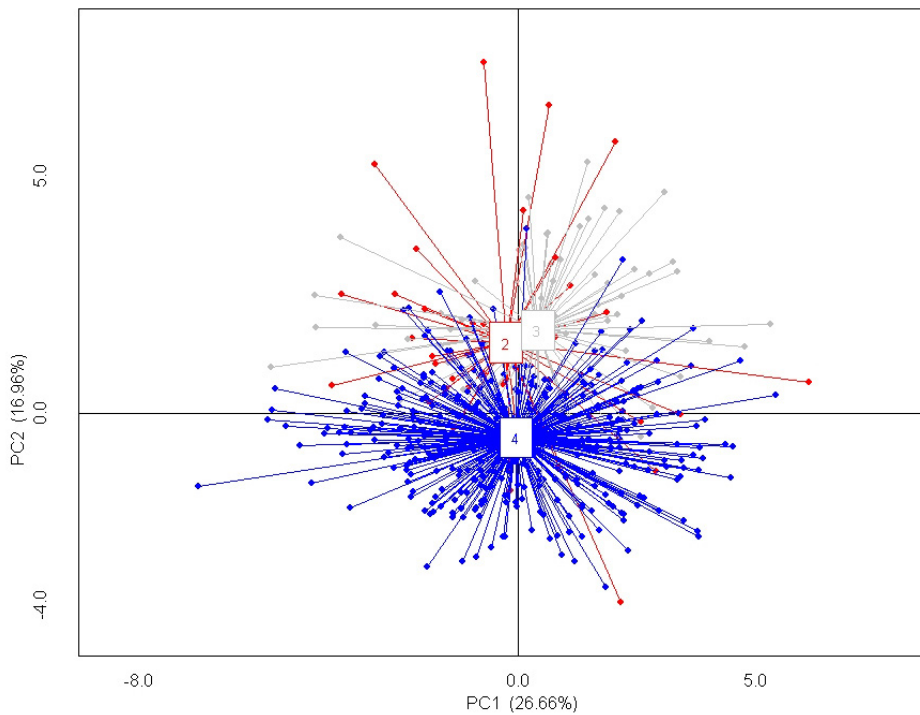




**Obr. 17:** Analýza hlavních komponent všech jedinců s 16 znaky s rozdělením jedinců do 3 skupin podle ploidie. První dvě osy vysvětlují 26,66 % a 16,96 % variability. Z obrázku je patrné částečné oddělení jednotlivých ploidních úrovní.

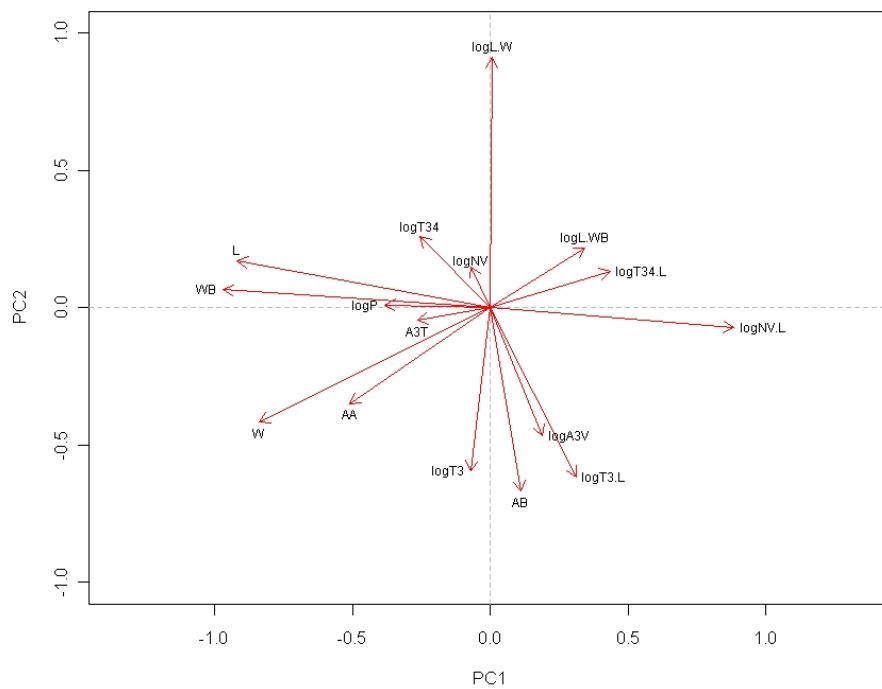


**Obr. 18:** Analýza hlavních komponent všech jedinců s 16 znaky s rozdělením jedinců do 3 skupin podle ploidie. Druhá a třetí osa vysvětlují 16,96 % a 16,09 % variability. Z obrázku je patrné částečné oddělení jednotlivých ploidních úrovní.



**Obr. 19.** Diagram analýzy hlavních komponent znázorňující jedince připojené k centroidu skupin (dle ploidního stupně) v prostoru prvních dvou os (PC1 26,66 %, PC2 16,96 %).

Červeně – diploidi, šedě – triploidi, modře – tetraploidi.



**Obr. 20:** Korelace znaků s prvními dvěma osami při analýze hlavních komponent všech jedinců.

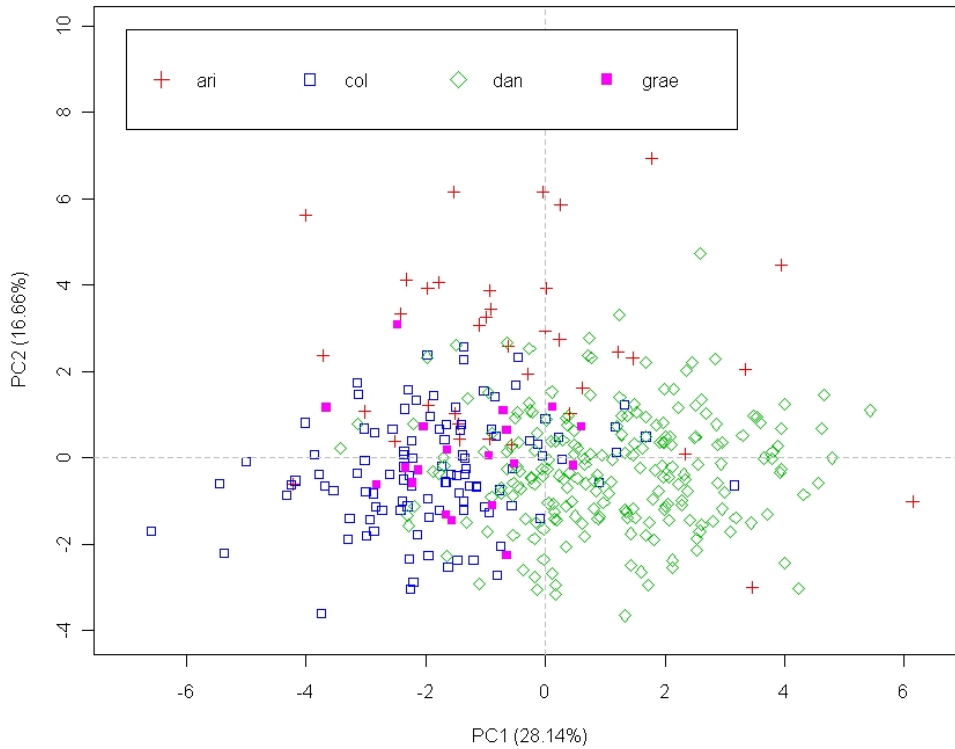
**Tab. 23:** Korelační koeficienty znaků s prvními třemi osami při analýze hlavních komponent všech jedinců. Nejvíce korelované znaky s jednotlivými osami jsou vyznačeny tučně.

číslo znaku	kód	PC1	PC2	PC3
1	L	<b>-0,9175</b>	0,1716	0,1602
2	W	<b>-0,8377</b>	-0,4163	0,2628
3	WB	<b>-0,9693</b>	0,0655	-0,0280
4	logP	-0,3825	0,0109	-0,1279
5	logT3	-0,0717	-0,5940	<b>-0,5403</b>
6	AA	-0,5105	-0,3483	-0,0890
7	AB	0,1115	<b>-0,6675</b>	<b>0,6050</b>
8	logA3V	0,1891	-0,4639	<b>0,6943</b>
9	A3T	-0,2637	-0,0441	0,3863
10	logT34	-0,2545	0,2586	0,3698
11	logNV	-0,0707	0,1499	<b>0,6101</b>
12	logL/W	0,0056	<b>0,9119</b>	-0,1952
13	logL/WB	0,3432	0,2193	0,4436
14	logT3/L	0,3108	<b>-0,6150</b>	<b>-0,5718</b>
15	logT34/L	0,4343	0,1338	0,2406
16	logNV/L	<b>0,8835</b>	-0,0728	0,1917

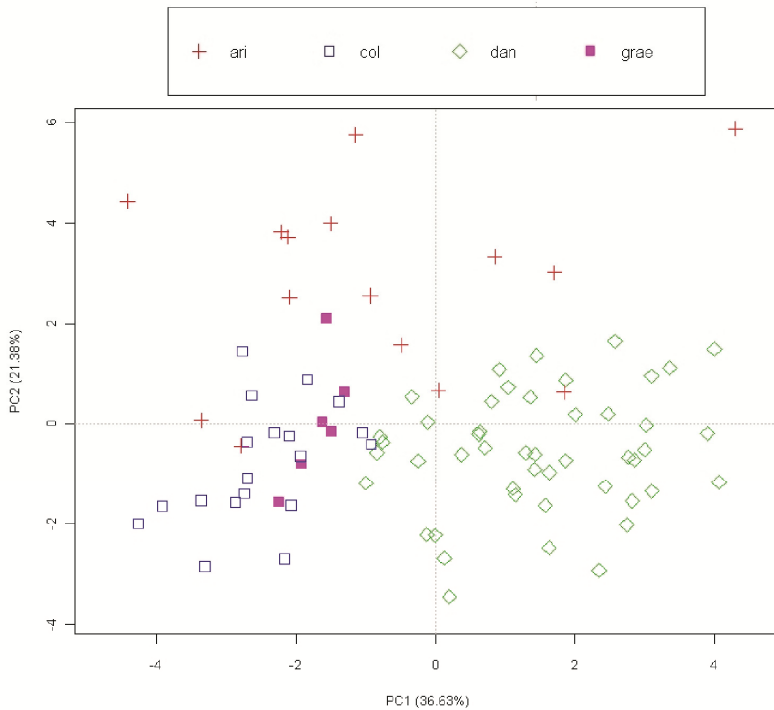
### Analýza pouze široce rozšířených druhů

Kvůli zjištění morfologické variability u široce rozšířených druhů ve střední Evropě byla další analýza hlavních komponent provedena pouze s těmito druhy, tedy *S. aria* s.str. (2x), *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca* (všechny 4x). Tato PCA byla provedena jak s jednotlivými jedinci (Obr. 21), tak s populačními průměry (Obr. 22). Výsledky PCA jedinců ukázaly, že *S. collina* tvoří jeden shluk se *S. graeca*. Při PCA s populačními průměry se ovšem *S. graeca* se *S. collina* už tak jasně nepřekrývá. Od těchto dvou druhů se v obou analýzách jasně odlišuje *S. danubialis*, a to podle první osy vysvětlující 28,14 % (PCA jedinců), respektive 36,63 % (PCA populací) variability. Podle druhé osy, vysvětlující 16,66 % (při PCA jedinců; 21,38 % při PCA populací), se odděluje *S. aria* s.str. od zbylých tetraploidních jedinců.

S ohledem na reprodukční způsoby je v PCA populací zřetelná větší variabilita sexuálního diploidního druhu *S. aria* s.str. než apomiktických tetraploidních taxonů (viz Obr. 21 a 22). Morfologická variabilita fakultativního apomikta *S. danubialis* s necelými 9 % zbytkové sexuality je podle očekávání širší než variabilita téměř obligátního apomikta *S. collina* (residuální sexualita jen 0,6 %). U *S. graeca* nebyl zjišťován reprodukční způsob a navíc u něj byl měřen jen malý počet jedinců (v porovnání s ostatními rozšířenými druhy).



**Obr. 21:** Ordinační diagram se zahrnutím jedinců široce rozšířených druhů ve střední Evropě: diploidní *S. aria* s.str. a tetraploidní *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*. První dvě osy vysvětlují 28,14 % a 16,66 % variability.

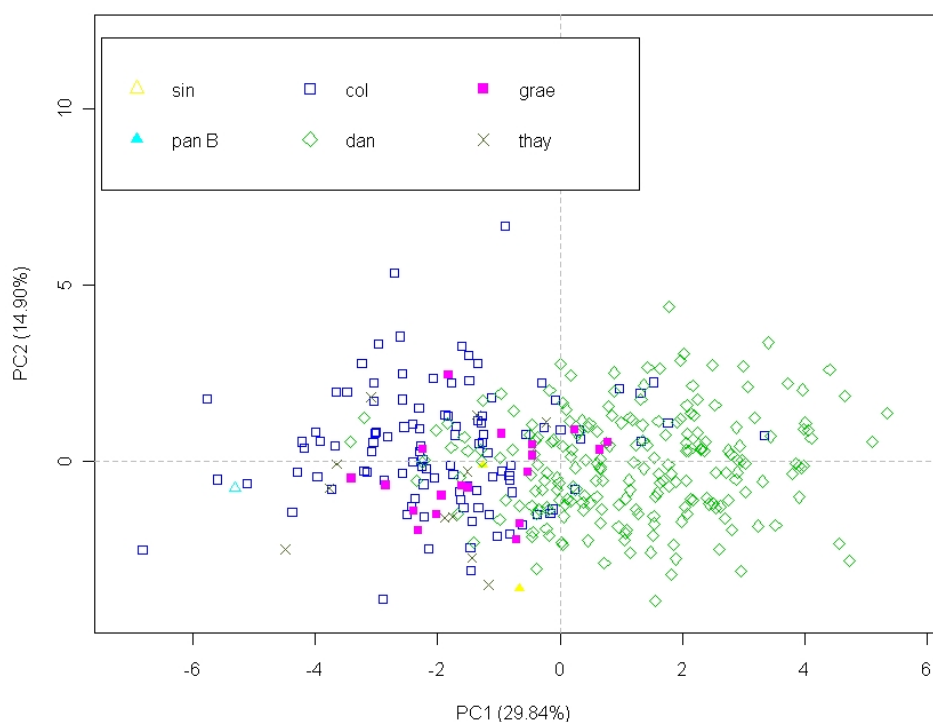


**Obr. 22:** Ordinační diagram se zahrnutím populačních průměrů široce rozšířených druhů ve střední Evropě: diploidní *S. aria* s.str. a tetraploidní *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*. První dvě osy vysvětlují 36,63 % a 21,38 % variability.

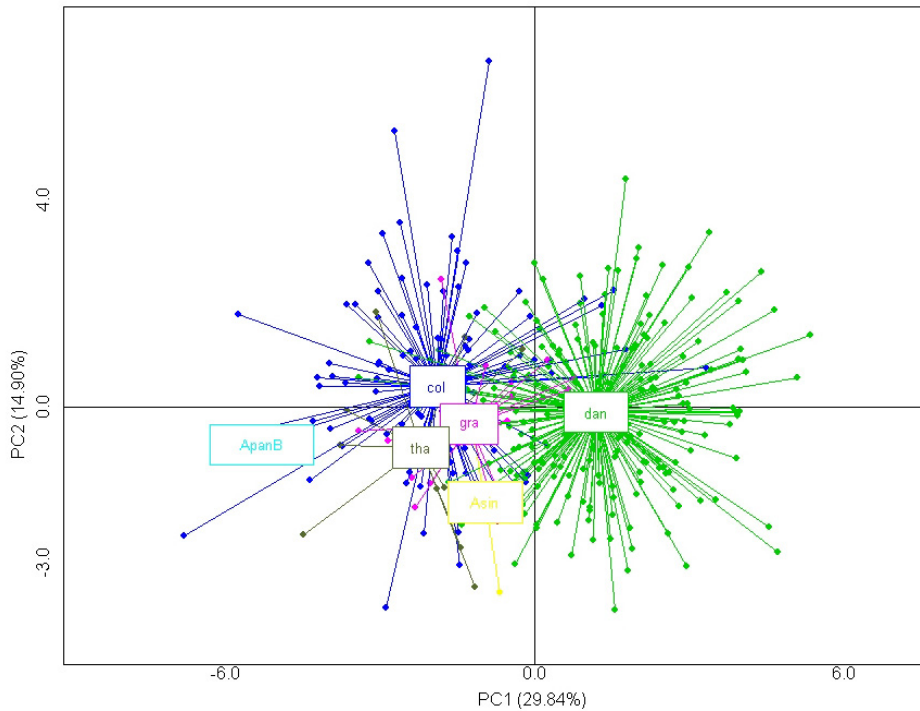
### Analýza tetraploidních druhů

Pro zobrazení vnitřní struktury všech tetraploidních druhů (včetně málo rozšířených a singulárních typů) byla provedena PCA samostatně pro tetraploidy, tedy druhy *S. collina*, *S. danubialis*, *S. graeca*, *S. thayensis*, *S. pannonica* agg. a singulární typy. Opět byla provedena analýza jak s jednotlivými jedinci, tak s populačními průměry.

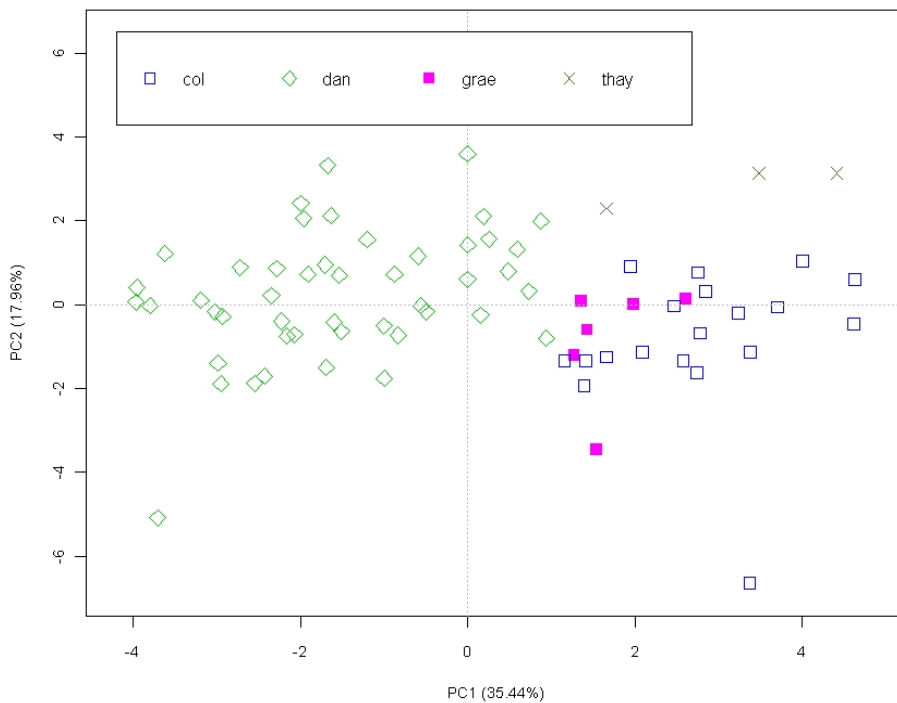
Při PCA jednotlivých rostlin se jasně odlišil pouze *S. danubialis*, a to podél první osy, která vysvětluje 29,84 % (viz Obr. 23). Další druhy a jedinci mají slabou tendenci se oddělovat podél 2. osy (14,90 %), což je lépe vidět při promítnutí centroidů v ordinačním prostoru této PCA analýzy (viz diagram na Obr. 24). Jasnějšího oddělení všech druhů bylo dosaženo při PCA populačních průměrů (viz. Obr. 25). K oddělení objektů podle první osy, tedy oddělení *S. danubialis* od ostatních taxonů, přispěly největší měrou znaky korelované s první osou: relativní počet žilek (NV/L, korelační koeficient 0,93), délka mezi nejširším místem a bází čepele (WB, -0,91) a délka čepele (L, -0,87). S druhou osou, odlišující ostatní druhy, byly nejvíce korelovány znaky: hloubka zářezu mezi 3. a 4. žilkou od báze (T3, 0,88) a úhel zubu, ve kterém končí 3. žilka (A3T, -0,65).



**Obr. 23:** Ordinační diagram se zahrnutím jedinců tetraploidních druhů: *S. collina*, *S. danubialis*, *S. graeca*, *S. thayensis*, *S. pannonica* agg. a singulární typy. První dvě osy vysvětlují 29,84 % a 14,90 % variability. Podle první osy se odlišuje *S. danubialis* od ostatních druhů.

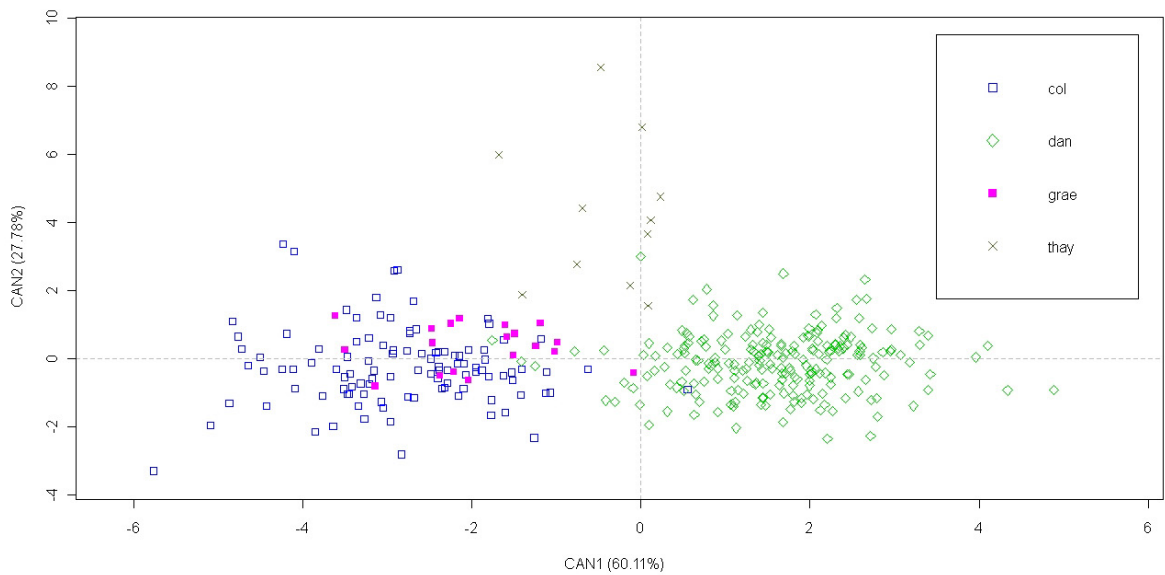


**Obr. 24:** Diagram analýzy hlavních komponent znázorňující jedince připojené k centroidu skupin (jednotlivé tetraploidní druhy) v prostoru prvních dvou os (PC1 29,84 %, PC2 14,90 %). Modře - *S. collina*, zeleně - *S. danubialis*, růžově - *S. graeca*, tm. zeleně - *S. thayensis*, tyrkysově – *S. pannonica* agg. B, žlutě – singulární jedinci.

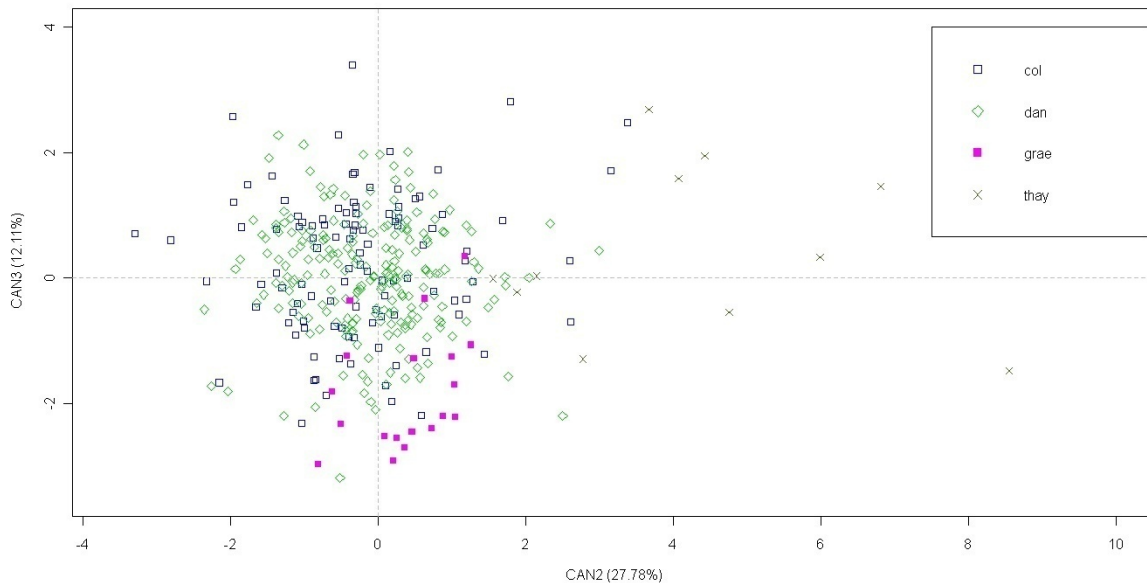


**Obr. 25:** Ordinační diagram se zahrnutím populačních průměrů tetraploidních druhů: *S. collina*, *S. danubialis*, *S. graeca*, *S. thayensis*. První dvě osy vysvětlují 35,44 % a 17,96 % variability.

Pro lepší zobrazení rozdílů mezi jednotlivými tetraploidními druhy byla provedena kanonická diskriminační analýza (CDA). Tato analýza byla provedena pouze s početnějšími druhy: *S. collina*, *S. danubialis*, *S. graeca* a *S. thayensis*. První dvě osy odlišují *S. danubialis* a *S. thayensis*, ale *S. graeca* a *S. collina* tvoří jednu skupinu (viz Obr. 26). K odlišení těchto dvou druhů dochází až podle třetí osy (viz Obr. 27). Znaky nejvíce korelované s první osou jsou úhel apexu (AA, -0,69), relativní počet žilek (NV/L, 0,37) a délka mezi nejširším místem aází čepele (WB, -0,34). S druhou osou není mnoho znaků silně korelovaných, největší korelační koeficient má znak délka čepele (L, 0,39). K oddělení *S. graeca* od *S. collina* nejvíce přispívají znaky korelované se třetí osou: úhel báze (AB, -0,53) a úhel zubu, ve kterém končí 3. žilka (A3T, -0,39).



**Obr. 26:** Diagram kanonické diskriminační analýzy vybraných tetraploidních druhů: *S. collina*, *S. danubialis*, *S. graeca* a *S. thayensis*. První kanonická osa vysvětluje 60,11 % a druhá 27,78 %.



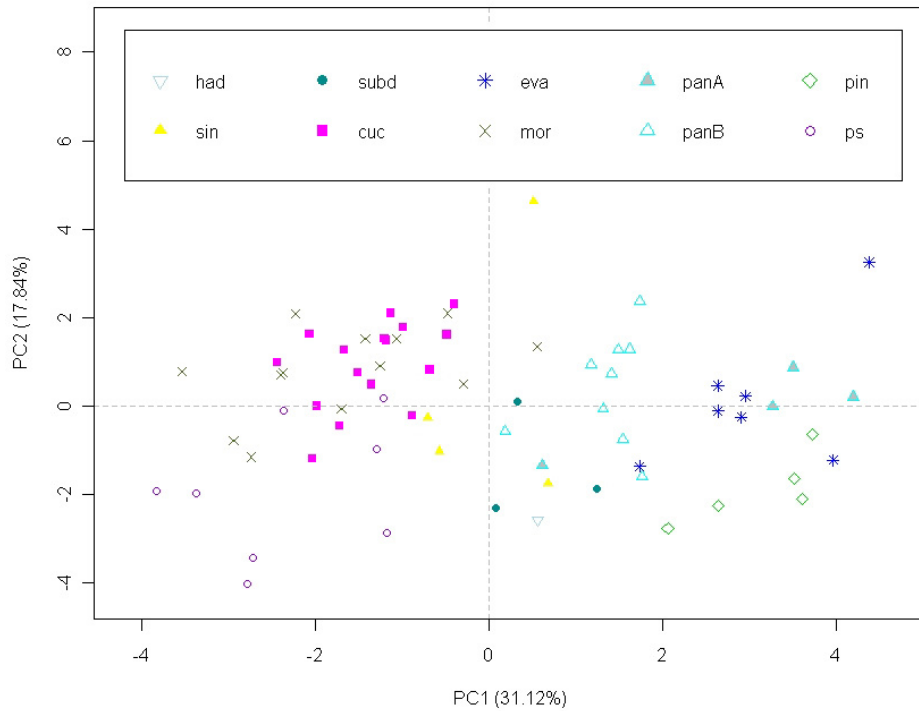
**Obr. 27:** Diagram kanonické diskriminační analýzy vybraných tetraploidních druhů: *S. collina*, *S. danubialis*, *S. graeca* a *S. thaysensis*. Druhá kanonická osa vysvětluje 27,78 % a třetí 12,11 %.

### **Analýza triploidních druhů**

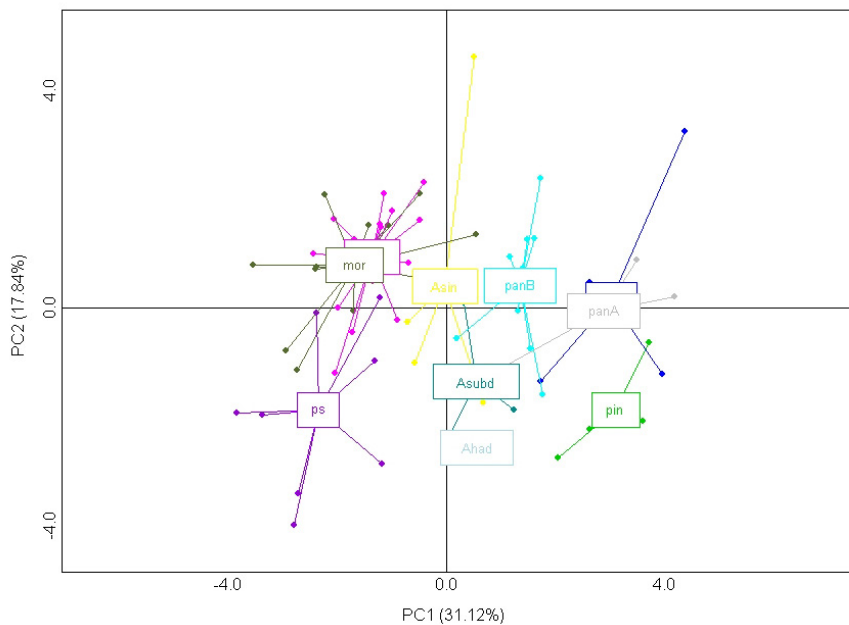
Triploidní jedinci byli také analyzováni zvlášť. Jednalo se o druhy *S. cucullifera*, *S. moravica*, *S. pannonica* agg. (osahující skupinu A a B rozlišenou molekulárními markery), *S. pontis-satani*, *S. subdanubialis*, linie „*evanida*“ a „*pinetorum*“, singulární jedince a hybrida *aria*×*danubialis*. Při testu korelace dvojic znaků (Pearsonův korelační koeficient) na tomto podsouboru dat se ukázaly další dva znaky (WB a L) jako těsně korelované, a proto byl znak WB vyřazen z dalších analýz triploidů.

Analýza hlavních komponent odhalila určitou strukturu v datech, i když při malém počtu jedinců, kteří byli použiti, ji nelze přikládat velkou váhu. Grafické znázornění prvních dvou os ukazuje Obr. 28 a Obr. 29 a zobrazení prvních tří os je na Obr. 30. Podle první osy, vysvětlující 31,12 % variability, je možné odlišit skupinu *S. pannonica*-A. Podle druhé osy (17,84 %) lze oddělit *S. pinetorum* a *S. pontis-satani*. *S. evanida* tvoří relativně izolovanou skupinu se 3 jedinci *S. pannonica*-B podél první i druhé osy. Podle třetí osy (16,37 %) se odlišuje *S. cucullifera* od *S. moravica*.

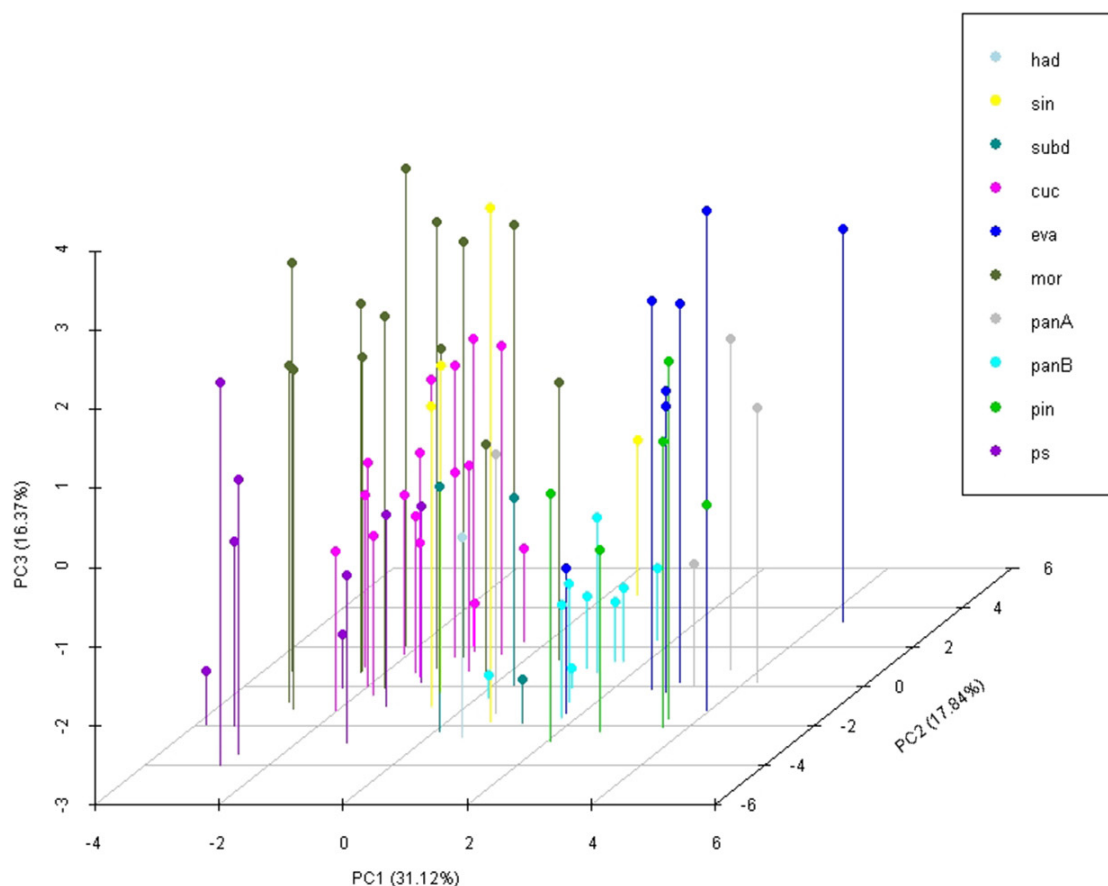




**Obr. 28:** Ordinační diagram se zahrnutím jedinců triploidních druhů a linií: hybrid *aria*×*danubialis* (had), singulární jedinci (sin), *S. subdanubialis* (subd), *S. cucullifera* (cuc), „*evanida*“ (eva), *S. moravica* (mor), *S. pannonica* agg. (panA, panB), „*pinetorum*“ (pin) a *S. pontis-satani* (ps). První dvě osy zobrazují 31,12 % a 17,84 % variability.

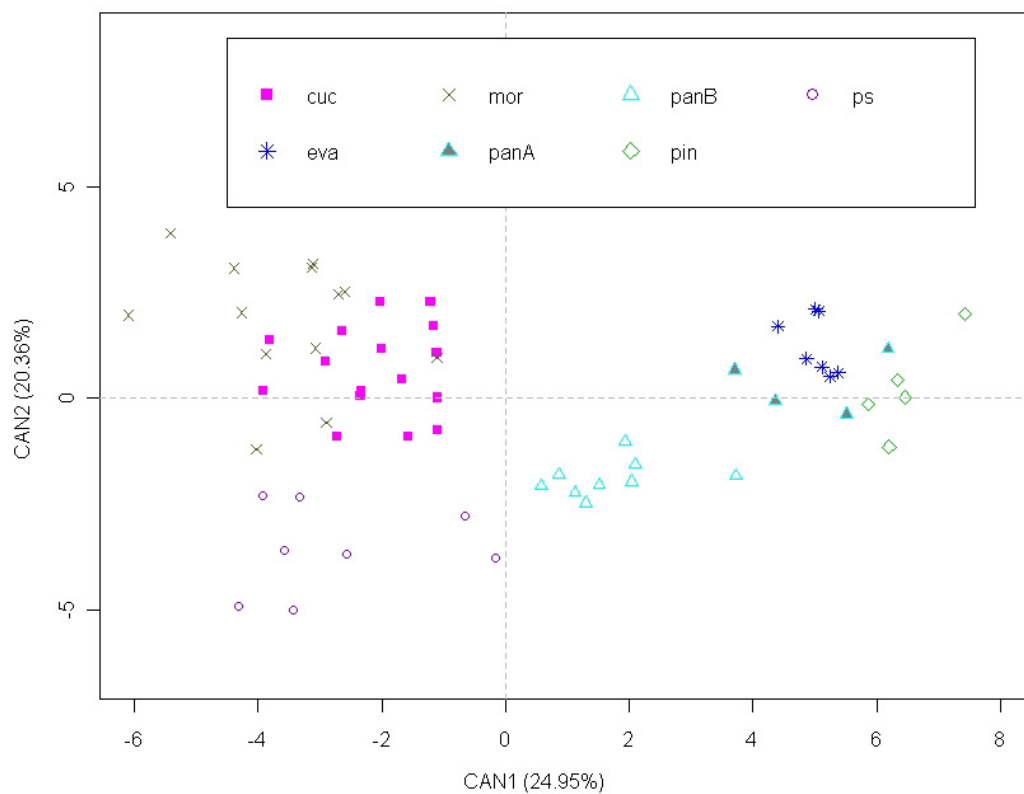


**Obr. 29:** Diagram analýzy hlavních komponent znázorňující triploidní jedince propojené centroidy skupin: hybrid *aria*×*danubialis* (had), singulární jedinci (sin), *S. subdanubialis* (subd), *S. cucullifera* (cuc), „*evanida*“ (eva), *S. moravica* (mor), *S. pannonica* agg. (panA, panB), „*pinetorum*“ (pin) a *S. pontis-satani* (ps). Zobrazeny jsou první dvě osy PCA (PC1 31,12 %, PC2 17,84 %).

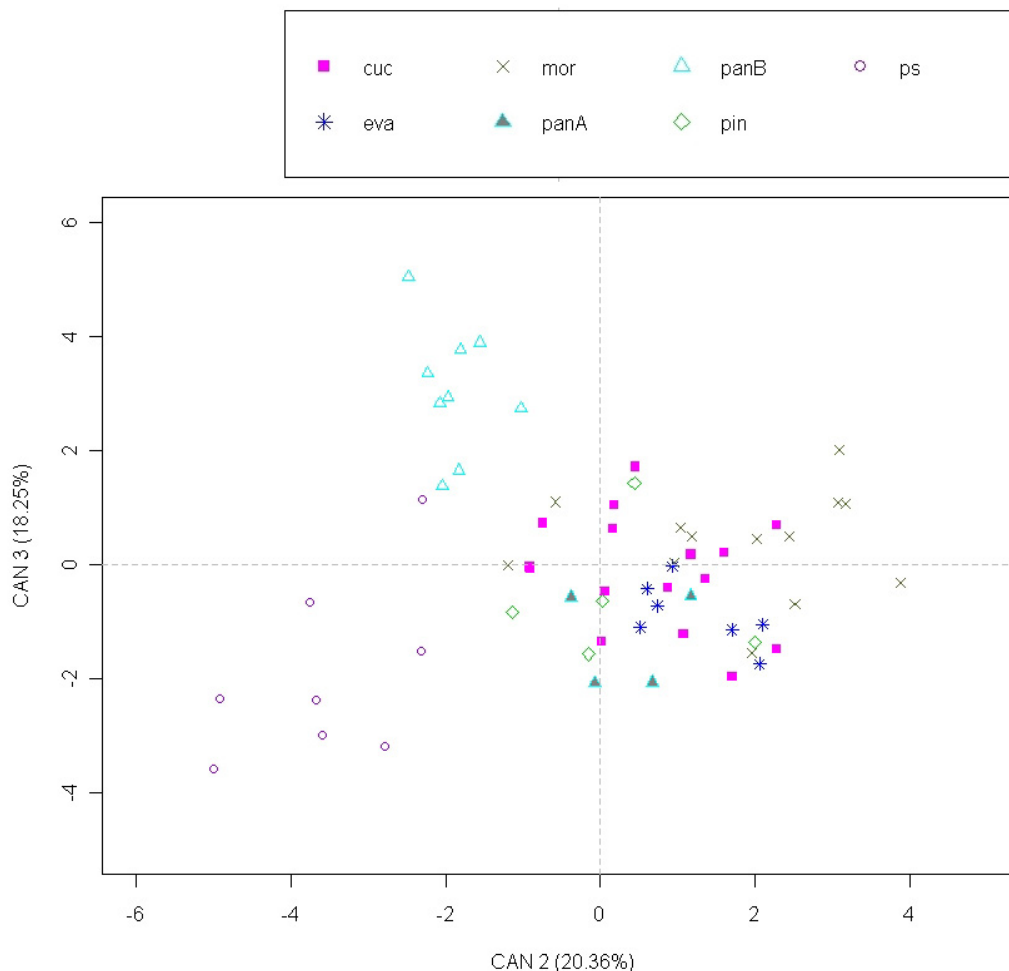


**Obr. 30:** Ordinační diagram se zahrnutím jedinců triploidních druhů a linií: hybrid *aria*×*danubialis* (had), singulární jedinci (sin), *S. subdanubialis* (subd), *S. cucullifera* (cuc), „*evanida*“ (eva), *S. moravica* (mor), *S. pannonica* agg. (panA, panB), „*pinetorum*“ (pin) a *S. pontis-satani* (ps). První tři osy zobrazují 31,12 %, 17,84 % a 16,37 % variability.

Pro lepší zobrazení rozdílů mezi triploidními druhy a liniemi byla provedena kanonická diskriminační analýza. Z této analýzy byli vyřazeni jedinci málo početných a nesourodých skupiny: singulární jedinci, hybrid *aria*×*danubialis* a *S. subdanubialis*. Výsledky ukazují obrázky 31 a 32. Znaky nejvíce korelované s první osou jsou poměr délky a šířky čepele (L/W, -0,57) a šířka čepele (W, 0,54). S druhou osou jsou nejsilněji korelované znaky: relativní hloubka zářezu mezi 3. a 4. žilkou od báze (T3/L, -0,46) a úhel apexu (AA, -0,45). K oddělení druhů podél 3. osy nejvíce přispívá znak délka čepele (L, 0,52).



**Obr. 31:** Diagram kanonické diskriminační analýzy s využitím 15 morfologických znaků jedinců *S. cucullifera* (*cuc*), „*evanida*“ (*eva*), *S. moravica* (*mor*), *S. pannonica* agg. (*panA*, *panB*), „*pinetorum*“ (*pin*) a *S. pontis-satani* (*ps*). 1. Kanonická osa vyjadřuje 24,95 % celkové variability a 2. kanonická osa 20,36 % celkové variability.



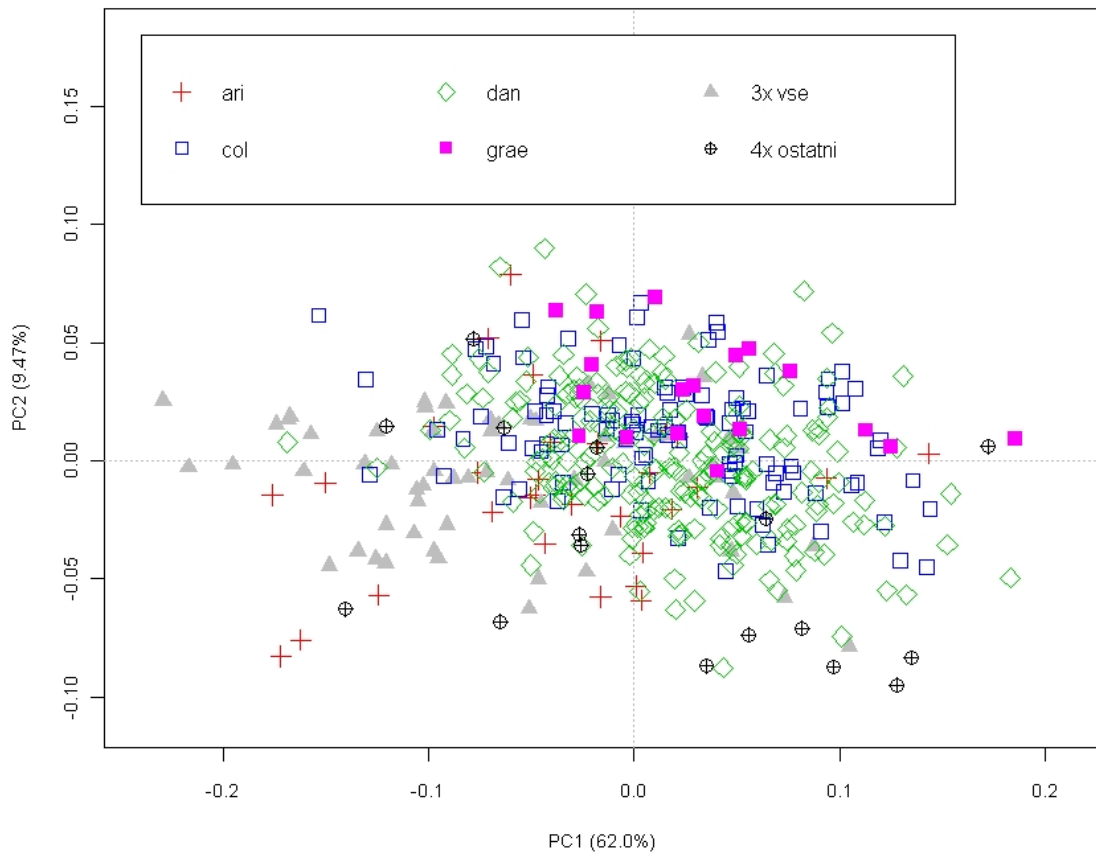
**Obr. 32:** Diagram kanonické diskriminační analýzy s využitím 15 morfologických znaků jedinců *S. cucullifera* (cuc), „*evanida*“ (eva), *S. moravica* (mor), *S. pannonica* agg. (panA, panB), „*pinetorum*“ (pin) a *S. pontis-satani* (ps). 2. Kanonická osa vyjadřuje 20,36 % celkové variability a 3. kanonická osa 18,25 % celkové variability.

#### 4.3.2. Geometrická morfometrika

K popisu tvaru listů byly použity eliptické fourierovské deskriptory. Nejprve byla provedena analýza variability tvaru listu pomocí PCA u všech zkoumaných jedinců, kteří byli rozděleni na následující skupiny: 1. *S. aria*. s.str. (2x), 2. *S. collina* (4x), 3. *S. danubialis* (4x), 4. *S. graeca* (4x), 5. ostatní tetraploidi a 6. všichni triploidi. Touto analýzou nedošlo k jasnému oddělení jednotlivých skupin, přestože první dvě osy vysvětlují celkem 71,47 % z celkové variability. Slabá tendence k oddělení ploidních úrovní tu ale patrná je (Obr. 33). Rekonstrukce tvaru listu (Obr. 34) ukazuje, že největší variabilita mezi listy je dána rozdíly v šířce čepele a ve tvaru báze a apexu čepele.

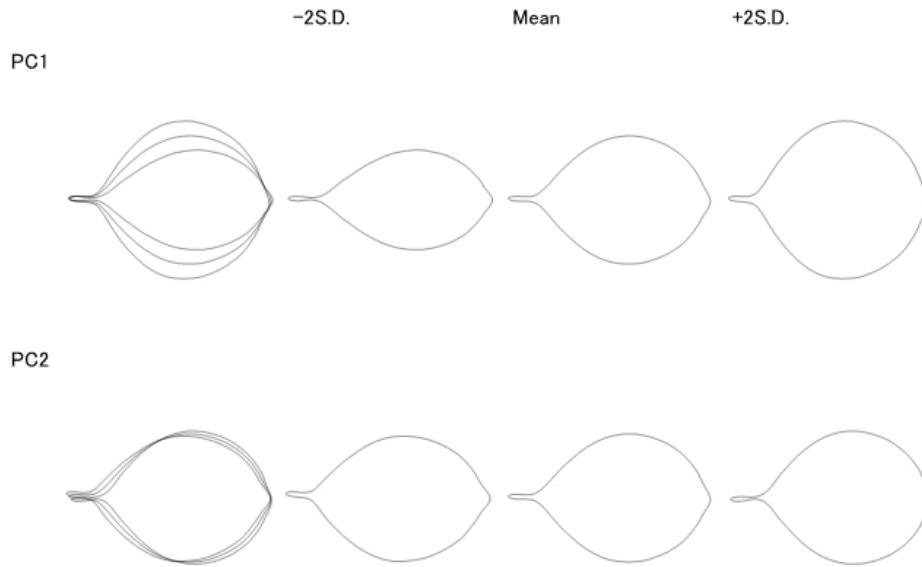
Při PCA pouze rozšířených tetraploidních druhů (*S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*) se ukázalo, že první dvě osy, popisující většinu variability, zobrazují především

vnitrodruhovou variabilitu. Na Obr. 35 je vidět, že podél osy 1 (50,20 % variability) ani 2 (12,68 % variability) se sledované druhy neoddělily. Z rekonstrukce tvaru listu na Obr. 36 je patrné, že největší variabilita je v šířce listu a dále ve tvaru špičky a báze čepele. Při zobrazení 3. a 4. osy, popisujících 11,12 % a 6,19 % variability, už k odlišení druhů došlo (viz ordinační diagram na Obr. 37 a k němu odpovídající rekonstrukci tvaru listu na Obr. 38).

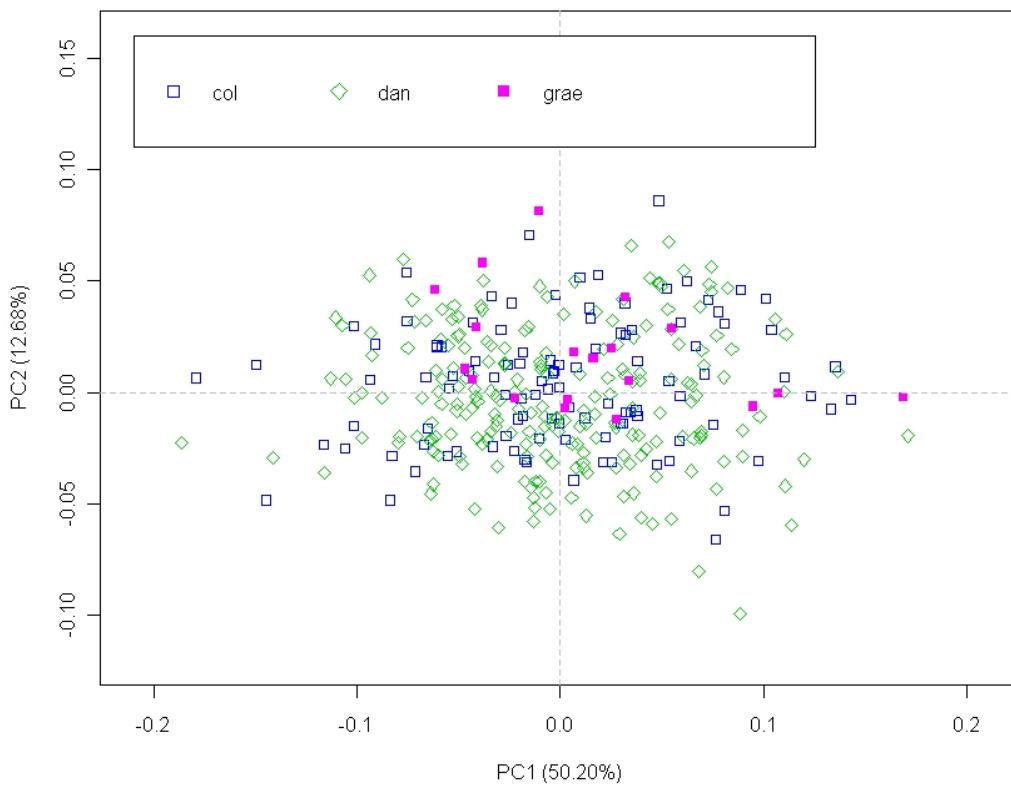


**Obr. 33:** Ordinační diagram Fourierových koeficientů celého datového souboru rozděleného na skupiny:

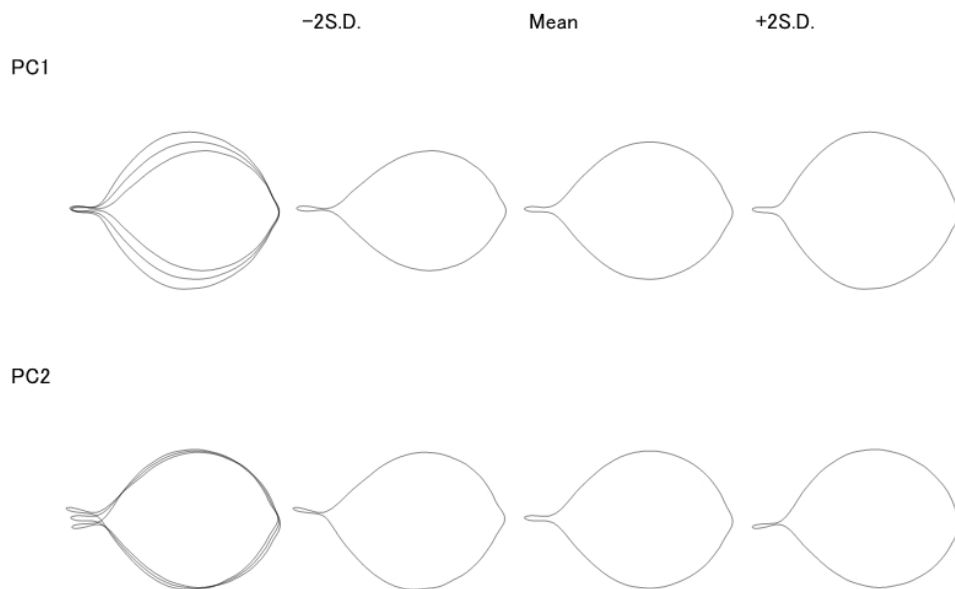
1. *S. aria*. s.str. (2x), 2. *S. collina* (4x), 3. *S. danubialis* (4x), 4. *S. graeca* (4x), 5. ostatní tetraploidi a 6. všichni triploidi. První osa vysvětluje 62,0% celkové variability a druhá osa 9,47 %.



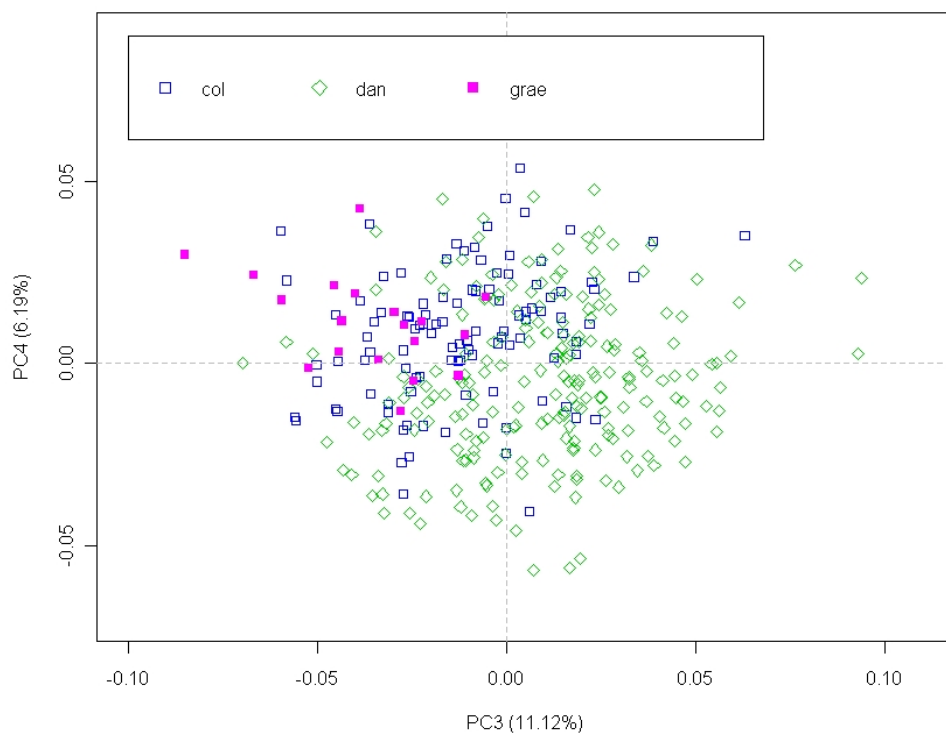
**Obr. 34:** Rekonstrukce variability tvaru listové čepele všech jedinců zjištěná pomocí PCA Fourierových koeficientů. Podél osy PC1 (62,0 %) je zachycena variabilita v šířce listu, podél osy PC2 (9,47 %) variabilita ve tvaru apexu a báze čepele.  
SD = směrodatná odchylka.



**Obr. 35:** Ordinační diagram Fourierových koeficientů pouze rozšířených tetraploidních druhů *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*. Zobrazeny jsou první dvě osy vysvětlující 50,20 % a 12,68 % celkové variability.

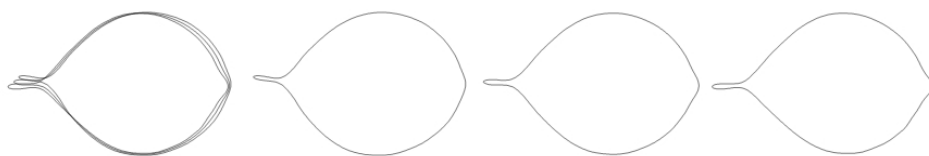


**Obr. 36:** Rekonstrukce variability tvaru listu jedinců tetraploidních druhů zjištěná pomocí PCA Fourierových koeficientů. Změny v šířce listu podél první osy vysvětlují 50,20 % a změny podél druhé osy 12,68 %.  
SD = směrodatná odchylka.



**Obr. 37:** Ordinační diagram Fourierových koeficientů pouze rozšířených tetraploidních druhů *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*. Zobrazeny jsou třetí a čtvrtá osa vysvětlující 11,12 %, respektive 6,19 % celkové variability.

PC3



PC4

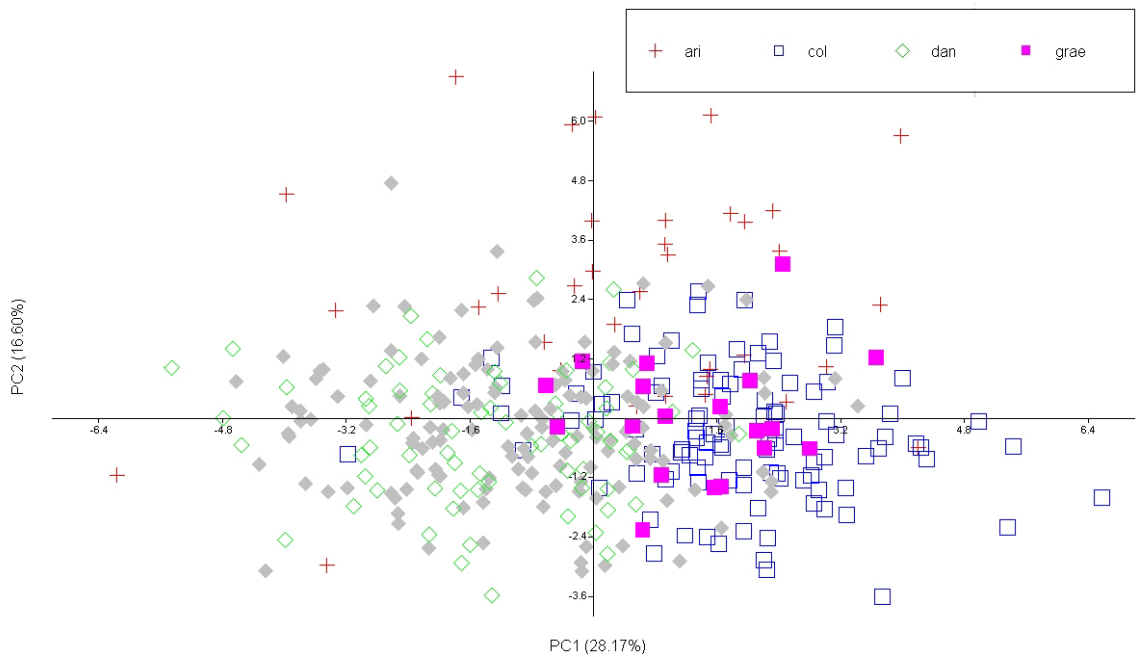


**Obr. 38:** Rekonstrukce variability tvaru listu jedinců tetraploidních druhů zjištěná pomocí PCA Fourierových koeficientů. Podél osy PC3 (11,12 %) je zachycena variabilita ve tvaru apexu čepele, podél osy PC4 (6,19 %) variabilita šířky čepele.  
SD = směrodatná odchylka.

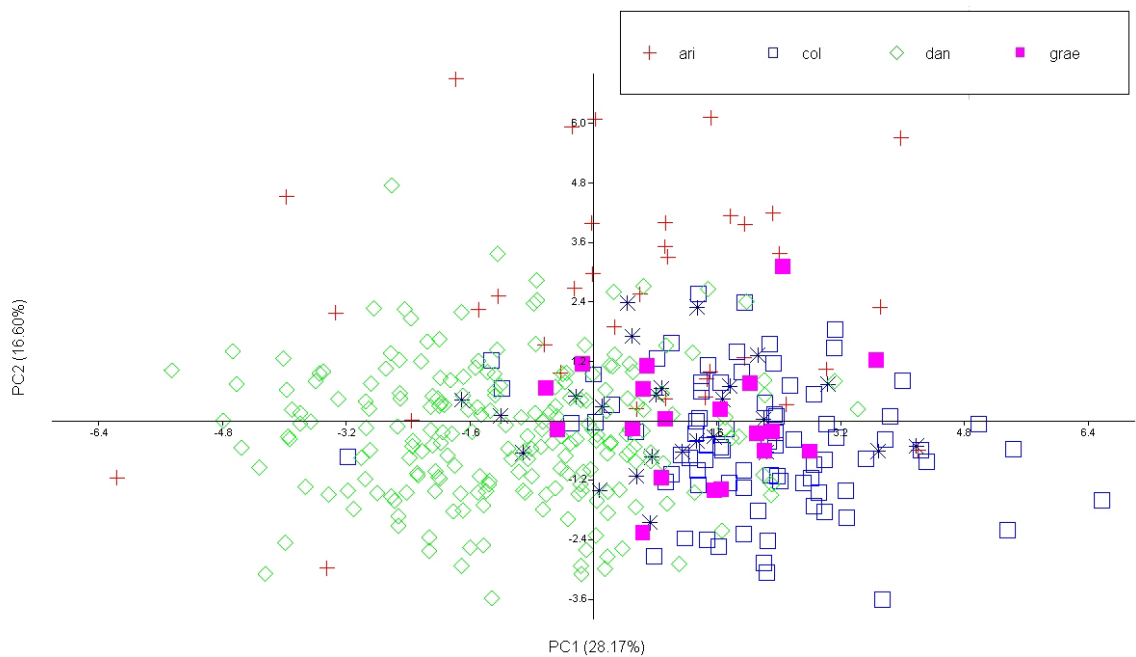
### 4.3.3. Fenotypová plasticita klonů

Pro zjištění fenotypové plasticity v rámci jednoho klonu byly vizualizovány vybrané genotypy *S. danubialis* a *S. collina* na výsledném ordinačním diagramu PCA zahrnujícím pouze rozšířené druhy (*S. aria* s.str., *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*). Výsledky ukazují, že jak klon *S. danubialis* (viz Obr. 39), tak klon *S. collina* (viz Obr. 40) mají opravdu vysokou míru fenotypové plasticity. U *S. collina* byl vybrán klon vyskytující se pouze v Českém středohoří, takže na výsledném ordinačním diagramu přeci jen nepokrývá celou šíři variability svého druhu, na rozdíl od klonu *S. danubialis*, který má shodné alelické fenotypy sdílené mezi populacemi všech českých regionů.





**Obr. 39:** Ordinační diagram se zahrnutím jedinců široce rozšířených druhů ve střední Evropě: diploidní *S. aria* s.str. a tetraploidní *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*. ŠEDÉ KOSOČTVERCE představují jeden klon (genotyp) *S. danubialis*. První dvě osy vysvětlují 28,17 % a 16,60 % variability.

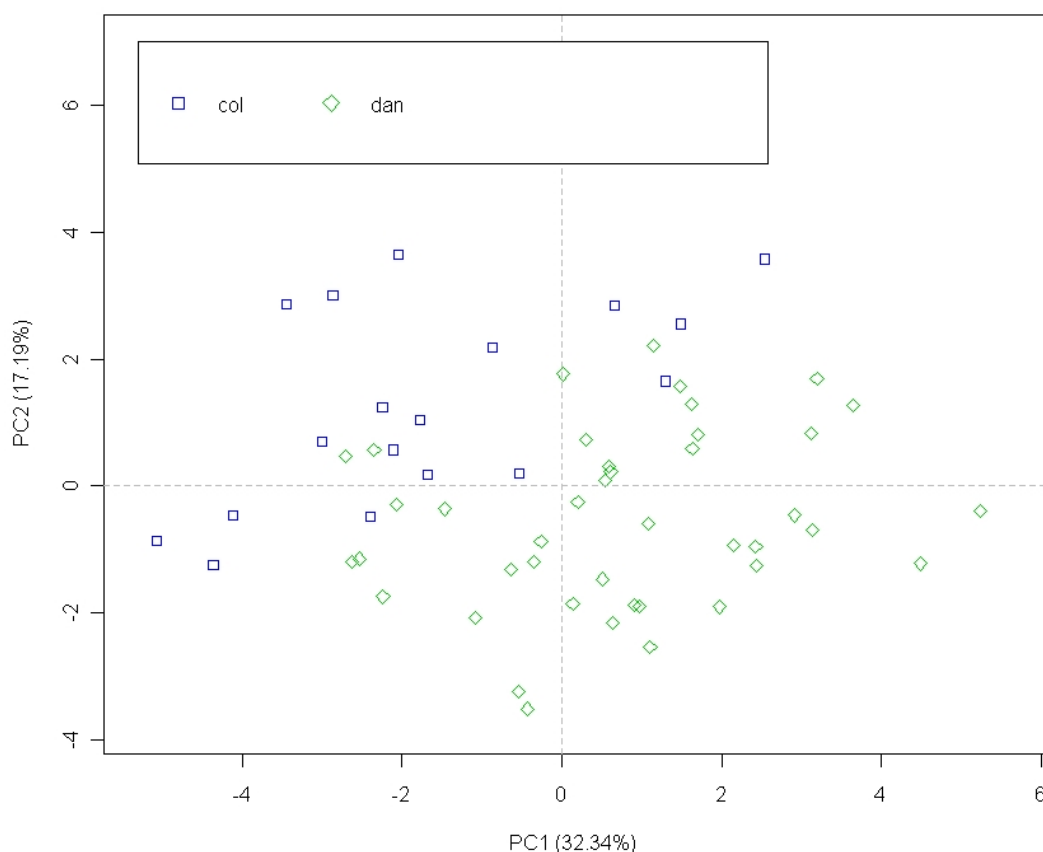


**Obr. 40:** Ordinační diagram se zahrnutím jedinců široce rozšířených druhů ve střední Evropě: diploidní *S. aria* s.str. a tetraploidní *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*. MODRÉ HVĚZIČKY představují jeden klon (genotyp) *S. collina*. První dvě osy vysvětlují 28,17 % a 16,60 % variability.

## 4. | Výsledky

### 4.4. | Výsledky analýz populací OSTRÝ a BOR U HARDEGGU

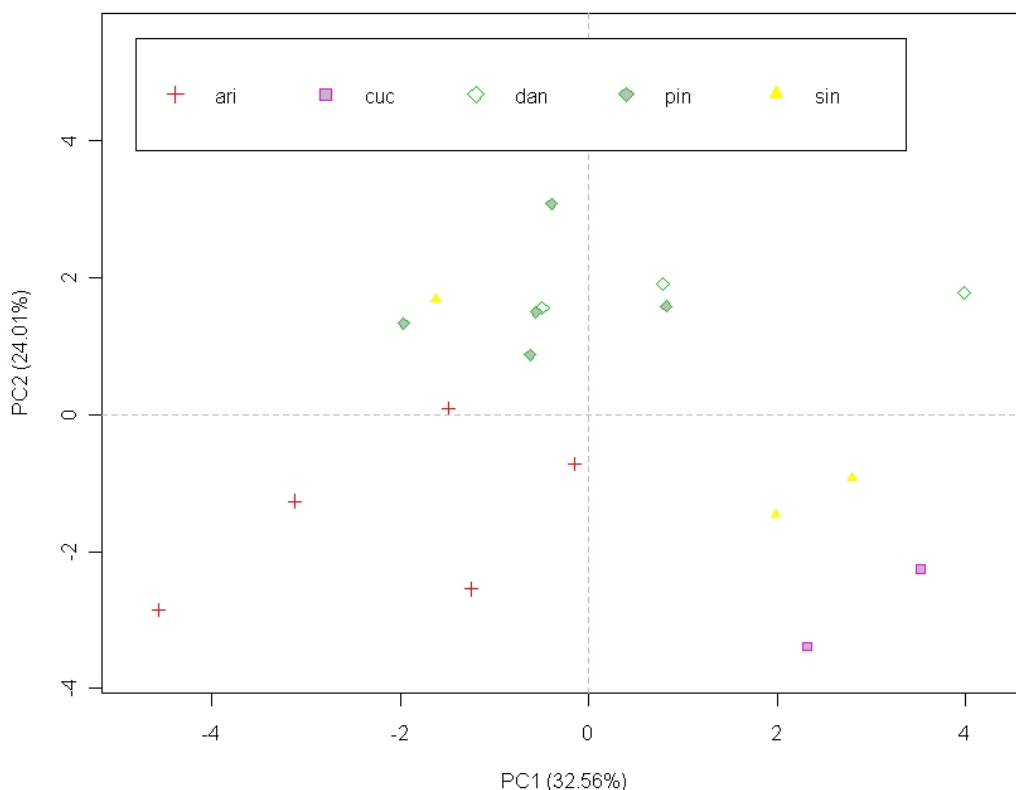
Populace na Ostrém v Českém středohoří se oproti předpokladům ukázala jako molekulárně téměř uniformní. Jak u jedinců *S. collina* (celkem 21 jedinců), tak *S. danubialis* (45 jedinců) byly zjištěny pouze dva genotypy, které se lišily ve dvou, respektive v jednom lokusu. Analýzou molekulární variance byl nepřekvapivě zjištěn převážný podíl variability mezi druhy (99,57 %). Při hodnocení morfologických znaků pomocí analýzy hlavních komponent (Obr. 41) došlo k rozdělení těchto dvou druhů obdobně jako při studiu celého souboru dat (viz kapitola Výsledky – morfometrika), jen s menším překryvem. Míra plasticity jednotlivých druhů je srovnatelná. Při analýze semen z této populace (celkem 168 od druhu *S. danubialis* a 62 od *S. collina*) byly u obou zde rostoucích druhů zjištěny všechny reprodukční způsoby detekované z celého území ČR, včetně haploidní partenogeneze u *S. danubialis*.



**Obr. 41:** Ordinační diagram analýzy hlavních komponent jedinců *S. danubialis* a *S. collina* z lokality Ostrý u Milešova v Českém středohoří. První dvě osy vysvětlují 32,34 % a 17,19 % variability.

Pro analýzy lokality Bor u Hardeggu bylo nakonec k dispozici pouze omezené množství jedinců u zde přítomných druhů: *S. aria* s. str. (4 jedinci), *S. cucullifera* (5), *S. danubialis* (4), linie „*pinetorum*“ (8, jedná se o jedinou lokalitu jeho výskytu) a 3 singulární jedinci. Výsledek AMOVA opět ukazuje na větší mezidruhovou (82,38 %) než vnitrodruhovou (17,62 %) variabilitu. Vnitrodruhová variabilita je zde vyšší než na lokalitě Ostrý díky zahrnutí sexuálního druhu a singulárních jedinců, kteří mají všichni unikátní alelický fenotyp. Jedinci ostatních druhů jsou buď geneticky uniformní (*S. danubialis* a *S. cucullifera*). Linie „*pinetorum*“ je tvořena dvěma genotypy. Analýza morfologických znaků (Obr. 42) opět ukázala širokou míru plasticity u všech polyploidních taxonů, přestože mají jedinci v rámci druhu shodný, či velice málo rozdílný genotyp (u linie „*pinetorum*“ se jedná o rozdíl pouze v jednom lokusu).

Při analýze reprodukčních systémů na této lokalitě byly nalezeny poměry ploidii embrya a endospermu obvyklé pro zkoumané cytotypy. Výjimečná je zde fakultativně apomiktická linie „*pinetorum*“ se 44 % sexuálního rozmnožování (viz kapitola Výsledky: Reprodukční způsoby), která se vyskytuje pouze na této lokalitě. Ze tří singulárních jedinců vykazoval mimořádnou variabilitu v typech rozmnožování jedinec č. 253, u kterého byla detekována embrya o velikosti odpovídající dvou až tři a půl násobku ploidní úrovně s plynulým přechodem (viz Kapitola Výsledky: Reprodukční způsoby, Tab. 14).



**Obr. 42:** Ordinační diagram analýzy hlavních komponent jedinců z lokality Bor u Hardeggu v NP Thayatal patřících do druhů *S. aria* s. str. (4 jedinci), *S. cucullifera* (5 j.), *S. danubialis* (4 j.), linie „*pinetorum*“ (8 j.) a singulární jedinci. První dvě osy vysvětlují 32,56 % a 24,01 % variability.



## 5. | Diskuze

Hlavními mikroevolučními mechanismy generujícími variabilitu v rodu *Sorbus* jsou polyploidie a hybridizace. Spolu s diverzitou v reprodukčních mechanismech (a zejména apomixií) umožnily vzniknout celé řadě blízce příbuzných taxonů, které jsou však odvozené od taxonů z podrodu *Aria* a třech základních druhů z podrodů *Sorbus* (*S. aucuparia*), *Torminaria* (*S. torminalis*) a *Chamaemespilus* (*S. chamaemespilus*; Warburg and Kárpáti, 1968; Challice and Kovanda, 1978; Aedo and Aldasoro, 1998; Rich et al., 2010).

Skupina *S. aria* agg. (podrod *Aria*) je výjimečná svou účastí ve všech mikroevolučně významných hybridizačních událostech v polymorfním rodu *Sorbus* (Warburg and Kárpáti, 1968; Challice and Kovanda, 1978; Májovský, 1992). Práce zabývající se touto skupinou byly doposud omezeny především na taxonomické hodnocení (Proctor et al., 1989; Houston et al., 2009; Rich and Proctor, 2009; Rich, Harris, et al., 2009; Rich, Houston, et al., 2009; Lepší et al., in press.), přestože druhy z okruhu jeřábu muku jsou rodiči všech hojně zkoumaných hybridogenních taxonů (řazených do podrodů *Soraria*, *Tormaria* a *Chamaespilaria*) a jsou tak zodpovědné za velkou část variability celého rodu. Cílem předkládané práce tedy bylo zhodnotit mikroevoluční procesy této skupiny utvářející a uchovávající její vnitřní variabilitu.

Nejprve bylo pomocí průtokové cytometrie studováno zastoupení a rozšíření cytotypů *S. aria* agg. v České republice s přesahem do středoevropského prostoru. Dále byly stejnou metodou zjišťovány typy reprodukčních způsobů a jejich procentuální zastoupení u jednotlivých skupin v rámci podrodu *Aria* odlišených na základně molekulárních markerů (mikrosatelitů). U takto definovaných vnitřních skupin byla posléze hodnocena genetická i morfologická variabilita a byly zjišťovány vztahy mezi skupinami.

### 5.1. Cytogeografie

Při plošném cytogeografickém screeningu v České republice byly zjištěny tři ploidní stupně v rámci *S. aria* agg. – diploidní, triploidní a tetraploidní. Byl nalezen zajímavý „pattern“ ve složení ploidních úrovní *S. aria* agg. – cytotypová variabilita je vázána výhradně na jižní Moravu, v Čechách se vyskytují pouze tetraploidní zástupci. Z celoevropského hlediska se jedná o nejběžněji se vyskytující cytotypy (Aldasoro et al., 2004; Bailey et al., 2008; Feulner et al., 2013), vyšší ploidie (pentaploidi,  $2n =$  cca 87) jsou vzácně udávány ze zahraničí, a to z Velké Británie, kde tvoří ploidně homogenní taxony (Pellicer et al., 2012) a Maďarska, kde bylo zatím nalezeno jen několik jedinců (Németh and Bílá unpubl.). Mezi studovanými jedinci ze střední Evropy však tato ploidní úroveň nebyla nalezena. Důvodem je pravděpodobně obecně velice nízká frekvence výskytu pentaploidů (a to nejen v rodu *Sorbus*, ale v celé podčeledi Maloideae; Kalkman, 2004; Talent and Dickinson, 2005) a omezený zahraniční „sampling“ předkládané práce. Další možnou

příčinou vzácnosti pentaploidů u skupiny *S. aria* agg. by mohl být nízký podíl vznikajících neredukovaných gamet (alespoň v České republice, viz dále).

Jednotlivé taxony (rozlišené na základě mikrosatelitového „pattern“) byly ploidně uniformní. U druhů *S. aria* s.str. (2x), *S. danubialis* (4x) se zjištěné ploidie shodovaly s literárními údaji (Kutzelnigg, 1994; Vít, 2006), stejně tak jako u nově popsanych *S. cucullifera*, *S. moravica*, *S. pontis-satani* (vše 3x) a *S. thaensis* (4x; Lepší et al., in press.). Dvě ploidní úrovně byly nalezeny pouze u jedné skupiny – *S. pannonica* agg. Nejedná se ovšem o jeden druh, nýbrž o soubor velice blízkých taxonů. Skupina byla zařazena do analýz takto širěji definovaná z důvodu limitovaného zahraničního „samplingu“ s tím, že vyžaduje další studium. Většina evropských druhů jeřábů je tvořena pouze jedním cytotypem. Výjimku tvoří například *S. porrigentiformis* z Velké Británie (Bailey et al., 2008; Pellicer et al., 2012). Jedná se ale pravděpodobně o dvě (či více) nezávisle vzniklých linií, které jsou v současné době intenzivně studovány.

## 5.2. Reprodukční způsoby

Pomocí analýzy semen průtokovou cytometrií bylo zjištěno 6 reprodukčních mechanismů (2 typy sexuální, 2 způsoby haploidní partenogeneze, 2 druhy pseudogamie). U sedmého způsobu, autonomní apomixie, nebylo možné pomocí cytometrických analýz rozeznat pík endospermu od dvojnásobného píku embrya. Tzv. G2 fáze embrya byly ovšem nalezeny pouze u analýz nedozrálých semen (sbírané od června do první poloviny července), která jsou patrně ještě ve fázi intenzivního růstu, tzn. jejich buňky se dělí. K rozpoznání, že se jedná s největší pravděpodobností o G2 fáze embrya, přispěl fakt, že takové píky byly nacházeny i u analýz s jedním semenem, u kterých byl detekován endosperm jiné ploidní úrovně. Navíc žádná z analýz zralých plodů tetraploidů již pík odpovídající dvounásobku embrya (8x) neobsahovala. Ani semena triploidních jedinců (všechna sbírána zralá) neobsahovala pík odpovídající G2 fázi embrya (tedy 6x), a tak je pravděpodobné, že se u studovaných druhů autonomní apomixie nevyskytuje. K potvrzení tohoto tvrzení by bylo zapotřebí kastrovního experimentu, kdy se z jednotlivých květů odstraní prašníky a květy se následně izolují, aby nedošlo k přenosu cizího pylu. Pouze pokud by v takových květech semena vznikla, značilo by to schopnost autonomního vývoje endospermu. Jedinou výjimkou, kdy byl poměr ploidí 4:8 interpretován jako reprodukční způsob, byla semena triploidní linie „*pinetorum*“. U těchto semen jsme záměnu s G2 fází embrya nepředpokládali, neboť byly sbírány vždy až na konci září, tedy plně vyvinuté, a analýzy ostatních ploidních úrovní embrya nikdy G2 fázi neobsahovaly.

Jediný diploidní taxon ve studovaném souboru, *S. aria* s.str., je obligátně sexuální druh. Analýza jeho semen odhalila jediný poměr ploidí embrya a endospermu (2:3), odpovídající pohlavnímu rozmnožování s účastí redukovaných gamet. Absence zjištění jiné (triploidní) ploidie embrya může naznačovat nízkou frekvenci mezidruhovému hybridizace tohoto taxonu nebo jeho roli pouhého donoru pylu v případných kříženích.

U dvou tetraploidních taxonů (*S. danubialis* a *S. collina*) byla nalezena semena vzniklá sexuálním procesem (poměr 4:6). Zjištěné ploidie embrya a endospermu vznikly spojením redukovaných gamet. U *S. danubialis* bylo pohlavní rozmnožování detekováno v necelých

10 % případů, u *S. collina* v méně než 1 % (jednalo se o jediné semeno). U některých apomiktických rostlin, např. u *Dichanthium annulatum* (Forsk.) Stapf – Poaceae, byla popsána situace, kdy centrální jádra zárodečného vaku při tvorbě endospermu nesplynou a každé z nich je oplodněno redukovanou spermatickou buňkou (obě spermatické buňky se tedy účastní vzniku endospermu; Reddy and Cruz, 1969). V takovém případě vzniká také poměr 4:6 (embryo vzniká autonomně z neredukované vaječné buňky, endosperm spojením neredukovaného centrálního jádra a redukované spermatické buňky) a je nerozlišitelný od sexuálního rozmnožování. V rodu *Sorbus* sice bylo pozorováno oplodnění ještě samostatných centrálních jader, ale při dalším vývoji došlo vždy k jejich splynutí (Jankun and Kovanda, 1987). Navíc pokud by u jeřábů k tomuto jevu docházelo, detekovali bychom poměr odpovídající sexuálnímu rozmnožování (2:3) u všech druhů a ploidních úrovní přibližně se stejnou frekvencí, čemuž naše data neodpovídají, a proto poměr 4:6 u tetraploidních taxonů vysvětlujeme jako pohlavní rozmnožování. U žádného tetraploidního jedince nebyl nalezen či rozpoznán sexuální způsob s účastí neredukované samčí gamety (jednalo by se opět o poměr 4:8, viz výše), což je v souladu s výsledky analýzy pylu (viz dále).

Apomixie (nepohlavní rozmnožování pomocí semen, agamospermie) u jeřábů je spojena s nutností oplodnit endosperm, jedná se tedy o pseudogamii (Liljefors, 1953, 1955). Tomuto typu rozmnožování spojeného s oplodněním centrálních jader redukovaným pylem odpovídá poměr 4:10, který byl detekován s překvapivě nízkou frekvencí. U příbuzného rodu *Crataegus* L. je tento poměr pro tetraploidní rostliny udáván jako nejčastější (Talent and Dickinson, 2007). Oproti tomu u analyzovaných semen tetraploidních jeřábů se jedná o necelých 10 % případů. Nejčastější poměr mezi ploidií embrya a endospermu byl 6:12, kdy jsou centrální jádra neredukovaného zárodečného vaku oplodněna buď jednou neredukovanou samčí gametou, nebo se oplodnění účastní dvě redukované spermatické buňky (Jankun and Kovanda, 1987; Urbanska, 1994). Aby bylo možné rozhodnout, která z uvedených variant je pravděpodobnější v rodu *Sorbus*, byla provedena analýza ploidních úrovní pylu pro zjištění četnosti tvorby neredukovaných samčích gamet. Metodika analýzy pylu průtokovou cytometrií (Kron and Husband, 2012) musela být nejprve pro rod *Sorbus* optimalizována (viz níže). U tetraploidních druhů *S. collina* ani *S. danubialis* nebyla detekována žádná neredukovaná pylová zrna. Je možné, že vznik neredukované samčí gamety není vázán na narušení redukčního dělení při mikrosporogenezi (obvyklý způsob vzniku neredukovaných gamet, například Mursalimov and Deineko, 2015), ale až na narušení mitózy generativní buňky při růstu pylové láčky, kdy by se měla rozdělit na dvě spermatická jádra (tj. druhé pylové mitózy). Vznik neredukovaného pylu při narušení první pylové mitózy již znám je (Strandhede, 1965). Abnormality při druhé pylové mitóze jsou také známy u druhu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (geneticky modifikovaného oktoploida), ale vedly naopak ke vzniku tří, tedy naopak více redukovaných spermatických buněk (Wang et al., 2010). Přestože vznik neredukované gamety až při druhé pylové mitóze zatím nebyl v literatuře popsán, vzhledem k existenci jiných mitotických abnormalit se nedá tato možnost vyloučit. Pravděpodobnější scénář, s ohledem na výsledky u jiných taxonů (viz níže výsledky experimentálního křížení), ovšem je, že oplodněním centrálních jader oběma spermatickými buňkami se apomiktické taxony vyrovnávají s nevyváženým poměrem

samčího a samičího příspěvku do endospermu, který by měl být ideálně 2:1 (Nogler, 1984; Savidan, 2000).

Poměry, které neodpovídají žádnému ze základních, výše uvedených způsobů, nejsou u čeledi Rosaceae výjimkou (např. u rodu *Crataegus*, Talent and Dickinson, 2007). Většinu z nich je možné vysvětlit abnormalitami při vývoji zárodečného vaku, které jsou u apomiktických rostlin běžné. Jedná se například o vznik tří centrálních jader, která se posléze účastní tvorby endospermu (Nogler, 1984; Jankun and Kovanda, 1986; Campbell et al., 1987). Takto lze vysvětlit poměry 4:14 (endosperm je tvořen třemi tetraploidními genomy od matky a jedním diploidním od otce), nalezené u *S. danubialis*. Při spojení této abnormality s oplozením centrálních jader dvěma spermatickými jádry (či jedním neredukovaným), mohl vzniknout poměr 4:16, který se vyskytuje u 4 % semen tetraploidů a který byl nalezen u všech 3 druhů: *S. collina*, *S. danubialis* i *S. thaysensis*. Vyšší frekvence poměru 4:16 než 4:12 je v souladu s větší četností poměru 4:12 než 4:10. Další detekované poměry odchýlené od základních vznikly pravděpodobně oplodněním gametami pocházejícími od jiných cytotypů. Takto mohl poměr 4:9 vzniknout opylením pomocí redukovaného pylu od diploidního jedince a 4:11 je vysvětlitelný opylením neredukovanou gametou od triploida. Endosperm u poměru 4:13 může značit splynutí 3 neredukovaných centrálních jader (tři tetraploidní genomy matky) s redukovaným spermatickým jádrem diploidního jeřábu (monoploidní genom otce). Donorem monoploidního a triploidního pylu u jeřábů z Podyjí mohou být jedinci patřící do *S. aria* agg. (*S. aria* s.str., *S. cucullifera* a další), kdežto u populací v Čechách to musí být patrně jedinci jiných podrodů (*Torminaria* či *Tormaria*). Potvrzení jednotlivých způsobů je dosti obtížné a bohužel neexistuje literatura, se kterou by se tyto výsledky daly konfrontovat. Embryologické studie, které u jeřábů byly již dříve provedeny (Liljefors, 1953, 1955; Jankun and Kovanda, 1986, 1987, 1988), jsou vždy omezené počtem analyzovaných semen, což může být důvodem, proč jimi nebyly vzácnější poměry (vyskytující se v řádu procent) detekovány.

U druhu *S. danubialis* byl neočekávaně detekován typ rozmnožování haploidní partenogeneze. Jedná se o autonomní vývin embrya z redukované vaječné buňky (tzn. 4x jedinec vytvoří 2x embryo; Asker and Jerling, 1992). Haploidní partenogeneze je v rostlinné říši relativně vzácná, vyskytuje se např. u rodů *Dichanthium* Willemet (de Wet and Harlan, 1970), *Ranunculus* L. (Nogler, 1984) či *Pilosella* (Krahulcová and Krahulec, 2000; Krahulec et al., 2011). Možnost výskytu u jeřábů již byla naznačena u druhu *S. sudetica* (Jankun and Kovanda, 1986). Haploidní partenogeneze může být způsob, jakým apomiktické rostliny zvyšují variabilitu genomu. Například u již zmíněného rodu *Pilosella* byl pozorován cyklus zahrnující haploidní partenogenezi a následné opětovné zdvojení genomu (cyklus polyploid – polyhaploid – polyploid). Při vzniku dihaploida dochází ke ztrátě poloviny genů, takže následně vzniklý polyploid má větší míru homozygotnosti, než polyploid původní, a tedy odlišný genom (Krahulec et al., 2011). U jiných druhů (například *Panicum maximum* Jacq.) byly pozorovány obdobné cykly, ovšem se zahrnutím pohlavního rozmnožování. Takto si mohou rostliny díky cyklu diploid – tetraploid – dihaploid předávat geny i mezi ploidními úrovněmi (Savidan and Pernès, 1982). U druhů jeřábů, kde byla haploidní partenogeneze zjištěna, nebyly ovšem v přirozených podmínkách nalezeny žádné rostliny s poloviční ploidní úrovní. Haploidní partenogeneze je tak v rodě *Sorbus* pouze vzácným jevem, který je



u daných taxonů omezen na „experimentování“ v rámci jejich reprodukce, a pravděpodobně tak nevznikají životaschopné zárodky.

Téměř všechny triploidní linie jsou obligátně apomiktické. Pouze u druhu *S. cucullifera* bylo detekováno sexuální rozmnožování, ovšem jednalo se pouze o jediné semeno ze 127 analyzovaných. Větší výjimkou mezi triploidy je linie „*pinetorum*“, kde je podíl pohlavního rozmnožování téměř 50 % (viz dále). Nejčastějším poměrem apomiktického způsobu reprodukce u druhů z Podyjí je 3:8. Jedná se o pseudogamii s 2x samčí gametou, která může představovat redukovaný pyl tetraploidního jedince, redukovaný pyl triploidního jedince (o tvorbě pylu u triploidních druhů viz níže) či neredukovaný pyl diploidního jedince, případně i redukovaný pyl diploidního jedince s účastí obou spermatických buněk při oplodnění centrálních jader (viz výše). Při hybridizačních pokusech bylo testováno opylení *S. cucullifera* (3x) jeřábem mukem (2x). Všechna vzniklá semena obsahovala 3x embrya a 8x endosperm, potvrzují tedy účast 2x jedince při oplodnění centrálních jader. Nejasné ovšem zůstává, zdali bylo k oplodnění použito jedno neredukované spermatické jádro, či dvě redukovaná. Pro zodpovězení této otázky bylo potřebné podrobit diploidní jedince analýze ploidních úrovní pylu.

V Moravském krasu jsou nejčastější poměry 3:9 a 3:10, odpovídající pseudogamii s 3x, respektive 4x pylem. Příspěvek tetraploidního samčího genomu v endospermu může být opět buď z jedné neredukované gamety, či ze dvou redukovaných. V tomto regionu se nevyskytuje v blízkosti triploidů žádný diploidní jedinec a nebyl zde ani detekován žádný poměr naznačující účast diploidního (či dokonce monoploidního) pylu. Navíc se ani neobjevily poměry odpovídající oplodnění neredukovaným tetraploidním pylem (tedy 8x). Tyto výsledky tedy částečně potvrzují, že u jeřábů často dochází k účasti obou spermatických jader na vzniku endospermu a navíc ukazují, že *S. danubialis* tvoří pravděpodobně především redukovaný pyl.

Další, méně častý typ reprodukce nalezený u triploidů je pohlavní rozmnožování, které bylo detekováno pouze u *S. cucullifera* a linie „*pinetorum*“. Zjištěný poměr 3:4 odpovídá účasti monoploidní samičí gamety a diploidní samčí, která je jistě redukovanou gametou tetraploidního jedince, neboť muselo dojít k dvojitému oplození. Pseudogamie s monoploidním pylem je také relativně málo častý způsob rozmnožování u triploidů. Poměr tomu odpovídající (3:7) byl nalezen pouze v Podyjí u *S. cucullifera* a linie „*pinetorum*“. U triploidních jedinců byly dále nalezeny poměry vysvětlitelné účastí tří centrálních jader zárodečného vaku při vzniku endospermu. Byly to poměry 3:11 (s účastí 2x pylu u *S. cucullifera*) a 3:13 (s účastí 4x pylu u *S. moravica*). V některých analýzách semen se objevil pík navíc, odpovídající velikostně dvounásobku endospermu. Pravděpodobně se nejednalo o G2 fázi endospermu (který už se ve zralém semeni nedělí), ale jeho polyploidizaci, která byla pozorována při embryologických studiích u *S. sudetica* (Jankun and Kovanda, 1986).

Linie „*pinetorum*“ tvoří i jiné ploidie embryí než očekávané 3x, které tvoří pouze 57 % všech analyzovaných semen. Byly nalezeny 2,5x embrya s četností 10 %, celých 31 % semen obsahovalo 4x embrya a 2 % detekovaných embryí bylo 5x. Ze studovaných polyploidních skupin má také největší zastoupení sexuálního rozmnožování (44 %), což naznačuje, že se jedná o mladou, ještě neustálenou fakultativně apomiktickou linii. Molekulárně a morfologicky je ovšem stejně málo variabilní jako ostatní triploidní linie (viz

dále). Navíc nebyla u dospělých jedinců pozorována žádná jiná ploidní úroveň, což může znamenat, že životaschopné je pouze apomikticky vzniklé triploidní potomstvo. U semen s 3x embryi byly ploidie endospermů stejně variabilní jako u ostatních triploidů, takže odlišnost této linie je dána vysokou mírou sexuality a schopností tvořit různě redukované gamety. Nejčastějším poměrem mezi všemi semeny linie „*pinetorum*“ byl poměr 3:8, stejně jako u *S. cucullifera* a „*evanida*“ vyskytujících se také v Podyjí. Ovšem druhým nejčastějším poměrem byl 4:8, který je s jistotou výsledkem pohlavního rozmnožování, ale neodpovídá základnímu poměru 2:3. Vysvětlen může být účastí jednoho centrálního jádra navíc (tedy celkem tři) při vzniku endospermu. Embryo tedy mohlo vzniknout spojením 2x vajíčka a 2x spermatické buňky (pravděpodobně od *S. danubialis*) a endosperm spojením třech 2x centrálních jader a (druhého) 2x spermatického jádra.

Výjimečnou variabilitu v reprodukčních způsobech vykazuje singulární jedinec z lokality Bor u Hardggu, u kterého byla detekována embrya o velikosti odpovídající dvou až tři a půl násobku ploidní úrovně s plynulým přechodem. Nestálost v míře redukovanosti gamet a typu reprodukce může naznačovat nedávný vznik tohoto hybrida (oproti ostatním singulárním jedincům).

Výsledky naznačují, že jednotlivé taxony (i přesto že jsou apomiktické) mohou vytvářet životaschopný pyl a být jeho donorem ostatních druhů agregátu a významně tak zasahovat do mikroevoluce celé skupiny. Vzhledem k tomu, že jeřáby tvoří i mezirodové křížence (např. ×*Sorbopyrus*; Dostálek, 1992), nedá se vyloučit ani účast pylu jiných rodů podčeledi Malaceae. Pyl jeřábů je binukleárního typu (Dumas and Russell, 1992; P. Koutecký, ústní sdělení), který obsahuje až do vyklíčení pylové láčky dvě buňky: vegetativní (1n) a generativní (2n), která se posléze rozdělí na 2 spermatická jádra. Analýza ploidií pylu průtokovou cytometrií byla testována pouze na 2 druzích ze *S. aria* agg. (celkem 29 analýz). Jednalo se o tetraploidní *S. danubialis* a *S. collina*. U žádného z nich nebyl detekován neredukovaný pyl, ale vzhledem k nízkému počtu analýz nelze vyloučit, že může docházet k nerozdělení generativní buňky a vzniku jen 1 spermatické buňky. Metodika byla dále testována na diploidním a triploidním druhu z jiných podrodů (*S. torminalis*, *S. bohemica*). U *S. torminalis* (2x) byly analýzy úspěšné jen částečně, neboť kvůli výraznému pozadí nebyl zřetelný pík vegetativního jádra. Nicméně potenciální neredukovaná jádra by v analýze byla rozpoznatelná, ale pozorována nebyla. Analýzou pylu triploidního jedince *S. bohemica* jsme nezjistili žádná jádra, což je pravděpodobně způsobeno tím, že triploidní rodu *Sorbus* tvoří pouze řádově procenta dobře vyvinutého pylu (Liljefors, 1955). Pro získání větší jistoty v interpretaci poměrů ploidií embrya a endospermu zjištěných průtokovou cytometrií bude nezbytné metodiku analýzy pylu dále optimalizovat a především doplnit analýzy všech taxonů *S. aria* agg.

Kromě nepohlavního rozmnožování formou apomixie u jeřábů také dochází k šíření pomocí hřížení. Tento způsob jsme pozorovali u některých jedinců *S. danubialis* (viz Obr. 43) avšak dříve byl znám pouze u *S. sudetica* a jeho rodičů *S. aria* s.str. a *S. chamaemespilus* a u jedinců *S. hardeggensis* (Kociánová and Štursová, 1986; Kovanda, 1999; Kociánová et al., 2005).



Obr. 43: Spontánní hřížení u *Sorbus danubialis* na lokalitě Ostrý u Milešova v Českém středohoří. Na levém snímku je vidět připojení větve k mateřskému stromu. Napravo je detail zakořenění větve.

### 5.3. Genetická variabilita

Ke zhodnocení genetické variability bylo použito 12 mikrosatelitových úseků. Tato metoda je vhodná ke zjišťování vztahů u blízce příbuzných druhů (Mandák, 2011). Jedna z výhod analýzy mikrosatelitů je, že získaná data mají kodominantní charakter. Avšak vzhledem k různým ploidním úrovním studovaných taxonů musela být data hodnocena jako markery dominantní. Při interpretaci mikrosatelitových výsledků může dojít k nadhodnocení variability a to díky zahrnutím somatických mutací. Naopak k podhodnocení variability může dojít kvůli omezenému počtu studovaných lokusů, u kterých navíc není známé přesné rozmístění v genomu studovaných taxonů (Mandák, 2011).

Na základě mikrosatelitového „pattern“ byli jedinci pomocí analýzy hlavních koordinát (PCoA) zařazeni do jednotlivých taxonů/linií. Všechny skupiny byly jasně oddělené, jedinou výjimku tvořily dva tetraploidní jedinci ze zahraničí (z Norska a Maďarska), kteří byli přiřazeni na okraj skupiny diploidních jedinců *S. aria* s.str. To mohlo být způsobeno tím, že se s největší pravděpodobností jedná o autotetraploidní druhy odvozené od *S. aria* s.str. (z Norska např. *S. rupicola*; Liljefors, 1953). Další alternativou je vznik těchto jedinců zpětným křížením triploidního hybridu se *S. aria* s.str. Analýza hlavních komponent dále

ukázala jistý „pattern“ v rozmístění singulárních jedinců. Všechny tři singulární rostliny z Podyjí jsou si geneticky podobnější než jedinci z jiných regionů, singulární jedinci z Moravského krasu jsou bližší spíše k *S. pontis-satani* (z téže lokality), případně k *S. subdanubialis*, ke kterému se řadí i jediný analyzovaný singulární jedinec z Maďarska. Tato genetická blízkost (podpořená částečně i geografickou) může být způsobena vznikem z podobného genového poolu rodičovských kombinací. Překvapivým výsledkem bylo rozdělení skupiny *S. pannonica* agg. na 2 relativně vzdálené skupiny (viz dále). Geografické rozdělení těchto skupin není zřetelné, ale vzhledem k omezenému počtu analyzovaných jedinců ho nelze vyloučit.

Analýza sdílených alelických fenotypů nenalezla shody mezi druhy. Všechny sdílené fenotypy se vždy nacházely pouze v rámci daného taxonu/linie. Při mezipopulačním porovnání (uvnitř druhů) byl u *S. collina* nalezen „pattern“ sdílení identických sad alel pouze v rámci regionu České středohoří, kdežto populace z ostatních regionů sdílí jiné sady alel. Může to být způsobeno tím, že regiony Český kras, Křivoklátsko a střední Povltaví jsou všechny spojeny říčními kaňony, které představují dokonalé biokoridory pro lesostepní druhy, zatímco České středohoří je relativně izolovaná stepní oblast, která je oddělena od ostatních úživnou nížinou, která není pro přežití stepních druhů příliš vhodná. Obdobné rozdělení však nebylo u *S. danubialis* v rámci České republiky zaznamenáno. Důvodem může být jeho širší ekologická amplituda, která se odráží v jeho rozsáhlejším areálu v rámci České republiky, díky kterému mohlo docházet ke komunikaci populací v Čechách a na Moravě přes Třebochovskou bránu (např. Ložek, 2009). Určitý „pattern“ ve sdílení alelických fenotypů u *S. danubialis* je ovšem pozorovatelný při pohledu na celý střeoevropský prostor. Shodné alelické fenotypy jsou u tohoto druhu vázány na oblasti sběru, které přibližně odpovídají státům. Jen výjimečně byly nalezeny identické alelické sady u jedinců pocházejících z různých zemí.

Analýza molekulární variance (AMOVA) odhalila největší procento variability mezi taxony/liniemi v rámci stejné ploidní úrovně. Procento variability mezi cytotypy však vyšlo jako záporné číslo, což může být způsobeno nedostatečnou či nulovou strukturou v datech (Excoffier, 2000). Tento výsledek tedy naznačuje, že mezi ploidními úrovněmi není měřitelný rozdíl. Vzhledem k tomu, že jednotlivé polyploidní skupiny vznikly hybridizací blízce příbuzných diploidních druhů a následovalo zpětné křížení a křížení mezi polyploidy navzájem, je pravděpodobné, že žádná cytotypová skupina neobsahuje unikátní alely. Do analýzy variability mezi populacemi byli zařazeni pouze rozšířené taxony *S. aria* s.str., *S. collina*, *S. danubialis* a *S. graeca*. Tato analýza potvrdila, že největší podíl variability se nachází mezi druhy (85,8 %). Variabilita mezipopulační a vnitropopulační vyšla přibližně stejně nízká (6,79 % a 7,41 %). Tyto výsledky nejsou nijak překvapivé vzhledem k apomiktickému rozmnožování polyploidních taxonů (některé druhy jsou tvořeny dokonce pouze jediným genotypem – viz dále).

Při porovnání variability jednotlivých druhů pomocí indexu AGD („Average gene diversity over all loci“; Nei, 1987) a počtu polymorfních lokusů se podle očekávání ukázal jako nejvariabilnější diploidní sexuální taxon *S. aria* s.str. Naopak nejmenší variabilitu (AGD=0, žádný polymorfní lokus) měly obligátně apomiktický taxon *S. moravica* a linie „*evanida*“. Každá tato skupina je tvořena pouze jedním genotypem, což může být proto, že se rozmnožují výhradně nepohlavně, nebo že byl zkoumán pouze malý počet jedinců

(12 a 7), případně může být důvodem nedostatečná počet studovaných mikrosatelitových lokusů. Překvapivým výsledkem je variabilita druhu *S. collina* (apomiktický tetraploid s reziduální sexualitou), která je nejvyšší mezi polyploidy z Čech. Fakultativní apomikt *S. danubialis* (4x) vykazuje překvapivě nízkou variabilitu, srovnatelnou spíše s obligátně apomiktickými liniemi. Snížená molekulární variabilita v rámci populace by mohla být způsobena jinými způsoby nepohlavního šíření (u jeřábů pomocí spontánního hřížení), takže genotypově stejní jedinci v populaci nemusí být klony z důvodu apomiktického rozmnožování, ale protože se jedná o ramety jednoho jedince (jedné genety). Takto se ovšem dá vysvětlit uniformita malých populací, nikoli velkých, čítajících desítky jedinců. Nízká genetická variabilita pozorovaná u celého druhu může být způsobena nižším počtem alel, které získal od svých rodičů, tedy jeho vyšší homozygotitou. Pozorovaný rozdíl variability *S. danubialis* a *S. collina* by mohl být vysvětlen i z druhé strany, tedy že došlo k podhodnocení míry sexuality u *S. collina*, například z důvodu ovlivnění reprodukčního mechanismu vnějšími vlivy (počasí či klima, viz např. Barnabás et al., 2008). Zjištěná převaha apomiktického rozmnožování by tak nemusela být stabilním stavem. U jeřábů ovšem nebyly účinky vnějších činitelů na typ reprodukce studovány.

Druhý fakultativní apomikt linie „*pinetorum*“ (3x), má genetickou (i morfoložickou) variabilitu stejnou, jako obligátně apomiktické triploidní skupiny. Jeho téměř z 50 % sexuální rozmnožování tak může značit, že je tato linie mladší než ostatní. Dalším možným vysvětlením by byla silná selekce proti deviantním chromosomovým počtům embrya, popřípadě je možné, že semena s kombinací nestandardní ploidie embrya a endospermu nejsou vůbec životaschopná. Bohužel nebyly provedeny testy na klíčení semen pro potvrzení této možnosti. Tetraploidní *S. graeca* z Maďarska se jeví jako variabilnější než čeští tetraploidi (AGD 0,01284 vs. 0,009722 a 0,004782), ale bohužel u ní nebyl zkoumán reprodukční způsob. Dřívější studie, které hodnotily jeřáby molekulárními markery, typ rozmnožování odhadovaly právě podle genetické variability (Robertson et al., 2004b; Vít, 2006). Vzhledem k nám nalezenému paradoxu variability *S. collina* oproti *S. danubialis* ale může být odhad reprodukčního mechanismu podle molekulárních dat značně nepřesný.

Analýza variability jednotlivých populací byla opět provedena pouze u široce rozšířených druhů. Tato analýza odhalila větší variabilitu populací *S. danubialis* v Maďarsku než v České republice. To může být způsobeno tím, že v Panonii *S. danubialis* pravděpodobně vznikl a do Čech se rozšířily pouze některé jeho úspěšné genotypy. Zjištěný „*pattern*“ potvrzuje roli Panonie jako Evropského centra diverzity. Výsledky také ukazují, že velké procento českých populací *S. danubialis* je tvořeno jediným genotypem (64 %), kdežto u *S. collina* je takových populací jen 10 %, což opět značí překvapivě vyšší variabilitu tohoto více apomiktického druhu.

Z analýzy hlavních koordinát je zřetelné, že triploidní linie jsou kříženci mezi diploidní *S. aria* s str. a jedním z tetraploidních taxonů. Většina triploidních jedinců spadá mezi *S. aria* s.str. a *S. danubialis*, kteří by mohly být jejich rodiči (Warburg and Kárpáti, 1968; Lepší et al., in press.). V Podyjí by mohl být tetraploidním rodičem teoreticky i *S. thayensis* (Lepší et al., in press.), ale z PCoA vyplývá, že je sám blíže druhu *S. aria* než triploidní jedinci. *S. thayensis* by tak mohl být sám spíše produktem zpětného křížení některého triploidního druhu z Podyjí se *S. aria* s.str., než rodičem. V Moravském krasu se vedle triploidních taxonů *S. moravica* a *S. pontis-satani* vyskytuje pouze tetraploidní *S. danubialis*,

není zde žádný potenciální diploidní rodič – nejbližší je na lokalitě vzdálené 15 km. Tato vzdálenost představuje nepřekonatelnou překážku pro opylovače jeřábů, kterými jsou včely, jejichž maximální dolet je udáván 5-7 km (Kala, 2003; Šturma, 2012). Pravděpodobně tak triploidní linie vznikly v době, kdy se *S. aria* s.str., ještě na lokalitách vyskytovala a posléze byla změnou vegetace či náhodnými procesy z území vytlačena. Dalším, i když velice málo pravděpodobným scénářem je možnost vzniku těchto linií na jiném místě a přenesení a rozšíření na současné lokality např. ptáky (Lepší et al., in press.). Tato možnost je ale velice málo pravděpodobná, neboť se takové linie na jiném místě nenašly. Jako možný produkt křížení *S. aria* s.str. se *S. collina* či *S. graeca* se jeví pouze podskupina *S. pannonica* agg. (výše označovaná jako podskupina B), což odpovídá dřívějším předpokladům (Kárpáti, 1960). Podskupina a *S. pannonica* agg. spadá překvapivě s ostatními triploidy mezi druhy *S. aria* s.str. a *S. danubialis*.

#### 5.4. Morfologická variabilita

Morfologické znaky odlišují taxony relativně dobře, a i když dochází k překryvu skupin, jsou zde zřetelné jisté tendence. Nejvíce problematické jsou některé skupiny triploidů (především odlišení *S. cucullifera* od ostatních), neboť důležité znaky pro jejich jasné odlišení jsou na květech a zralých plodech (Lepší et al., in press.), které ovšem nebyly v předkládané práci analyzovány. Květy a plody je většinou těžké získat, neboť jsou přítomny jen v krátké fenologické fázi (květy pouze cca 14 dní během května, zralé plody vhodné k určení až v září) a navíc jeřáby neplodí každý rok (osobní pozorování; Rich et al., 2010). Pro morfometrické analýzy bylo často velice těžké získat z jedince vhodný materiál, neboť jsou listy ve velké míře napadány fytofágním hmyzem.

Morfologická variabilita sexuálního druhu *S. aria* s.str. je výrazně vyšší než apomiktických tetraploidních taxonů *S. collina* a *S. danubialis*. Od *S. graeca* bylo analyzováno pouze omezené množství jedinců, a výsledky jsou tak málo průkazné. Nejmenší variabilitu nepřekvapivě vykazují triploidní druhy a linie, neboť jsou geneticky málo variabilní a obligátně apomiktické. Stupeň variability mezi nimi se zdá být srovnatelný. Překvapením opět je napůl sexuální linie „*pinetorum*“, která vykazuje stejný „*pattern*“ jako obligátní apomikté (diskutováno výše). Hodnocením variability triploidů ale nelze přikládat velkou váhu, neboť u některých taxonů bylo díky špatnému stavu listů při sběrech analyzováno jen malé množství jedinců (například pouze 5 jedinců od linie „*pinetorum*“ a „*evanida*“ či 7 jedinců druhu *S. pontis-satani*).

Zajímavý výsledek přinesla analýza morfologické plasticity klonů *S. danubialis* a *S. collina*. Listy geneticky shodných jedinců *S. danubialis* pokrývají celou šíři variability tohoto druhu. U *S. collina* je fenotypová plasticita jednoho klonu také značná, ale nedosahuje rozpětí variability pozorované u celého druhu. To je pravděpodobně způsobeno výběrem klonu, který byl testován – u *S. collina* se jednalo o klon rozšířený pouze v Českém středohoří, kdežto u *S. danubialis* byl analyzován klon vyskytující se na celém území České republiky (klony vázané na užší region u něj nebyly nalezeny). Fenomén široké morfologické plasticity byl dále potvrzen při analýze modelových populací, a to především na Ostrém v Českém středohoří. Zde se vyskytují celkem jen čtyři genotypy (dva od

každého druhu), jejichž variabilita je tak široká, že při analýze hlavních komponent dochází i k překryvu mezi taxony.

Také analýza tvaru listů, jejíž předností je odstranění subjektivního pohledu, odhalila velkou vnitrodruhovou plasticitu a přiřadila jí větší váhu, než variabilitě mezidruhové. Při analýze hlavních komponent bylo prvními dvěma osami vysvětleno okolo 60 % variability při téměř nulovém rozlišení taxonů. Mezidruhové rozdíly se ukázaly až při zobrazení třetí a čtvrté osy (dohromady vysvětlujících cca 17 % variability, viz Obr. GM 19, kapitola výsledky). Zjištěná míra fenotypové plasticity stěžuje uchopení mezidruhové variability v rodu *Sorbus* a vysvětluje obtížnost uchopení druhů definovaných pomocí morfologických znaků.

### 5.5. Rozmístění variability jeřábů v rámci ČR

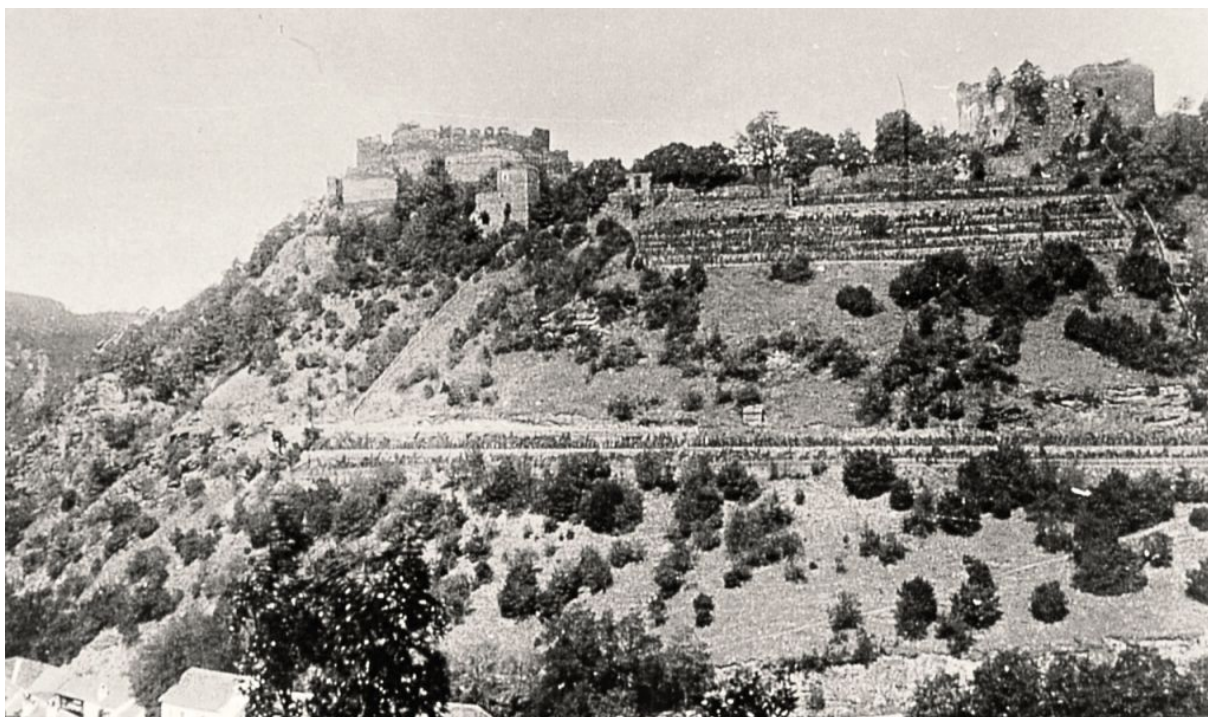
Centrum diverzity jeřábů v České republice je vázáno na jižní Moravu, kde se vyskytují všechny tři ploidní stupně a největší počet taxonů. V Moravském krasu se jedná o 4 taxony: *S. danubialis* (4x), *S. moravica* (3x), *S. pontis-satani* (3x), singulární jedinci (minimálně dva 2x a jeden 4x) a na vzdálené lokalitě, ale stále v Moravském krasu i *S. aria* s.str. (2x). Největší druhová diverzita je vázána na Podyjí (myšleno NP Podyjí i NP Thayatal), kde se vyskytují 4 taxony – *S. aria* s.str. (2x), *S. cucullifera* (3x), *S. danubialis* (4x), *S. thayensis* (4x) – dále 2 triploidní linie („*pinetorum*“, „*evanida*“) a několik singulárních jedinců (3x i 4x). V Pojihlaví a v Čechách jsou rozšířené pouze tetraploidní *S. danubialis* a *S. collina*, přičemž *S. danubialis* je hojnější v Českém středohoří a Doupovských horách a *S. collina* v Českém krasu, na Křivoklátsku a ve středním Povltaví.

Důvodem existence centra diverzity na jižní Moravě může být enklávní výskyt *S. aria* s.str., který sem zasahuje z Panonie. Přítomnost sexuálního diploidního druhu se zdá být při hybridizacích nezbytná. V Moravském krasu je pravděpodobně jiná panonská větev *S. aria* s.str. než v Podyjí (vyplývá z PCoA, neprezentovaná data). Dříve byl tento druh daleko rozšířenější než dnes, neboť musel dát společně se *S. chamaemespilus* vzniknout endemickému druhu Krkonoš *S. sudetica*, jehož vznik se odhaduje na dobu před více než deseti tisíci lety (Kovanda 1965). Jeřáby skupiny *S. aria* agg. jsou světlomilné rostliny rostoucí převážně na výchozech skal a strmých stráních a jsou konkurenčně slabé (v zastínění nejsou schopné plně kvést a plodit; Lepší et al., 2009; Rich et al., 2010). Jsou vázány na primární bezlesí či velmi řídký les, což jsou biotopy, které dnes zanikají díky výraznému úbytku pastvy (a zvláště zákazu lesní pastvy lesním zákonem Marie Terezie v 18. století, která dávala vzniknout prosvětleným řídkým lesům; Stejskal, 2009) a opětovnému zalesňování, jak je vidět například na historickém a současném snímku z NP Podyjí (viz Obr. 44 a 45). Při odlesnění byla větší možnost uchycení všech jedinců, tedy i značného množství singulárních typů (tj. singulární typy mohou být naopak pozůstatky kdysi početných populací), primárních hybridů apod. Vrchol rozšíření tedy mohl být na přelomu 18. a 19. století, kdy byla krajina nejvíce odlesněná. Dnes je v Podyjí patrná stále probíhající evoluce, ovšem na značně omezeném území. Pro lepší interpretaci pozorovaných procesů v historickém měřítku by bylo vhodné znát stáří studovaných jedinců. Odhad věku

je ovšem u jeřábů značně komplikován jejich schopností tvorby výhonů ze starého dřeva (je těžké od sebe rozlišit semenáček a výhon ze starého kořene) a spontánního hřížení.



**Obr.44** : Zalesněnost krajiny v NP Podjeří kolem roku 1950 (vlevo) a nyní (vpravo). Obrázky převzaty a upraveny z [www.cenia.cz](http://www.cenia.cz), [www.maps.google.com](http://www.maps.google.com)



**Obr. 45:** Historická fotografie Nového hrádku v NP Podjeří.  
Fotografie převzata z [www.nppodyji.cz](http://www.nppodyji.cz)



V rámci celé Evropy je centrum diverzity v Panonii a na Balkánském poloostrově. Další výzkum by bylo vhodné směřovat do těchto oblastí, především na Balkán, neboť tam se vyskytuje druhý z hlavních druhů komplexu *S. aria* agg. – *S. umbellata*. Jedná se o domnělého rodiče hybridogenních taxonů (například *S. danubialis*) a jsou u něj udávány dva cytotypy, diploidní a tetraploidní (Aldasoro et al., 2004), avšak studie provedená na širší geografické škále se zahrnutím více než jednotek jedinců chybí. Z výsledků molekulárních analýz (viz výše) vyplývá, že by bylo dále zajímavé se zaměřit na fylogeografii jeřábů (především sexuálních druhů), kterou se u tohoto rodu také ještě nikdo nezabýval.

### 5.6. Dopady mikroevolučních procesů na taxonomii

Nastavený přirozený druhový koncept u jeřábů, tj. popis všech jednotlivých apomiktických linií (reprodukčně izolovaných, geneticky i fenotypově odlišných), sice postihuje veškerou diverzitu obligátně apomiktických linií, ale při pohledu na rozmanitost celé skupiny *S. aria* agg. (viz Obr. 17 v kapitole Výsledky morfologických analýz a Obr. 13 v kapitole Výsledky analýzy mikrosatelitů) jde o přiřazování statutu druhu velice malým výsečím variability, které je možno determinovat jen ze strany značně omezeného množství specialistů. Tento koncept je v podstatě udržitelný v západní a částečně střední Evropě, kde je počet evolučních linií jeřábů omezen a převládá apomixie. Problém nastává v evropském centru diverzity – v Panonii a na Balkáně, kde se nachází více sexuálních linií a retikulátní evoluce je zde jistě daleko komplikovanější než u nás a kde bude pravděpodobně přirozený druhový koncept neudržitelný. Limity tohoto přístupu jsou ovšem zřejmé i v Podyjí – nejpodrobněji prozkoumané oblasti výskytu jeřábů v České republice. Druhy jsou zde popsány za podmínek reprodukční izolovanosti a evoluční stability, a pokud tvoří relevantně početné populace. Díky tomu zůstaly nehodnocené dvě evoluční linie (linie „*pinetorum*“ z důvodu nestability zjištěné analýzou reprodukčních způsobů a linie „*evanida*“ z důvodu malého počtu jedinců) a několik singulárních jedinců. V součtu se jedná o několik desítek rostlin, které nelze zařadit k žádnému druhu a jediné bližší určení představuje jejich zahrnutí do široké skupiny *S. aria* agg. Pro taxonomické hodnocení podrodu *Aria* nejen v jihovýchodní Evropě by mohl být vhodnější pragmatický koncept, u kterého jsou definovány širší druhy pomocí arbitrárně stanovených hranic. Rozlišení jednotlivých taxonů spolu s jejich vztahy tak zůstává uchopitelné (k takové změně konceptů došlo například v rodě *Pilosella*; Zahn, 1921, 1922, 1923 vs. Bräutigam and Greuter, 2007).

## 6. Závěr

Všechny tři v Evropě nejběžnější cytotypy jeřábů – diploidní, triploidní a tetraploidní – se vyskytují i v České republice. Variabilita ploidních úrovní je u nás ale vázána pouze na jižní Moravu (oblast Podyjí a Moravského krasu), která je i díky své taxonomické rozmanitosti centrem diverzity skupiny *S. aria* agg. i celého rodu *Sorbus* v České republice. Vzácně se vyskytující pentaploidní cytotyp nebyl nalezen ani mezi studovanými zahraničními jedinci.

Rozsáhlá analýza semen jedinců *S. aria* agg. průtokovou cytometrií odhalila celkem sedm typů reprodukčních způsobů, zahrnujících sexuální i apomiktické (pseudogamické) rozmnožování s různě redukovanými gametami. Byly tak u podrodu *Aria* nově zjištěny všechny způsoby udávané pro ostatní taxony rodu, ovšem díky schopnosti přijmout pyl i od ostatních druhů (v některých případech i z jiných podrodů) ve větším množství variant. Zajímavým výsledkem je především potvrzení haploidní partenogeneze u druhu *S. danubialis*, která byla doposud naznačována jen u taxonu *S. sudetica* (podrod *Chamaespilaria*). Všichni diploidní jedinci jsou plně sexuální, kdežto u polyploidních taxonů převažuje apomixie, přičemž pouze u *S. danubialis* a linie "pinetorum" byl zaznamenán výraznější podíl pohlavního rozmnožování.

Pomocí molekulárních markerů (mikrosatelitů) byly rozlišeny a potvrzeny jednotlivé druhy a izolované evoluční linie. Nejvyšší míra genetické variability u sexuální diploidní *S. aria* s.str. odpovídá jejímu typu rozmnožování. Mezi fakultativně a obligátně apomiktickými polyploidními skupinami nebyla nalezena vazba genetické diverzity a míry sexuality. Podle mikrosatelitového pattern byly zjištěny parentální druhy hybridogenních taxonů. Převážná většina vznikla křížením *S. aria* s.str. a *S. danubialis*. Jediná skupina pocházející z kombinace *S. aria* s.str. a *S. graeca* (případně *S. collina*) je *S. pannonica* agg. Na základě morfologických znaků lze od sebe jednotlivé taxony víceméně odlišit, ale často dochází k překryvu znaků díky enormní fenotypové plasticitě. Ta byla zjištěna nejen u jednotlivých druhů, ale ve stejné šíři i u jedinců se shodným genotypem.

Nastavený koncept taxonomického hodnocení podrodu *Aria* odráží jen část jeho variability. Nemalý příspěvek k rozmanitosti skupiny představují i nadále nezařaditelné izolované evoluční linie a singulární jedinci.

## 7. | Literatura

- AAS, G., J. MAIER, M. BALTISBERGER, AND S. METZGER. 1994. Morphology, isozyme variation, cytology, and reproduction of hybrids between *Sorbus aria* ( L.) Crantz and *S. torminalis* ( L.) Crantz. *Botanica Helvetica* 104: p.195-214.
- AEDO, C., AND J.J. ALDASORO. 1998. *Sorbus* L. In F. M. Garmendia, and C. Navarro [eds.], *Flora Iberica* vol. VI Rosaceae, 414-429. Real jardín botánico, SCIC, Madrid.
- ALDASORO, J.J., C. AEDO, F.M. GARMENDIA, F.P. DE LA HOZ, AND C. NAVARRO. 2004. Revision of *Sorbus* subgenera *Aria* and *Torminaria* (Rosaceae-Maloideae). *Systematic Botany Monographs* 69: p.1-148.
- ALDASORO, J.J., C. AEDO, C. NAVARRO, AND F.M. GARMENDIA. 1998. The Genus *Sorbus* (Maloideae, Rosaceae) in Europe and in North Africa: Morphological Analysis and Systematics. *Systematic Botany* 23: p.189-212.
- ANDERSON, E., AND G.L. STEBBINS JR. 1954. Hybridization as an Evolutionary Stimulus. *Evolution* 8: p.378-388.
- ANTONIUS, K., AND H. NYBOM. 1995. Discrimination between sexual recombination and apomixis/automixis in a *Rubus* plant breeding programme. *Hereditas* 123: p.205-213.
- ASKER, S.E., AND L. JERLING. 1992. Apomixis in Plants. CRC press, Boca Raton.
- VAN BAARLEN, P., P.J. VAN DIJK, R.F. HOEKSTRA, AND H.J. DE JONG. 2000. Meiotic recombination in sexual diploid and apomictic triploid dandelions (*Taraxacum officinale* L.). *Genome* 43: p.827-835.
- VAN BAARLEN, P., J.H. DE JONG, AND P.J. VAN DIJK. 2002. Comparative cyto-embryological investigations of sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*) and their apomictic hybrids. *Sexual Plant Reproduction* 15: p.31-38.
- BAILEY, J., Q. KAY, H. MCALLISTER, AND T. RICH. 2008. Chromosome Numbers in *Sorbus* L. (Rosaceae) in the British Isles. *Watsonia* 27: p.69-72.
- BARNABÁS, B., K. JÄGER, AND A. FEHÉR. 2008. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell and Environment* 31: p.11-38.
- BECHER, S.A. ET AL. 2000. Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. *Theoretical and applied genetics* 101: p.643-651.
- BERNÁTOVÁ, D., AND J. MÁJOVSKÝ. 2003. New endemic hybridogenous species of the genus *Sorbus* in the Western carpathians. *Biologia* 58: p.781-790.
- BICKNELL, R.A., N.K. BORST, AND A.M. KOLTUNOW. 2000. Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. *Heredity* 84: p.228-237.
- BRESINSKY, A. 1978. Ziele, probleme und ergebnisse der floristischen kartierung Bayerns, dargestellt am beispiel von *Sorbus aria* agg. *Hoppea, Denkschriften der Regensburgischen Botanischen Gesellschaft* 37: p.241-272.
- BRIGGS, D., AND S.M. WALTERS. 2001. Proměnlivost a evoluce rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- BRÄUTIGAM, S., AND W. GREUTER. 2007. A new treatment of *Pilosella* for the Euro-Mediterranean flora. *Willdenowia* 37: p.123-137.
- CAMPBELL, C.S., AND T.A. DICKINSON. 1990. Apomixis, Patterns of Morphological Variation, and Species Concepts in subfam. Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany* 15: p.124-135.
- CAMPBELL, C.S., M.J. DONOGHUE, B.G. BALDWIN, AND M.F. WOJCIECHOWSKI. 1995. Phylogenetic Relationships in Maloideae (Rosaceae): Evidence from Sequences of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA and Its Congruence with Morphology. *American Journal of Botany* 82: p.903-918.
- CAMPBELL, C.S., C.W. GREENE, AND S.E. BERGQUIST. 1987. Apomixis and sexuality in three species of *Amelanchier*, shadbush (Rosaceae, Maloideae). *American Journal of Botany* 74: p.321-328.
- CHALLICE, J., AND M. KOVANDA. 1978. Flavonoids as markers of taxonomic relationships in the genus *Sorbus* in Europe. *Preslia* 50: p.305-320.

- CHEN, Z.J. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual review of plant biology* 58: p.377-406.
- CHESTER, M., R.S. COWAN, M.F. FAY FLS, AND T.C.G. RICH. 2007. Parentage of endemic *Sorbus* L. (Rosaceae) species in the British Isles: evidence from plastid DNA. *Botanical Journal of the Linnean Society* 154: p.291-304.
- DICKINSON, T.A., AND C.S. CAMPBELL. 1991. Population Structure and Reproductive Ecology in the Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany* 16: p.350-362.
- VAN DIJK, P.J., I.C. TAS, M. FALQUE, AND T. BAKX-SCHOTMAN. 1999. Crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*). II. The breakdown of apomixis. *Heredity* 83: p.715-721.
- DOLEŽEL, J., J. GREILHUBER, AND J. SUDA. 2007. Flow Cytometry with Plant Cells. Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes. Wiley, Weinheim.
- DOSTÁLEK, J. 1992. *Pyrus* L. In S. Hejny, and B. Slavík [eds.], Květena České republiky 3, 464-470. Academia, Praha.
- DOUGLAS, C.M., AND U. GROSSNIKLAUS. 2008. Molecular control of autonomous embryo and endosperm development. *Sexual Plant Reproduction* 21: p.79-88.
- DUMAS, C., AND S.D. RUSSELL. 1992. Plant reproductive Biology:Trends. In S. D. Russell, and C. Dumas [eds.], International review of cytology, 565-592. Academic Press, San Diego.
- ELLSTRAND, N.C., R. WHITKUS, AND L.H. RIESEBERG. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: p.5090-5093.
- ENNOS, R. A, G.C. FRENCH, AND P.M. HOLLINGSWORTH. 2005. Conserving taxonomic complexity. *Trends in ecology & evolution* 20: p.164-168.
- EVANS, R.C., AND C.S. CAMPBELL. 2002. The origin of the apple subfamily (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes. *American Journal of Botany* 89: p.1478-1484.
- EXCOFFIER, L. 2000. FAQ List for Arlequin 2.000. Available at: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin/software/2.000/doc/faq/faqlist.htm> [Accessed April 20, 2015].
- EXCOFFIER, L., L.G. LAVAL, AND S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: p.47-50.
- FEULNER, M., S. LIEDE-SCHUMANN, U. MEVE, A. WEIG, AND G. AAS. 2013. Genetic structure of three *Sorbus latifolia* ( Lam .) Pers . taxa endemic to northern Bavaria. *Plant Systematics and Evolution* 299: p.1065-1074.
- FLEGR, J. 2009. Evoluční biologie. Academia, Praha.
- GABRIELIAN, E.T. 1972. *Sorbus* L. In P. H. Davis [ed.], Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 147-156. Edinburg University press, Edinburg.
- GABRIELIAN, E.T. 1978. The genus *Sorbus* L. in Eastern Asia and the Himalayas. Armenian Academy of Sciences, Yerevan.
- GALLARDO, M.H., J.W. BICKHAM, R.L. HONEYCUTT, R.A. OJEDA, AND N. KÖHLER. 1999. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* 401: p.341.
- GERLACH, D. 1965. Befruchtung und Autogamie bei *Rubus caesius*. *Biologisches Zentralblatt* 84: p.611-633.
- GIANFRANCESCHI, L., N. SEGLIAS, R. TARCHINI, M. KOMJANC, AND C. GESSLER. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theoretical and Applied Genetics* 96: p.1069-1076.
- GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E. A., M. A. GONZÁLEZ-PÉREZ, E. RIVERO, AND P. A. SOSA. 2010. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Sorbus aria* (Rosaceae). *Conservation Genetics Resources* 2: p.341-343.
- GRIMANELLI, D., O. LEBLANC, E. ESPINOSA, E. PEROTTI, D. GONZÁLEZ DE LEÓN, AND Y. SAVIDAN. 1998. Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes? *Heredity* 80: p.33-39.
- GRIMANELLI, D., O. LEBLANC, E. PEROTTI, AND U. GROSSNIKLAUS. 2001. Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in genetics* 17: p.597-604.
- HAMMER, O., D.A.T. HARPER, AND P.D. RYAN. 2001. Paleontological statistics software package for education and data analyses. *Palaeontologia Electronica* 4: p.1-9.

- HEGARTY, M.J., AND S.J. HISCOCK. 2008. Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Current biology* 18: p.435-444.
- HEGARTY, M.J., AND S.J. HISCOCK. 2005. Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *The New phytologist* 165: p.411-423.
- HOEBEE, S.E. ET AL. 2007. Mating patterns and contemporary gene flow by pollen in a large continuous and a small isolated population of the scattered forest tree *Sorbus torminalis*. *Heredity* 99: p.47-55.
- HOLUB, J. 1995. *Rubus* L. In B. Slavík [ed.], Květena České republiky 4, Academia, Praha.
- HOUSTON, L., A. ROBERTSON, K. JONES, S.C.C. SMITH, S.J. HISCOCK, AND T.C.G. RICH. 2009. An account of the Whitebeams (*Sorbus* L., Rosaceae) of Cheddar Gorge, England, with description of three new species. *Watsonia* 27: p.283-300.
- IWATA, H., AND Y. UKAI. 2002. SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *The Journal of Heredity* 93: p.384-385.
- JANKUN, A., AND M. KOVANDA. 1987. Apomixis and origin of *Sorbus bohemica* (Embryological studies in *Sorbus* 2). *Preslia* 59: p.97-116.
- JANKUN, A., AND M. KOVANDA. 1988. Apomixis at the diploid level in *Sorbus eximia* (Embryological studies in *Sorbus* 3). *Preslia* 60: p.193-213.
- JANKUN, A., AND M. KOVANDA. 1986. Apomixis in *Sorbus sudetica* (Embryological studies in *Sorbus* 1). *Preslia* 58: p.7-19.
- JEDRZEJCZYK, I., AND E. SLIWINSKA. 2010. Leaves and Seeds as Materials for Flow Cytometric Estimation of the Genome Size of 11 Rosaceae Woody Species Containing DNA-Staining Inhibitors. *Journal of Botany* 2010: p.1-9.
- KALA, J. 2003. Důkaz o doletu včel za snůškou. *Včelařské noviny*. Available at: <http://www.vcelarskenoviny.cz/vcelarska-praxe/21-dukaz-o-doletu-vcel-za-snuskou.html> [Accessed April 30, 2015].
- KALENDAR, R., D. LEE, AND A.H. SCHULMAN. 2011. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics* 98: p.137-144.
- KALKMAN, C. 2004. Rosaceae. In K. Kubitzki [ed.], The families and genera of vascular plants, 343-386. Springer, Berlin.
- KHANDELWAL, S. 1990. Chromosome evolution in the genus *Ophioglossum* L. *Botanical Journal of the Linnean Society* 102: p.205-217.
- KOCIÁNOVÁ, M., AND H. ŠTURSOVÁ. 1986. Revize rozšíření a ekologie jeřábu krkonošského (*Sorbus sudetica*). *Opera Corcontica* 23: p.77-110.
- KOCIÁNOVÁ, M., H. ŠTURSOVÁ, AND J. ZAHRADNÍKOVÁ. 2005. Klonální růst endemického jeřábu *Sorbus sudetica* v Krkonoších. *Opera Corcontica* 42: p.99-105.
- KOLTUNOW, A.M. 1993. Apomixis: Embryo Sacs and Embryos Formed without Meiosis or Fertilization in Ovules. *The Plant cell* 5: p.1425-1437.
- KOUTECKÝ, P. 2015. MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. *Plant Systematics and Evolution* 301: p.1115-1121.
- KOVANDA, M. 1961a. Flower and Fruit Morphology of *Sorbus* in Correlation to the Taxonomy of the Genus. *Preslia* 33: p.1-16.
- KOVANDA, M. 1999. Jeřáby (*Sorbus*) České republiky a jejich ochrana. *Příroda* 15: p.31-47.
- KOVANDA, M. 1997. Observations on *Sorbus* in Southwest Moravia (Czech Republic) and adjacent Austria II. *Verhandlungen der zoologisch-botanischen Gesellschaft in Österreich* 134: p.305-316.
- KOVANDA, M. 1992. *Sorbus* L. In S. Hejný, and B. Slavík [eds.], Květena České republiky 3, 474-484. Academia, Praha.
- KOVANDA, M. 2002. *Sorbus* L. In K. Kubát, L. Hrouda, J. Chrtek Jr, Z. Kaplan, J. Kirschner, and J. Štěpánek [eds.], Klíč ke květeně České republiky, 383-386. Academia, Praha.
- KOVANDA, M. 1961b. Taxonomical studies in *Sorbus* subg. *Aria*. *Acta Dendrologica Českoslovacca* 3: p.23-70.
- KRAHULCOVÁ, A., AND F. KRAHULEC. 2000. Offspring diversity in *Hieracium* subgen. *Pilosella* (Asteraceae): new cytotypes from hybridization experiments and from open pollination. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 45: p.239-255.

- KRAHULEC, F., A. KRAHULCOVÁ, R. ROSENBAUMOVÁ, AND I. PLAČKOVÁ. 2011. Production of polyhaploids by facultatively apomictic *Pilosella* can result in the formation of new genotypes via genome doubling. *Preslia* 83: p.471-490.
- KRON, P., AND B.C. HUSBAND. 2012. Using flow cytometry to estimate pollen DNA content: improved methodology and applications. *Annals of botany* 110: p.1067-78.
- KUTZELNIGG, H. 1994. *Sorbus* L. In H. J. Conert, U. Hamann, W. Schultze-Motel, and G. Wagenitz [eds.], *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, Band IV, Teil 2B, 249-448. Parey, Hamburg.
- KÁRPÁTI, Z.E. 1960. Die *Sorbus*-Arten Ungarns und der angrenzenden Gebiete. *Feddes Repertorium* 62: p.71-334.
- LEITCH, I.J., AND M.D. BENNETT. 1997. Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* 2: p.470-476.
- LEPŠÍ, M., P. LEPŠÍ, P. KOUTECKÝ, J. BÍLÁ, AND P. VÍT. in press.: Taxonomic revision of *Sorbus* subgenus *Aria* in the Czech Republic. *Preslia*.
- LEPŠÍ, M., P. LEPŠÍ, J. SÁDLO, P. KOUTECKÝ, P. VÍT, AND P. PETŘÍK. 2013. *Sorbus pauca* species nova, the first endemic species of the *Sorbus hybrida* group for the Czech Republic. *Preslia* 85: p.63-80.
- LEPŠÍ, M., P. LEPŠÍ, AND P. VÍT. 2013. *Sorbus quernea*: taxonomic confusion caused by the naturalization of an alien species, *Sorbus mougeotii*. *Preslia* 85: p.159-178.
- LEPŠÍ, M., P. LEPŠÍ, P. VÍT, AND P. KOUTECKÝ. 2009. *Sorbus portae-bohemicae* and *Sorbus albensis*, two new endemic apomictic species recognized based on a revision of *Sorbus bohemica*. *Preslia* 81: p.63-89.
- LEPŠÍ, M., P. VÍT, P. LEPŠÍ, K. BOUBLÍK, AND J. SUDA. 2008. *Sorbus milensis*, a new hybridogenous species from northwestern Bohemia. *Preslia* 80: p.229-244.
- LEVIN, D.A. 1983. Polyploidy and Novelty in Flowering Plants. *The American Naturalist* 122: p.1-25.
- LILJEFORS, A. 1955. Cytological studies in *Sorbus*. *Acta Horti Bergiani* 17: p.47-113.
- LILJEFORS, A. 1953. Studies on propagation, embryology, and pollination in *Sorbus*. *Acta Horti Bergiani* 16: p.277-329.
- LOUREIRO, J. ET AL. 2010. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia* 82: p.3-21.
- LOUREIRO, J., E. RODRIGUEZ, J. DOLEŽEL, AND C. SANTOS. 2007. Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. *Annals of botany* 100: p.875-888.
- LOWRY, D.B., J.L. MODLISZEWSKI, K.M. WRIGHT, C. A WU, AND J.H. WILLIS. 2008. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 363: p.3009-3021.
- LOŽEK, V. 2009. Refugia, migrace a brány II. Ve světle dnešních poznatků. *Živa* 5: p.194-198.
- MANDÁK, B. 2011. Mikrosatelity - jejich funkce, význam a použití v současné biologii. In B. Mandák, F. Krahulec, and Z. Hroudová [eds.], *Evoluční aspekty biologie rostlin*, 79-94. Česká botanická společnost, Praha.
- MARHOLD, K., AND J. SUDA. 2002. *Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody)*. Karolinum, Praha.
- MATZK, F., A. MEISTER, AND I. SCHUBERT. 2000. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 21: p.97-108.
- MEUSEL, H., E. JÄGER, AND E. WEINERT. 1965. *Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora*. Fischer Verlag, Jena.
- MEYER, N., L. MEIEROTT, H. SCHUWERK, AND O. ANGERER. 2005. Beiträge zur Gattung *Sorbus* in Bayern. *Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft Sonderband*: p.5-216.
- MIKOLÁŠ, V. 2003. *Sorbus amici-petri* MIKOLÁŠ, a new hybridogenous species of the genus *Sorbus* s.l. from eastern Slovakia. *Thaiszia - Journal of Botany* 12: p.127-133.
- MURSALIMOV, S.R., AND E.V. DEINEKO. 2015. How cytomixis can form unreduced gametes in tobacco. *Plant Systematics and Evolution* 301: p.1293-1297.
- MÁJOVSKÝ, J. 1992. *Sorbus* L. emend. Crantz. In L. Bertová [ed.], *Flora Slovenska IV/3*, 401-446. Veda, Bratislava.

- MÁJOVSKÝ, J., AND D. BERNÁTOVÁ. 2001. New hybridogeneous subgenera of the genus *Sorbus* L. Emend. Crantz. *Acta horticulturae et regioteecturae* 4: p.20-21.
- MÁJOVSKÝ, J., AND A. UHRÍKOVÁ. 1990. Karyosystematisches Studium der Gattung *Sorbus* L. emend. Cr. in der Slowakei I. *Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Comenianae, Botanica* 37: p.5-15.
- MÜNTZING, A. 1958. The balance between sexual and apomictic reproduction in some hybrids of *Potentilla*. *Hereditas* 44: p.145-160.
- NAUMOVA, T. ET AL. 2001. Reproductive development in apomictic populations of *Arabis holboellii* (Brassicaceae). *Sexual Plant Reproduction* 14: p.195-200.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- NELSON-JONES, B., D. BRIGGS, AND G. SMITH. 2002. The origin of intermediate species of the genus *Sorbus*. *Theoretical and applied genetics* 105: p.953-963.
- NOGLER, G.A. 1984. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V, Conclusion. *Botanica Helvetica* 94: p.411-422.
- NOYES, R.D., AND L.H. RIESEBERG. 2000. Two Independent Loci Control Agamospermy (Apomixis) in the Triploid Flowering Plant *Erigon annuus*. *Genetics* 155: p.379-390.
- ODDOU-MURATORIO, S., C. ALIGON, S. DECROOQ, C. PLOMION, T. LAMANT, AND B. MUSH-DEMESURE. 2001. Microsatellite primers for *Sorbus torminalis* and related species. *Molecular Ecology Notes* 1: p.297-299.
- ODDOU-MURATORIO, S., R.J. PETIT, B. LE GUERROUE, D. GUESNET, AND B. DEMESURE. 2001. Pollen- versus seed-mediated gene flow in a scattered forest tree species. *Evolution* 55: p.1123-1135.
- OTTO, S., AND J. WHITTON. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics* 34: p.401-437.
- PELLICER, J., S. CLERMONT, L. HOUSTON, T.C.G. RICH, AND M.F. FAY. 2012. Cytotype diversity in the *Sorbus* complex (Rosaceae) in Britain: sorting out the puzzle. *Annals of Botany* 110: p.1185-1193.
- PFOSSER, M. ET AL. 2006. Evolution of *Dystaenia takesimana* (Apiaceae), endemic to Ullung Island, Korea. *Plant Systematics and Evolution* 256: p.159-170.
- PRICE, D.T., AND T.C.G. RICH. 2007. One-way introgressive hybridisation between *Sorbus aria* and *S. torminalis* (Rosaceae) in southern Britain. *Watsonia* 26: p.419-432.
- PROCTOR, M.C., AND A.C. GROENHOF. 1992. Peroxidase isoenzyme and morphological variation in *Sorbus* L. in South Wales and adjacent areas, with particular reference to *S. porrigentiformis* E. F. Warb. *Watsonia* 19: p.21-37.
- PROCTOR, M.C.F., M.E. PROCTOR, AND A.C. GROENHOF. 1989. Evidence from peroxidase polymorphism on the taxonomy and reproduction of some *Sorbus* populations in south-west England. *New Phytologist* 112: p.569-575.
- PUPILLI, F., P. LABOMBARDA, M.E. CACERES, C.L. QUARÍN, AND S. ARCIONI. 2001. The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homoeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome. *Molecular Breeding* 8: p.53-61.
- PÍAS, B., AND P. GUITIÁN. 2006. Breeding system and pollen limitation in the masting tree *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae) in the NW Iberian Peninsula. *Acta Oecologica* 29: p.97-103.
- RAMSEY, J., H.D. BRADSHAW JR., AND D.W. SCHEMSKE. 2003. Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution* 57: p.1520-1534.
- RAMSEY, J., AND D.W. SCHEMSKE. 2002. Neopolyploidy in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: p.589-639.
- RAMSEY, J., AND D.W. SCHEMSKE. 1998. Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants. *Annual review of Ecology and Systematics* 29: p.467-501.
- REDDY, P.S., AND R.D. CRUZ. 1969. Mechanism of apomixis in *Dichanthium annulatum* (Forssk) Stapf. *Botanical Gazette* 130: p.71-79.
- RICH, T.C.G., D. GREEN, L. HOUSTON, M. LEPŠÍ, S. LUDWIG, AND J. PELLICER. 2014. British *Sorbus* (Rosaceae): six new species, two hybrids and a new subgenus. *New Journal of Botany* 4: p.2-12.

- RICH, T.C.G., S.A. HARRIS, AND S.J. HISCOCK. 2009. Five new *Sorbus* (Rosaceae) taxa from the Avon Gorge, England. *Watsonia* 27: p.217-228.
- RICH, T.C.G., L. HOUSTON, C.A. CHARLES, AND A.C. TILLOTSON. 2009. The diversity of *Sorbus* L. (Rosaceae) in the Lower Wye Valley. *Watsonia* 27: p.301-313.
- RICH, T.C.G., L. HOUSTON, A. ROBERTSON, AND M.C.F. PROCTOR. 2010. Whitebeams, Rowans and Service Trees of Britain and Ireland. A monograph of British and Irish *Sorbus* L. B.S.B.I. Handbook No. 14. Botanical Society of the British Isles, London.
- RICH, T.C.G., AND M.C.F. PROCTOR. 2009. Some new British and Irish *Sorbus* L. taxa (Rosaceae). *Watsonia* 27: p.207-216.
- RICHARDS, A.J. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 358: p.1085-1093.
- RIESEBERG, L.H. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual review of Ecology and Systematics* 28: p.359-389.
- RIESEBERG, L.H. ET AL. 2003. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301: p.1211-1216.
- RIESEBERG, L.H., AND S.E. CARNEY. 1998. Tansley Review No. 102 Plant hybridization. *New Phytologist* 140: p.599-624.
- RIESEBERG, L.H., AND N.C. ELLSTRAND. 1993. What can morphological and molecular markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Sciences* 12: p.213-241.
- RIESEBERG, L.H., AND J.H. WILLIS. 2007. Plant Speciation. *Science* 317: p.910-914.
- ROBERTSON, A. ET AL. 2010. Hybridization and polyploidy as drivers of continuing evolution and speciation in *Sorbus*. *Molecular ecology* 19: p.1675-1690.
- ROBERTSON, A., A.C. NEWTON, AND R.A. ENNOS. 2004a. Breeding systems and continuing evolution in the endemic *Sorbus* taxa on Arran. *Heredity* 93: p.487-495.
- ROBERTSON, A., A.C. NEWTON, AND R.A. ENNOS. 2004b. Multiple hybrid origins, genetic diversity and population genetic structure of two endemic *Sorbus* taxa on the Isle of Arran, Scotland. *Molecular Ecology* 13: p.123-134.
- ROBERTSON, K.R., J.B. PHIPPS, J.R. ROHRER, AND P.G. SMITH. 1991. A Synopsis of Genera in Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany* 16: p.376-394.
- SAVIDAN, Y., AND J. PERNÈS. 1982. Diploid-Tetraploid-Dihaploid Cycles and the Evolution of *Panicum maximum* Jacq. *Evolution* 36: p.596-600.
- SAVIDAN, Y.H. 2000. Apomixis: genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* 18: p.13-86.
- SCHNEIDER, C.A., W.S. RASBAND, AND K.W. ELICEIRI. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: p.671-675.
- SCHRANZ, M.E., L. KANTAMA, H. DE JONG, AND T. MITCHELL-OLDS. 2006. Asexual reproduction in a close relative of *Arabidopsis*: a genetic investigation of apomixis in *Boechera* (Brassicaceae). *The New phytologist* 171: p.425-438.
- SCHÖNSWETTER, P., J. SUDA, M. POPP, H. WEISS-SCHNEEWEISS, AND C. BROCHMANN. 2007. Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (Juncaceae) inferred from AFLP fingerprints, cpDNA sequences, nuclear DNA content and chromosome numbers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: p.92-103.
- SLAVÍK, B. 1998. Phytocartographical syntheses of the Czech Republic, Vol 3. Academia, Praha.
- SOLTIS, D., AND P. SOLTIS. 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in ecology and evolution* 14: p.348-352.
- SOLTIS, D.E. ET AL. 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. *American journal of botany* 96: p.336-48.
- SOLTIS, D.E., P.S. SOLTIS, AND J. A. TATE. 2003. Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist* 161: p.173-191.
- STEBBINS, G.L. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edward Arnold (Publishers), London.
- STEJSKAL, R. 2009. Lesní pastva. *Ochrana a péče o území, NP Podyjí*. Available at: <http://www.nppodyji.cz/pastva-1> [Accessed May 1, 2015].
- STRANDHEDE, S.-O. 1965. Chromosome studies in *Eleocharis*, subser. *Palustres*. *Hereditas* 53: p.47-62.



- SUDA, J. 2009. Darwinova “odporná záhada” po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí kryptosemenných rostlin? *Živa* 5: p.204-208.
- SUDA, J., AND P. TRÁVNÍČEK. 2006. Reliable DNA Ploidy Determination in Dehydrated Tissues of Vascular Plants by DAPI Flow Cytometry — New Prospects for Plant Research. *Cyometry Part A* 69: p.273-280.
- TALENT, N., AND T.A. DICKINSON. 2007. Endosperm formation in aposporous *Crataegus* (Rosaceae, Spiraeoideae, tribe Pyreae): parallels to Ranunculaceae and Poaceae. *New Phytologist* 173: p.231-249.
- TALENT, N., AND T.A. DICKINSON. 2005. Polyploidy in *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Maloideae): evolutionary inferences from flow cytometry of nuclear DNA amounts. *Canadian Journal of Botany* 83: p.1268-1304.
- TEAM, R.C. 2013. R: A language and environment for statistical computing.
- THOMPSON, J.N., S.L. NUISMER, AND K. MERG. 2004. Plant polyploidy and the evolutionary ecology of plant/animal interactions. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: p.511-519.
- UNGERER, M.C., S.J. BAIRD, J. PAN, AND L.H. RIESEBERG. 1998. Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: p.11757-11762.
- URBANSKA, K.M. 1994. Pollen, Mating and Paternity in Angiospermous Angiosperms. *Plant Species Biology* 9: p.57-67.
- VELEBIL, J. 2012. *Sorbus omissa*, a new endemic hybridogenous species from the lower Vltava river valley. *Preslia* 84: p.375–390.
- VÍT, P. 2006. Variabilita endemických zástupců rodu *Sorbus* L. v ČR: morfometrické, karyologické a molekulární zhodnocení. Univerzita Karlova v Praze.
- VÍT, P., M. LEPŠÍ, AND P. LEPŠÍ. 2012. There is no diploid apomict among Czech *Sorbus* species: a biosystematic revision of *S. eximia* and discovery of *S. barrandienica*. *Preslia* 84: p.71–96.
- VÍT, P., AND J. SUDA. 2006. Endemické jeřáby - perly mezi českými dřevinami. *Živa* 6: p.251-255.
- WANG, Y., A.K. JHA, R. CHEN, J.H. DOONAN, AND M. YANG. 2010. Polyploidy-Associated Genomic Instability in *Arabidopsis thaliana*. *Genesis* 48: p.254-263.
- WARBURG, E.F., AND Z.E. KÁRPÁTI. 1968. *Sorbus* L. In T. G. Tutin et al. [eds.], *Flora Europaea*, Vol.2, Rosaceae to Umbelliferae, 67-70. Cambridge University Press, Cambridge.
- WEIR, B.S., AND C.C. COCKERHAM. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38: p.1358-1370.
- DE WET, J.M.J. 1968. Diploid-tetraploid-haploid cycles and the origin of variability in *Dichanthium agamospecies*. *Evolution* 22: p.394-397.
- DE WET, J.M.J., AND J.R. HARLAN. 1970. Apomixis, Polyploidy, and Speciation in *Dichanthium*. *Evoluti* 24: p.270-277.
- WHITTON, J., C.J. SEARS, E.J. BAACK, AND S.P. OTTO. 2008. The Dynamic Nature of Apomixis in the Angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 169: p.169-182.
- WISSEMANN, V. 2007. Plant evolution by means of hybridization. *Systematics and Biodiversity* 5: p.243-253.
- ZAHN, K. 1921. *Hieracium* L. In H. G. A. Engler [ed.], *Das Pflanzenreich: Regni vegetabilis conspectus*. IV, 280, Compositae - Hieracium. Band 76, 1-32. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- ZAHN, K. 1922. *Hieracium* L. subg. *Stenotheca*, *Mandonia*. In H. G. A. Engler [ed.], *Das Pflanzenreich: Regni vegetabilis conspectus*. IV, 280, Compositae - Hieracium. Band 79, 1070-1082. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- ZAHN, K. 1923. *Hieracium* L. subgen. *Pilosella*. In H. G. A. Engler [ed.], *Das Pflanzenreich: Regni vegetabilis conspectus*. IV, 280, Compositae - Hieracium. Band 82, 1148-1195. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- ŠEFL, J. 2007. Jeřáby na Podyjí. *Thayensia* 7: p.121-151.
- ŠEFL, J. 2003. Taxony rodu *Sorbus* L. v NP Podyjí. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně.
- ŠTURMA, J. 2012. Jak daleko doletí včela? Rozhovor s Ing.Šturmou o medu a všem okolo. *duchna.cz*. Available at: <http://www.duchna.cz/zdravi-plus/jak-daleko-doleti-vcela-rozhovor-s-ing.sturmou-o-medu-a-vsem-okolo/3-9-377-380-13> [Accessed April 30, 2015].

## 8. | Přílohy

### **PŘÍLOHA 1:**

**Výjimky udělené správami CHKO Český Kras, NP Podyjí a NP Thayatal**



Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky  
**SPRÁVA CHRÁNĚNÉ KRAJINNÉ OBLASTI  
ČESKÝ KRAS**

267 18 Karlštejn 85  
telefon: 311 681 713  
311 681 023  
[ceskras@nature.cz](mailto:ceskras@nature.cz)  
ID DS: ffydyjp

**dle rozdělovníku**

NAŠE ČÍSLO JEDNACÍ 01161/CK/2013  
SPISOVÁ ZNAČKA S/00792/CK/2013

VYŘIZUJE Mottl

V KARLŠTEJNĚ DNE 28. června 2013

**Věc:** udělení výjimky ze zákazů uvedených v § 29 písm. d), i) a § 34 písm. e) zákona o ochraně přírody a krajiny

**Správa Chráněné krajinné oblasti Český kras** (dále jen „Správa CHKO“), jako příslušný orgán státní správy ochrany přírody a krajiny příslušný podle ustanovení § 78 odst. 1 a § 78 odst. 2 písm. l) zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny v platném znění (dále jen „zákon“) a provedeného správního řízení podle zákona č. 500/2004 Sb., správního řádu (dále jen „správní řád“), vydává toto

## ROZHODNUTÍ

### Výrok:

Fyzickým osobám Tomáši Urfusovi, nar. 8.8.1981, bytem Erbenova 2109, 272 01 Kladno, Janě Bílé, nar. 1.6.1990, bytem Řípská 215, 277 42 Obříství a Petru Vítovi, nar. 15.10.1980, bytem Janáčkova 21, 350 02 Cheb, se podle § 43 odst. 3 zákona **uděluje výjimka** ze zákazů uvedených v § 29 písm. d), a písm. i) zákona č. 114/1992 Sb., tj. **vstupovat mimo cesty** vyznačené se souhlasem orgánu ochrany přírody **do národních přírodních rezervací Karlštejn a Koda a sbírat zde rostliny** a ze zákazu uvedeného v § 34 písm. e) **sbírat rostliny na území přírodní rezervace Voškov**. Výjimka se uděluje za účelem výzkumu variability zástupců *Sorbus aria agg.* (jeřábu muku) a odvozených hybridogenních taxonů

**Výjimka se uděluje na období do 31.12.2015.**

Za použití § 66 zákona Správa CHKO stanovuje pro provádění povolované činnosti následující podmínky:

- 1) Odběr vzorků bude omezen na celkem 5 listů a 15 plodů z každého jednoho jedince ze zástupců *Sorbus aria agg.*
- 2) Odběr vzorků bude předem projednán se Správou, tak aby byly zachovány přírodní hodnoty uvedených přírodních a národních přírodních rezervací.
- 3) Správě bude po ukončení výzkumu do 31.5.2016 předána souhrnná zpráva o výsledcích výzkumu. Tato zpráva bude rovněž ve shodném termínu doručena Ústřednímu seznamu ochrany přírody při pracovišti ústředí Agentury ochrany přírody a krajiny v Praze.

### **Odůvodnění:**

Správa CHKO obdržela dne 6. května 2013 pod č.j. 00792/CK/2013 žádost fyzických osob: Tomáš Urfuse, nar. 8.8.1981, bytem Erbenova 2109, 272 01 Kladno, Jany Bílé, nar. 1.6.1990, bytem Řípská 215, 277 42 Obříství a Petra Víta, nar. 15.10.1980, bytem Janáčkova 21, 350 02 Cheb, týkající se udělení výjimky ze zákazů uvedených v § 29 písm. d), a písm. i) zákona č. 114/1992 Sb., tj. vstupovat mimo cesty vyznačené se souhlasem orgánu ochrany přírody do národních přírodních rezervací Karlštejn a Koda a sbírat zde rostliny a ze zákazu uvedeného v § 34 písm. e) sbírat rostliny na území přírodní rezervace Voškov.

Správní řízení bylo zahájeno dnem podání žádosti tj. 6. května 2013. Správa oznámila účastníkům řízení zahájení správního řízení a zároveň oznámila zahájení správního řízení občanským sdružením, které u Správy požádaly o předběžné informování o zahajovaných správních řízeních. Spolu s oznámením o zahajovaném řízení určila Správa dle ustanovení § 36 odst. 1, ve spojení s ustanovením § 39 odst. 1 správního řádu přiměřenou 10 denní lhůtu od doručení oznámení o zahajovaném řízení ve které mohli uplatnit účastníci řízení námítky či připomínky. Žádné občanské sdružení se v zákonné lhůtě 8 dnů (§ 70 odst. 3 zákona) od doručení oznámení nepřihlásilo jako účastník řízení. Účastníci řízení ve stanovené 10 denní lhůtě od doručení oznámení nepodalí žádné námítky ani připomínky.

Žádost byla odůvodněna probíhajícím výzkumem variability zástupců *Sorbus aria agg.* (jeřábu muku) a odvozených hybridogenních taxonů. Získané informace o konkrétní výskytu a rozšíření jedinců a populací zástupců *Sorbus aria agg.* mohou napomoci praktické ochraně přírody. Vzhledem k omezením daným v podmínkách rozhodnutí, lze vyloučit poškození biotopů i zkoumaných jedinců.

Správa CHKO dospěla k názoru, že povolovaná činnost je v zájmu ochrany přírody, tak jak je uvedeno § 43 odst. 3 a z tohoto důvodu byla výjimka udělena.

### **Poučení o odvolání:**

Proti tomuto rozhodnutí se lze podle § 81 odst. 1 správního řádu do patnácti dnů ode dne jeho doručení odvolat k Ministerstvu životního prostředí, a to podáním učiněným u Správy CHKO. V případě, že písemnost bude uložena u provozovatele poštovních služeb, lhůta pro podání odvolání se počítá ode dne převzetí rozhodnutí, nejpozději však od desátého dne ode dne jejího uložení. Dle § 82 odst. 2 správního řádu se odvolání podává s potřebným počtem stejnopisů tak, aby jeden stejnopis zůstal správnímu orgánu a aby každý účastník řízení dostal jeden stejnopis. Nepodá-li účastník potřebný počet stejnopisů, vyhotoví je správní orgán na náklady účastníka.



Ing. Michal Slezák  
VEDOUcí SPRÁVY CHKO



# SPRÁVA NÁRODNÍHO PARKU PODYJÍ

NA VYHLÍDCE 5, 669 01 ZNOJMO

SPISOVÁ ZNAČKA: SZ NPP 0569/2013/3  
ČÍSLO JEDNACÍ: NPP 0982/2013  
OPRÁVNĚNÁ ÚŘEDNÍ OSOBA: Valášek

DATUM: 7.8.2013  
TELEFON: 515 282 245  
E-MAIL: valasek@nppodyji.cz

## ROZHODNUTÍ

Správa Národního parku Podyjí (dále jen „Správa NP Podyjí“) jako příslušný orgán ochrany přírody dle ustanovení § 75 odst. 1 písm. e) zákona ČNR č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, v platném znění (dále jen „zákon 114/1992 Sb.“), vykonávající státní správu v ochraně přírody a krajiny (§ 75 odst. 2 zákona 114/1992 Sb.) na území Národního parku Podyjí (dále jen „NP Podyjí“) a jeho ochranného pásma po provedeném řízení, podle čl. 6 Návštěvního řádu NP Podyjí vydaného vyhl. č. 22/95, v souladu s § 19 odst. 1 zákona 114/1992 Sb. a v souladu s usnesením vlády č. 535 ze dne 10.5.2006 a §§ 67-74 souvisejícího zákona č. 500/2004, správní řád, v platném znění (dále jen „správní řád“)

### uděluje výjimku

**dle § 43 zákona 114/1992 Sb.** ze základních ochranných podmínek, konkrétně ze zákazu dle § 16 odst. 1 písm. d) (vjíždět a setrvávat s motorovými vozidly mimo silnice a místní komunikace a místa vyhrazená se souhlasem orgánu ochrany přírody), dle § 16 odst. 1 písm. g) (zákaz odchyty živočichů a sběru rostlin) a dle § 16 odst. 2 písm. b) (vstupovat mimo cesty vyznačené se souhlasem orgánu ochrany přírody)

### pro žadatele

Tomáše Urfuse, Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Benátská 2, 128 01 Praha 2, pro účely výzkumu *Sorbus aria* agg. (jeřáb muk) na území Národního parku Podyjí v letech 2013–2016

### při splnění těchto závazných podmínek:

1. Při provádění výzkumu, zejména při sběru vzorků, nebudou používány metody poškozující přírodní prostředí. Při výzkumu bude využíváno nedestruktivních metod. Odebíráno bude pouze takové množství biomasy, které je nezbytné pro další zpracování a to takovým způsobem, aby neohrozilo stávající populace druhů.
2. Veškeré terénní aktivity oznámí žadatel nejdříve 5 dní, nejpozději 1 den předem Správě NP Podyjí.
3. Aktivity v terénu, prováděné po 18. hodině večerní, budou nejdříve 5 dní, nejpozději 1 den předem oznámeny lesníkovi příslušnému pro daný lesnický úsek.

4. Při provádění průzkumu je možno vstupovat na celé území NP Podyjí a jeho ochranného pásma.
5. Výzkumné aktivity v tzv. klidových oblastech budou prováděny výhradně po předchozí konzultaci se Správou NP Podyjí tak, aby nebylo narušováno posláním a režim klidových oblastí. Mapy se zákresem klidových oblastí jsou v příloze tohoto rozhodnutí.
6. Toto povolení nenahrazuje souhlasy majitelů a nájemců dotčených pozemků. Ke vstupu na tyto pozemky je nutný jejich předchozí souhlas.
7. Vjezd na území NP Podyjí a jeho ochranného pásma bude realizován pouze po zpevněných cestách a to osobním automobilem. **Formulář „Povolení k vjezdu“**, který za tímto účelem vydá Správa NP Podyjí pro konkrétní vozidlo, **musí být vždy viditelně umístěn za předním sklem**. O konkrétní „Povolení k vjezdu“ je třeba žádat zvlášť.
8. Roční zprávy o výzkumu budou zasílány Správě NP Podyjí vždy nejpozději do 31.1. následujícího roku. Správě NP Podyjí bude dále zaslána závěrečná zpráva či práce o průběhu a výsledcích mapování a monitoringu, a to nejpozději do 31.12. roku ukončení výzkumu.
9. Výjimky udělené tímto rozhodnutím jsou platné pro tyto účastníky výzkumu: Tomáš Urfus (nar. 8.8.1981), Jana Bílá (nar. 1.6.1990), Petr Vít (nar. 15.10.1980), Věra Bílá (nar. 5.6.1964), Ondřej Nosek (nar. 30.4.1990).
10. Toto rozhodnutí platí do 31.12.2016.

### Odůvodnění:

Správa NP Podyjí projednala žádost, kterou žadatel požádal o udělení výjimek k realizaci výzkumné druhy *Sorbus aria* agg. na území Národního parku Podyjí v letech 2013–2016. Cílem výzkumu je (1) zhodnotit mikroevoluční dynamiku na úrovni cytogeografie, (2) testovat reprodukční způsoby jednotlivých cytotypů, (3) stanovit míru vnitropopulační a mezipopulační genetické variability a (4) určit míru recentní hybridizace. Výsledky výzkumu budou významným přínosem pro přírodovědné poznání nejen NP Podyjí a mohou být do budoucna využity jako podklady pro účely ochrany přírody, péči o jednotlivé složky přírody i pro další výzkum.

V rámci výzkumu budou pro účely analýz uskutečněny pouze nejnútnejší odběry, a to vždy s ohledem na aktuální stav exempláře (5 listů a 15 plodů na jeden zkoumaný exemplář). Odběr listů bude uskutečněn vždy počátkem léta (období konce června a začátku července), odběr malvic pak vždy koncem léta (období konce srpna a v průběhu září).

Správa NP Podyjí posoudila žádost z hlediska potřeby a použitelnosti potenciálních výsledků výzkumu. Získaná data mohou sloužit ke zlepšení péče o území, k efektivnější ochraně cenných lokalit a přispějí k lepší dokumentaci hodnot území a zhodnocení trendů vývoje.

Na základě provedeného správního řízení bylo zjištěno, že žadatel splňuje podmínky pro povolení všech výjimek v rámci výzkumné činnosti na území NP Podyjí.

Tímto rozhodnutím, které se vydává v souladu se zákonem 114/1992 Sb., nejsou nikterak dotčena ani omezena práva a povinnosti dle jiných všeobecně závazných právních předpisů.

Z uvedených důvodů bylo rozhodnuto tak, jak je uvedeno ve výroku.

**Poučení o odvolání:**

Proti tomuto rozhodnutí může účastník řízení podat podle ustanovení §§ 81-93 správního řádu odvolání ve lhůtě **15 dnů ode dne jeho oznámení** k Ministerstvu životního prostředí, a to podáním učiněným u Správy NP Podyjí, Na Vyhlídce 5, 669 01 Znojmo. Lhůta pro podání odvolání se počítá ode dne následujícího po doručení písemného vyhotovení rozhodnutí, nejpozději však po uplynutí desátého dne od uložení nedoručené zásilky.

Odvolání musí mít náležitosti uvedené v § 37 odst. 2 správního řádu, musí obsahovat údaje o tom, proti kterému rozhodnutí směřuje, v jakém rozsahu ho napadá a v čem je spatřován rozpor s právními předpisy nebo nesprávnost rozhodnutí nebo řízení, jež mu předcházelo. Odvolání se podává s potřebným počtem stejnopisů tak, aby jeden stejnopis zůstal správnímu orgánu a aby každý účastník dostal jeden stejnopis. Nepodá-li účastník potřebný počet stejnopisů, vyhotoví je správní orgán na náklady účastníka.

Odvolání jen proti odůvodnění rozhodnutí je podle ustanovení § 82 odst. 1 správního řádu nepřipustné. Podané odvolání má podle § 85 odst. 1 správního řádu odkladný účinek.



*V. Z. K. R. K.*  
Ing. Tomáš Rothrockl  
ředitel

*Příloha (obdrží pouze žadatel):*

- mapy tzv. klidových oblastí (3 strany)

*Toto rozhodnutí obdrží:*

- Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Tomáš Urfus, Benátská 2, 128 01 Praha 2
- Obec Podmolí, Podmolí, 669 02 Znojmo (DS)
- Obec Hnanice, 669 02 Znojmo (DS)
- Městys Lukov, Lukov 3, 669 02 Znojmo (DS)
- Obec Havraníky, Havraníky 133, 669 02 Znojmo (DS)
- Obec Podmyče, Podmyče, 671 06 Šafov (DS)
- Obec Nový Šaldorf - Sedlešovice, Nový Šaldorf, 671 81 Znojmo 5 (DS)
- Město Znojmo, Obroková 10-12, 669 02 Znojmo (obdrží odbor životního prostředí Městského úřadu Znojmo) (DS)
- Obec Mašovice, Mašovice, 669 02 Znojmo (DS)
- Městys Vranov nad Dyjí, Náměstí 21, 671 03 Vranov nad Dyjí (DS)
- Obec Horní Břečkov, Horní Břečkov, 671 02 Šumná (DS)
- Obec Lesná, Lesná, 671 02 Šumná (DS)
- Obec Onšov, Onšov, 671 02 Šumná (DS)



Amt der Niederösterreichischen Landesregierung, 3109

Frau  
Jana Bila  
Univerzita Karlova V Praze  
Katedra botaniky  
Benatska 2  
12801 Praha  
TSCHECHIEN

Beilagen

**RU5-BE-747/002-2014**

Kennzeichen (bei Antwort bitte angeben)

E-Mail: [post.ru5@noel.gv.at](mailto:post.ru5@noel.gv.at) - Telefax 02742/9005/15220  
Internet: <http://www.noel.gv.at> DVR: 0059986  
Bürgerservice-Telefon 02742/9005-9005

Bezug	BearbeiterIn	(0 27 42) 9005 Durchwahl	Datum
	Karin Altinger-Probst	15215	10. Juni 2014

Betrifft

Univerzita Karlova Z Praze, 12843 Praha, Ansuchen um Ausnahmegenehmigung gemäß §§ 5 und 6 NÖ Nationalparkgesetz; Bescheid

### Bescheid

Über Ihren Antrag vom 28. März 2014 um Erteilung einer Ausnahmegenehmigung zur Begehung des Nationalparks abseits der markierten Wege im Nationalpark Thayatal sowie das Sammeln von Blättern und Früchten der Gattung *Sorbus* L. (Mehlbeere) zum Zwecke der Forschung für den Zeitraum von 2014 bis 2017 für 2 Personen wird wie folgt entschieden:

### Spruch

Frau Jana Bila wird die Ausnahmegenehmigung zur Begehung des Nationalparks abseits der markierten Wege im Nationalpark Thayatal sowie die Sammelgenehmigung von drei Blättern für die morphologische Analyse, von einem Blatt für die zytometrische Analyse, ca. 1 cm<sup>2</sup> Blattfläche für die molekulare Analyse und von fünfzehn Früchten für die Untersuchung der Reproduktionsart mit Durchflusszytometrie (FCSS) von *Sorbus* L. (Mehlbeere) für den Zeitraum von 2014 bis 2017 für 2 Personen erteilt, wobei folgende Auflagen einzuhalten sind:

1. Vor Beginn der Sammeltätigkeiten ist mit der Nationalparkverwaltung das Einverständnis herzustellen.
2. Blätter und Früchte dürfen nur im angegebenen Ausmaß entnommen werden.



3. Das Verlassen der Wege ist nur im unbedingt erforderlichen Ausmaß zulässig.
4. Der Nationalparkverwaltung ist jährlich ein Bericht über die Ergebnisse ihrer Arbeiten vorzulegen.
5. Die Sammeltätigkeiten sind mit 31. Dezember 2017 zu befristen.

Rechtsgrundlagen:

§ 5 Abs. 4 und § 6 Abs. 4 NÖ Nationalparkgesetz, LGBl. 5505.

Begründung

Frau Jana Bila hat mit Schreiben vom 28. März 2014 einen Antrag um Erteilung einer Ausnahmegenehmigung zur Begehung des Nationalparks Thayatal abseits der markierten Wege sowie zum Sammeln von Blättern und Früchten der Gattung Sorbus L. (Mehlbeere) zum Zwecke der Forschung für den Zeitraum von 2014 bis 2017 für 2 Personen gestellt.

Die Regelungen zur Naturzone in § 5 NÖ Nationalparkgesetz sehen vor, dass hier prinzipiell jeder Eingriff in die Natur und in den Naturhaushalt sowie jede Beeinträchtigung des Landschaftsbilds verboten ist. Ex lege Ausnahmen von diesem Verbot bestehen unter anderem für Organe der Nationalparkverwaltung zur Erfüllung der ihnen gesetzlich übertragenen Aufgaben sowie für Besucher zum Begehen der für sie bestimmten Wege. Weitere Ausnahmen sind zuzulassen, soweit dies mit den Zielen des Nationalparks nicht im Widerspruch steht oder nachteilige Auswirkungen auf den Nationalpark durch Vorschreibung von Vorkehrungen weitgehend ausgeschlossen werden können.

In der Naturzone mit Managementmaßnahmen - § 6 NÖ Nationalparkgesetz - bestehen zusätzlich ex lege Ausnahmen von dem in dieser Zone ebenfalls festgelegten grundsätzlichen Eingriffsverbot, auch hier sind weitere Ausnahmen insbesondere für Zwecke der wissenschaftlichen Forschung bescheidenmäßig zuzulassen.

Die Behörde holte im Rahmen des Ermittlungsverfahrens ein Gutachten einer Naturschutzsachverständigen ein. Dieses Gutachten vom 20. Mai 2014 lautet wie folgt:

„Mit Schreiben vom 04. April 2014 ersucht die Naturschutzabteilung um Stellungnahme zu den Anträgen von Frau Jana Bila für eine Sammelbewilligung gemäß § 20 Abs. 4 NÖ NSchG 2000 und zur Ausnahmegenehmigung vom Eingriffsverbot im Nationalpark gemäß §§ 5 und 6 NÖ Nationalparkgesetz.

Sachverhalt

Frau Jana Bila sucht um Ausnahmegenehmigung zur Begehung des Nationalparks Thayatal abseits der markierten Wege und um Sammelgenehmigung von drei Blättern für die morphologische Analyse, von einem Blatt für die zytometrische Analyse, ca. 1 cm<sup>2</sup> Blattfläche für die molekulare Analyse und von fünfzehn Früchten für die Untersuchung der Reproduktionsart mit Durchflusszytometrie (FCSS) von Sorbus L. (Mehlbeere) an. Die

Bewilligung wird für den Zeitraum von 2014 - 2017 für 2 Personen beantragt. Im Zuge des Projektes soll die morphologische, karyologische und genetische Variabilität der Vertreter *Sorbus aria* agg. (echte Mehlbeere, *S. aria* s.str., *S. danubialis* und daraus entstandene hybride Taxa) untersucht werden. Ziel des Projektes ist die Beschreibung der Dynamik der Arten südöstlich von Hardegg aus mikroevolutionistischer Sicht. Das Projekt ist die zweite Phase der taxonomischen Forschungen von M. Lepsi und P. Lepsi.

### Gutachterliche Stellungnahme

Die Sammeltätigkeiten, die im Nationalpark durchgeführt werden, sind besonders natur-schonend auszuführen. Um Störwirkungen auf die Tierwelt hintanzuhalten und die Artenvielfalt der in diesem Bereich vorhandenen Ökosysteme zu erhalten, dürfen die Wege nur im unbedingt notwendigen Ausmaß verlassen werden. Weiters dürfen die Blätter und Früchte nur im angegebenen Ausmaß entnommen werden. Da die Arbeiten dem Zwecke der Forschung dienen sollen, ist jährlich der Nationalparkverwaltung ein Bericht über die Ergebnisse vorzulegen.

Bei Einhaltung der nachstehenden Auflagen, kann für das gegenständliche Vorhaben aus naturschutzfachlicher Sicht sowohl eine Sammelbewilligung nach § 20 Abs. 4 NÖ NSchG 2000 als auch eine Ausnahmegenehmigung vom Eingriffsverbot im Nationalpark gemäß §§ 5 und 6 NÖ Nationalparkgesetz erteilt werden, da die Blätter und Früchte nur in sehr geringem Ausmaß entnommen werden und für Forschungszwecke herangezogen werden sollen, und die Tätigkeiten den Zielen des Nationalparks nicht widersprechen.

### Auflagen

1. Vor Beginn der Sammeltätigkeiten ist mit der Nationalparkverwaltung das Einvernehmen herzustellen.
2. Blätter und Früchte dürfen nur im angegebenen Ausmaß entnommen werden.
3. Das Verlassen der Wege ist nur im unbedingt erforderlichen Ausmaß zulässig.
4. Der Nationalparkverwaltung ist jährlich ein Bericht über die Ergebnisse ihrer Arbeiten vorzulegen.
5. Die Sammeltätigkeiten sind mit 31. Dezember 2017 zu befristen.“

Im Rahmen des Parteiengehörs wurde dieses Gutachten mit Schreiben vom 22. Mai 2014 der Antragstellerin, der NÖ Umweltschutzbehörde und der Nationalpark Thayatal GmbH zur Kenntnis gebracht und Gelegenheit zur Stellungnahme gegeben.

Die NÖ Umweltschutzbehörde erhob mit Schreiben vom 22. Mai 2014 gegen das genannte Vorhaben keinen Einwand, sofern die von der Sachverständigen vorgeschlagenen Auflagen im Spruch des Bescheides aufgenommen werden.

Aufgrund des festgestellten Sachverhaltes und des eingeholten Gutachtens der Amtssachverständigen für Naturschutz gelangte die Behörde zur Ansicht, dass die Ausnahmegenehmigung zur Begehung des Nationalparks abseits der markierten Wege im Nationalpark Thayatal sowie das Sammeln von Blätter und Früchten der Gattung *Sorbus* L. (Mehlbeere) zum Zwecke der Forschung für den Zeitraum von 2014 bis 2017 für 2 Personen zu erteilen war.

### Rechtsmittelbelehrung

Sie haben das Recht gegen diesen Bescheid **Beschwerde** zu erheben.

Die Beschwerde ist innerhalb von **vier Wochen** nach Zustellung dieses Bescheides **schriftlich oder in jeder anderen technisch möglichen Weise beim Amt der NÖ Landesregierung, Abteilung Naturschutz, einzubringen**.

Sie hat den Bescheid, gegen den sie sich richtet, und die Behörde, die den Bescheid erlassen hat, zu bezeichnen. Weiters hat die Beschwerde die Gründe, auf die sich die Behauptung der Rechtswidrigkeit stützt, das Begehren und die Angaben, die erforderlich sind, um zu beurteilen, ob die Beschwerde rechtzeitig eingebracht ist, zu enthalten.

Die Gebühr für die Beschwerde beträgt € 14,30.

Ergeht an:

1. NÖ Umweltschutz, Wiener Straße 54, 3109 St. Pölten
2. Nationalpark Thayatal GmbH Nationalparkhaus, 2082 Hardegg zur Kenntnis.
3. BD2 Sekretariat Naturschutz, z.H. Frau Dr. Christina Wanivenhaus zur Kenntnis zu BD2-N-560/019-2011.

NÖ Landesregierung  
Im Auftrag  
Mag. H i e s b e r g e r



Dieses Schriftstück wurde amtssigniert.  
Hinweise finden Sie unter:  
[www.noel.gv.at/amtssignatur](http://www.noel.gv.at/amtssignatur)

## PŘÍLOHA 2:

LEPŠÍ, M., P. LEPŠÍ, P. KOUTECKÝ, J. BÍLÁ, AND P. VÍT. IN PRESS.: Taxonomic revision of *Sorbus* subgenus *Aria* in the Czech Republic. *Preslia*.

### Taxonomic revision of *Sorbus* subgenus *Aria* in the Czech Republic

Taxonomická revize jeřábů z podrodu *Aria* v České republice

Martin Lepší<sup>1,2</sup>, Petr Lepší<sup>3</sup>, Petr Koutecký<sup>2</sup>, Jana Bílá<sup>4</sup> & Petr Vít<sup>5</sup>

<sup>1</sup>South Bohemian Museum in České Budějovice, Dukelská 1, CZ-370 51 České Budějovice, Czech Republic, e-mail: lepsi@muzeumcb.cz; <sup>2</sup>Department of Botany, Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, CZ-370 05 České Budějovice, Czech Republic, e-mail: lepsi@seznam.cz, kouta@prf.jcu.cz; <sup>3</sup>AOPK ČR, Administration of the Blanský les Protected Landscape Area, Vyšný 59, CZ-381 01 Český Krumlov, Czech Republic, e-mail: plepsi@seznam.cz; <sup>4</sup>Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague, Benátská 2, CZ-128 01 Prague, Czech Republic, e-mail: Bila.Jana@seznam.cz.; <sup>5</sup>Institute of Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, CZ-252 43 Průhonice, Czech Republic, e-mail: vit@natur.cuni.cz

#### Abstract

Results of a taxonomic revision of subg. *Aria* in the Czech Republic are presented in the Central European context. Flow cytometry and multivariate morphological analyses were employed to assess the taxonomic diversity within the group. Diploid, triploid and tetraploid taxa were detected. Diploids are represented by a single species, *Sorbus aria*, which exhibits high morphological variability. This extensive variability is specific to this species and separates it, among other characters, from polyploid taxa. An epitype for *S. aria* is designated here. In the Czech Republic, *S. aria* has been recorded only in southern Moravia, and published records from Bohemia relate to other polyploid taxa of subg. *Aria*. Native occurrences previously recorded for *S. austriaca* and *S. carpatica* in the Czech Republic are erroneous and relate to individuals of *S. aria* with lobed leaves. Three new triploid species are described – *S. cucullifera* M. Lepší et P. Lepší from the Podyjí/Thaytal National Park between the towns of Znojmo and Vranov nad Dyjí, and *S. moravica* M. Lepší et P. Lepší and *S. pontis-satani* M. Lepší et P. Lepší from the Moravian Karst near the city of Brno. Tetraploid taxa include *S. danubialis* and two newly distinguished taxa – *S. thayensis* M. Lepší et P. Lepší and *S. collina* M. Lepší, P. Lepší et N. Meyer. *Sorbus thayensis* is endemic to the Podyjí/Thayatal National Park and shows just as triploid species minimal morphological variability, which indicates that these polyploid taxa have an apomictic mode of reproduction. All these new species are assumed to have originated from interbreeding between *S. danubialis* and *S. aria*. Up until now, *Sorbus collina* has been referred to as *S. aria* in the Czech Republic, as *S. pannonica* in Germany and as *S. graeca* in Austria and Hungary. Records referred to *S. graeca* in southern Moravia (Czech Republic) do not belong to *S. collina*, but were found to be untypical individuals of *S. danubialis*. In the Czech Republic, *S. collina* occurs in central and north-western Bohemia. *Sorbus danubialis* is confined to central and north-western Bohemia and southern Moravia, and shows taxonomically insignificant variability. Old records about the existence of diploid individuals of *S. danubialis* in Bohemia have been proven incorrect. Detailed distribution maps for all stenoendemics, photographs of the new species' type specimens and line drawings of all polyploid species known from the Czech Republic are presented.

**K e y w o r d s:** apomixis, DAPI flow cytometry, hybridisation, multivariate morphometrics, *Rosaceae*, subg. *Aria*, taxonomy