

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



**Jakub Hojka**

Má ekologický gradient vliv na introgresi a její evoluční důsledky v rodu *Arabidopsis*?

Is there any influence of ecological gradient on the introgression and its evolutionary consequences in the genus *Arabidopsis*?

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Karol Marhold, CSc.

Praha, 2016



**Prohlášení:**

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

V Praze, 12. 5. 2016

Podpis

## **Poděkování**

V první řadě bych velmi rád poděkoval svému školiteli, Karolovi Marholdovi, za všechnu pomoc, kterou mi poskytl při psaní této práce, a také za jeho neutuchající podporu mého botanického směřování. Dále děkuji všem členům týmu *Arabidopsis* za jejich cenné rady i pomoc při sběru a zpracování materiálu pro mou diplomovou práci – jmenovitě Roswithě Schmickl za četné konzultace ohledně introgresní lokality v Rakousku a Gabriele Fuxové za oddanou pomoc s administrativními a organizačními záležitostmi. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům, za podporu i toleranci, které bylo zejména v době před odevzdáním této práce častokrát zapotřebí.

## Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	7
1. Úvod.....	7
2. Obecná část.....	2
2. 1. Hybridizace.....	2
2. 1. 1. Hybridizace v kontextu ekologických gradientů.....	3
2. 1. 2. <i>Senecio ovatus</i> a <i>S. germanicus</i> .....	4
2. 2. Polyploidizace.....	5
2. 2. 1. Autopolyploidizace.....	6
2. 2. 2. Polyploidizace v kontextu ekologických gradientů.....	7
2. 2. 3. <i>Cardamine amara</i> .....	8
2. 2. 4. <i>Senecio jacobaea</i> .....	9
2. 2. 5. Stručná metodika studia polyploidních komplexů.....	9
2. 2. 6. Polyploidizace a hybridizace (allopolyploidizace).....	10
2. 3. Introgrese.....	11
2. 3. 1. Fenotypická plasticita.....	12
2. 3. 2. Introgrese v kontextu ekologických gradientů.....	13
2. 3. 3. <i>Senecio carniolicus</i> .....	13
2. 4. Modelování klimatických parametrů (Ekologické modelování).....	14
2. 4. 1. Indikátorové hodnoty.....	14
2. 4. 2. Klimatické databáze.....	15
2. 4. 3. <i>Ranunculus kuepferi</i> .....	15
2. 4. 4. <i>Cardamine amara</i> .....	16
3. Představení modelového rodu <i>Arabidopsis</i> .....	17
3. 1. <i>Arabidopsis arenosa</i> .....	18
3. 2. <i>Arabidopsis lyrata</i> .....	19
3. 3. <i>Arabidopsis halleri</i> .....	20
3. 4. <i>Arabidopsis kamchatica</i> .....	22
3. 5. <i>Arabidopsis suecica</i> .....	23
3. 6. Introgresní zóna styku druhů <i>Arabidopsis arenosa</i> a <i>A. lyrata</i> .....	24
3. 6. 1. Hybridní zóny.....	24
3. 6. 2. Introgresní zóny druhů <i>A. arenosa</i> a <i>A. petraea</i> (= <i>A. lyrata</i> subsp. <i>petraea</i> ) ve střední Evropě.....	26
4. Praktická část.....	28
4. 1. Stručný přehled navržené metodiky.....	28
4. 2. Předběžné testování některých znaků.....	29
4. 3. Otázky kladené do navazující magisterské práce.....	30

## **Abstrakt**

Hybridizace, introgrese a polyploidizace, zejména ve vzájemných kombinacích, patří k nejdůležitějším speciálním procesům u vyšších rostlin. I když jsou základní rysy těchto procesů dobře známy, jejich konkrétní projevy se u jednotlivých skupin rostlin (nebo dokonce v konkrétních jednotlivých případech) do značné míry liší a jejich detailní studium přináší zajímavé výsledky. U rodu *Arabidopsis* je známo několik případů, kdy se speciace ubírala komplikovanou cestou hybridizace a polyploidizace (např. *A. kamchatica*, *A. suecica*) ale jsou známy i příklady, kde usuzujeme na introgresivní hybridizaci (např. mezi *A. arenosa* a *A. petraea*).

Cílem bakalářské práce je zhodnotit známé případy homo- a heteroploidní introgresivní hybridizace a hybridní speciace u rodu *Arabidopsis* v kontextu podobných případů z čeledi Brassicaceae, případně i jiných čeledí vyšších rostlin.

Dalším cílem je navrhnout postup detailního studia introgresivní zóny druhů *A. arenosa* a *A. petraea* (= *A. lyrata* subsp. *petraea*) ve střední Evropě s využitím morfologických, cytometrických a molekulárních metod, včetně zhodnocení ekologických parametrů studovaných lokalit. Soubor morfologických znaků bude otestován na dostupném materiálu z okruhu *A. arenosa*, který je v současnosti experimentálně kultivován v prostorách CEITEC v Brně v rámci končícího projektu GAČR.

**Klíčová slova:** *Arabidopsis*, introgresivní hybridizace, polyploidie, Brassicaceae

## **Abstract**

Hybridization, introgression and polyploidy, especially in their combination, belong to the most important speciation processes in vascular plants. Although basic features of these processes are generally well known, their cases in particular groups of plants and concrete cases differ a lot and their studies often bring interesting results. In the genus *Arabidopsis* several cases of combined hybrid and polyploid speciation are known (e.g. *A. kamchatica*, *A. suecica*) and there are also cases where we expect introgressive hybridization (e.g. between *A. arenosa* and *A. petraea*).

The aim of the bachelor thesis is an evaluation of known cases of homo- and heteroploid introgressive hybridization and hybrid speciation in the genus *Arabidopsis* in the context of similar cases in the family Brassicaceae and perhaps also other families of vascular plants.

Next aim is to design method of detailed evaluation of the introgressive zone of *A. arenosa* and *A. petraea* (= *A. lyrata* subsp. *petraea*) in Central Europe using morphological, cytometric and molecular evidence as well as ecological parameters of studied localities. Set of morphological characters will be tested on the currently available material of *A. arenosa* that is cultivated at CEITEC Brno as part of the finalised GACR project.

**Key words:** *Arabidopsis*, introgressive hybridization, polyploidy, Brassicaceae

## 1. Úvod

Jedním z prioritních témat současné botaniky je výzkum vzniku rostlinných druhů, jejich uchycení v ekosystémech a také vztahů těchto nově vznikajících druhů s rodičovskými či blízkými příbuznými druhy. Proces vzniku nových druhů se nazývá speciace a tato je u rostlin často významně podporována procesy hybridizace a polyploidizace. Zatímco hybridizace, tedy křížení dvou druhů (poddruhů nebo cytotypů), je jevem běžným u rostlin i u živočichů (ač u živočichů má podstatně menší význam i četnost), polyploidizace, neboli celogenomová duplikace, se u živočichů téměř nevyskytuje, je jevem vzácným, či se nachází jen u určitých skupin (ryby) ač u rostlin je velmi častým a významným fenoménem.

Ani u rostlin však nenacházíme tyto fenomény rovnoměrně, u některých skupin rostlin jsou značně častější. (Stebbins, 1959).

V botanické literatuře je značná část úsilí věnována popisu těchto fenoménů, včetně odhalování ekologicko-evolučních kontextů jejich působení. Zajímavé otázky následné propagace či stabilizace nově vzniklých hybridních linií nabízejí řadu zajímavých aplikací do zemědělství či ochrany životního prostředí.

Tato předkládaná rešerše si klade za cíl zabývat se podrobněji výše zmíněnou evoluční problematikou v kontextech prostředí a areálů rozšíření, tedy v biogeografickém pohledu. Prostředí coby výslednice různých abiotických faktorů (trendy jejich rozvrstvení jsou v této práci popisovány jako ekologické gradienty) může poskytnout hybridním liniím vhodné okolnosti ke vzniku, udržení i následné propagaci (zejména cestou ekologické segregace rodičovských druhů a hybridních potomků do odlišných nik). Několik příkladů studií zabývajících se touto problematikou bude uvedeno u popisu každého studovaného fenoménu. Vybírány byly cíleně příklady z čeledi Brassicaceae, neboť se jim budu věnovat ve své navazující diplomové práci, ale uvedeny jsou i příklady z jiných čeledí. Zvláštní kapitola bude věnována popisu ekologických gradientů (klimatický gradient, gradient nadmořské výšky, apod.) a naváže na s tím související popis metodiky ekologického modelování, který má při studiu těchto gradientů klíčovou důležitost. Závěrečná kapitola bude kapitolou syntetickou, kde budou podrobněji popsány některé komplexní příklady (zahrnující předtím zmíněné fenomény v různých kombinacích) z modelového organismu mé budoucí diplomové práce, kterým je rod *Arabidopsis* L.



## 2. Obecná část

### 2. 1. Hybridizace

Hybridizace (křížení) je proces, který probíhá za situace, kdy se setkávají individua odlišných entit (těmito entitami mohou být jednotlivé, někdy i nepříbuzné druhy, případně nižší taxonomické jednotky, např. poddruhy, nebo různé cytotypy), rozmnožují se mezi sebou a vznikají potomci, označovaní jako hybridi. Existuje celá řada definic hybridizace, které často navazují na odlišné definice druhů, tato problematika však přesahuje vytyčené téma a proto budou uvedeny pouze dvě, pro účely této práce nejpodstatnější.

Taxonomické pojetí hybridizace předpokládá hybridizaci jako proces křížení jedinců patřících do dvou odlišných taxonů (např. křížením dvou druhů tak vzniká mezidruhový hybrid, křížením dvou různých rodů mezirodový hybrid, apod.). Způsoby pojmenovávání vzniklých hybridních linií jsou přesně určeny pravidly nomenklatury (McNeill et al., 2012).

Ekologická definice hybridizace definuje hybridizaci jako křížení jedinců s odlišnými adaptivními vlastnostmi, přičemž tyto jedinci patří k odděleným populacím (Stebbins, 1959). Pojmenovávání takto definovaných hybridů může být problematické, protože v tomto zjednodušeném pojetí nemusí vždy nutně jejich rodiče tvořit jasně definovatelné taxony (Stace, 1975).

Zatímco u živočichů (u savců obzvláště) bývají vznikající hybridi v řadě případů sterilní (White et al., 2012), u rostlin je situace poměrně odlišná - často vznikají fertilní hybridi, kteří se mohou dále množit mezi sebou, či se mohou křížit s rodičovskou populací (tzv. zpětné křížení), těmito cestami může postupně dojít k prosazení hybridů v rámci populace původních rodičovských druhů a dále až ke vzniku nového druhu (Stace 1975). Fertilita hybridů v přírodě se značně liší dle konkrétních podmínek a vztahu křížících se druhů, obecně ale budou hybridi vzniklí homoploidní hybridizací (viz níže) pravděpodobněji fertilní (Buerkle et al., 2000).

Je paradoxní, že představu vzniku nových druhů hybridizací zastával již Linné, jehož chápání druhů jako navzájem nezávislých konstantních jednotek vzniklých z vůle stvořitele, bylo jinak značně rigidní (Larson, 1968). Zcela zásadní význam hybridizace v procesu speciace u rostlin byl však odhalen až mnohem později spolu s odhalením souvislosti hybridizace a polyploidizace (konkrétně v procesu vzniku tzv. allopolyploidů, kdy polyploidizace následuje bezprostředně po hybridizaci; Briggs & Walters, 2001).

Heteroploidní hybridizace označuje proces křížení dvou druhů různé ploidní úrovně. Jako homoploidní hybridizace se pak označuje hybridizace dvou druhů stejné ploidní úrovně, pokud si v tomto případě počty chromozomů přibližně odpovídají, nedochází k problematickému párování během meiose a hybridizace tak nemusí být provázená celogenomovou duplikací (Yakimowski & Rieseberg, 2014).

Pokud si počty chromozomů rodičovských druhů neodpovídají, je nutné, aby hybrid prošel celogenomovou duplikací, a tak se elegantně vyhnul případným problémům při meiose. Vzniklý hybrid se pak označuje jako allopolyploid, celý proces hybridizace s následnou polyploidizací se nazývá allopolyploidizace. Pro samotnou genomovou duplikaci vyrovnávající se s rozdílnými počty chromosomů rodičů a následující po hybridizaci se někdy používá termín amfidiploidizace (Briggs & Walters, 2001).

Podle současných představ stojí hybridizace za vznikem přibližně 25 % rostlinných druhů (Mallet, 2005).

## **2. 1. 1. Hybridizace v kontextu ekologických gradientů**

Jsou známy příklady, kdy je průběh hybridizace (respektive vývoj následného rozšíření hybridů a rodičovských druhů) ovlivněn gradientem klimatických podmínek (Levin, 2004). Jedním z takových příkladů je rozšíření a podoba kontaktní zóny dvou evropských druhů rodu *Senecio* L. a sice konkrétně druhů *Senecio ovatus* (G.Gaertn., B.Mey. & Scherb.) Hoppe a *S. germanicus* Wallr. Tito na styčných plochách svého rozšíření podstupují křížení a vznikající hybridy zaujímají odlišné ekologické niky, liší se i jejich geografické rozšíření (Oberprieler et al., 2011; více viz níže). Podobných zón styku a následné hybridizace dvou různých druhů je u rodu *Senecio* známo více.

Gradientem nadmořské výšky jsou například odděleny italské populace *Senecio aethnensis* Jan ex DC. a *S. chrysanthemifolius* Poir. V rámci sympatrického rozšíření dochází k hybridizaci a vůči gradientu nadmořské výšky můžeme pozorovat odpovídající gradienty morfologických znaků i znaků životního cyklu na hybridních jedincích. Šíření morfologických znaků obou (morfologicky dobře definovaných) druhů je podpořeno oboustranným genovým tokem z jedné rodičovské populace do druhé (Muir et al., 2013). Situaci však komplikuje selekce proti hybridům, která je velmi zřetelná v místech kontaktu obou druhů a která naznačuje, že ke křížení obou druhů může docházet jen za specifických okolností a běžně k němu nedochází (Brennan et al., 2009).

Zmíněná přítomnost znaků obou rodičů na hybridních potomcích (někdy se hovoří o tzv. intermediárním fenotypu) je doložitelné i na molekulární úrovni – důkazem je například velká variabilita izozymových a chloroplastových markerů u hybridů *Senecio eboracensis* R.J. Abbott & A.J.Lowe a *S. vulgaris* var. *hibernicus* Syme na britských ostrovech (Lowe & Abbott, 2015). Konkrétní příklad hybridní zóny rodu *Senecio* bude podrobněji přiblížen níže.

### **2. 1. 2. *Senecio ovatus* a *S. germanicus***

Základní informace o hybridizaci těchto dvou druhů byly již uvedeny výše, ale nepochybně je vhodné se o celé problematice zmínit širěji. Oba druhy patří do skupiny *Senecio nemorensis* agg., což je relativně komplikovaná skupina s řadou známých hybridních zástupců (Hodálová, 1999, 2002). V literatuře byly popsány dva odlišné případy styčných zón těchto druhů – první v bavorské (Oberprieler, 1994) a druhý v karpatské části areálu rozšíření. *S. germanicus* je kontinentální taxon, který má v Bavorsku západní hranici svého rozšíření. Naopak *S. ovatus* je taxon spíše oceánického rozšíření, v Západních Karpatech leží jeho hranice rozšíření směrem na východ. S přihlédnutím k této odlišné charakteristice obou druhů není překvapivá skutečnost, že zatímco v Bavorsku je značně hojněji zastoupen *S. ovatus* a *S. germanicus* je vytlačován výše zmíněným hybridem, v Karpatech bude situace přesně opačná. Pattern rozšíření je tak určen optimálními podmínkami rozšíření rodičovských druhů, kteří jsou v případě neoptimálních podmínek snadno vytlačováni hybridním druhem (Hodálová & Marhold, 1996). Kromě tohoto vymezení daného gradientem od kontinentality k oceanitě se každý z druhů nachází na svých stanovištích v jiném vegetačním kontextu (Hodálová & Valachovič, 1996). Každý z druhů také kvete v jinou dobu (*S. ovatus* kvete o několik týdnů dříve než *S. germanicus*), což může představovat účinnou prezygotickou reprodukční bariéru vysvětlující častý jev, kdy se ve smíšené populaci vyskytuje velmi málo hybridů z původního křížení obou rodičovských druhů a prvního zpětného křížení (tedy F1 a F2 generace) a místo nich převažují hybridy vzniklé jako potomci pokročilejších zpětných křížení (Oberprieler et al., 2011).

## 2. 2. Polyploidizace

Polyploidizace je významný i dnes hojně probíhající proces a v mnohém unikátní zdroj diverzity krytosemenných rostlin. Genomová duplikace, k níž během polyploidizace dochází, je významným mechanismem umožňujícím vznik a prosazení nových mutací – může totiž docházet k redukci funkcí některých kopií genů, které pak mohou zaujmout funkce jiné – je tedy mechanismem vzniku evolučních novinek (King et al., 2006), což následně vede nejen k rozvíjení, ale také k udržení stávající diverzity (Buggs et al., 2012). Na rozdíl od ostatních mechanismů speciace je polyploidizace také velmi rychlá, s okamžitými projevy izolace polyploida od rodičovského druhu.

Polyploidizace je tedy zmnožení genových sad organismu. Organismus, který tímto zmnožením prošel, se pak nazývá polyploid a jedinci konkrétních ploidních úrovní se označují pomocí odpovídajících předpon – např. diploid, tetraploid, oktoploid, apod.

Napříč skupinami organismů můžeme rozlišit skupiny, kde se polyploidizace z různých důvodů téměř nevyskytuje (např. některé skupiny živočichů jako jsou savci nebo ptáci, i když i u nich můžeme rozeznat stopy některých dávných genomových duplikací) a naopak skupiny, kde se vyskytuje velmi hojně (rostliny a to včetně mechorostů nebo stélkatých rostlin, ale také například ryby). Důvody prosazení (či neprosazení) polyploidizace napříč eukaryotickými organismy se liší podle konkrétních skupin a v řadě případů ještě nejsou dostatečně zřejmé (Mable, 2004a).

Motivací pro výzkum polyploidizace a navazujících fenoménů může být skutečnost, že řada užitkových rostlin představuje polyploidní linie (např. cukrová třtina - *Saccharum officinarum*, nebo banánovník - různé kultivary a kříženci rodu *Musa*; Hilu, 1993). Zajímavostí v případě banánovníku je, že nejčastěji konzumovaná linie představuje triploidního hybrida, který je sterilní (D'Hont et al., 2012). Sterilita vznikajících triploidů je častým důsledkem křížení diploidního druhu s tetraploidním druhem (jedná se tedy o tzv. heteroploidní hybridizaci, kdy dochází ke křížení různých ploidních úrovní mezi sebou).

Jsou známy dva druhy polyploidizace, podstatně se odlišující mechanismem svého vzniku – autopolyploidizace a allopolyploidizace. Autopolyploidi jsou takoví polyploidi, kteří obsahují dvojnásobné množství genových sad, ale tyto pochází od jediného druhu. Autopolyploidi mohou vzniknout například splynutím dvojice neredukovaných gamet rodičů ze stejné populace. Autopolyploidi tedy ve svém genomu obsahují dvě totožné sady

chromozomů, zatímco allopolyploidie ve svém genomu obsahují dvě odlišné sady chromosomů a vznikají následkem hybridizace (Ramsey & Schemske, 1998).

Je možné dále rozlišit dva druhy allopolyploidie (lišící se spíše náhledem na studovanou problematiku, než povahu jevu samého). Taxonomická allopolyploidie označuje stav, kdy se v genomu nachází genové sady dvou různých taxonů. Oproti tomu genetická allopolyploidie označuje stav, kdy jsou v genomu přítomny genové sady dvou odlišných linií, které mohou, ale nemusí, patřit ke stejnému taxonu (Doyle & Egan, 2010; Estep et al., 2014).

### 2. 2. 1. Autopolyploidizace

Allopolyploidizace je tradičně považována za významnější pro vznik nových druhů (Rieseberg & Willis, 2007). Zřejmě by ale neměla být podceňována ani role autopolyploidizace, která může hrát mnohem podstatnější roli, než bylo dříve usuzováno (Soltis & Soltis, 2012). Autopolyploidizační události mohli být klíčovými okamžiky speciace řady rodů čeledi Brassicaceae (např. rody *Capsella* Medik., *Biscutella* L. nebo *Cardamine* L.; Marhold & Lihová, 2006). Vznik tetraploidních linií druhu *Cardamine amara* L. byl také zřejmě způsoben autopolyploidizací, která nastala v období po ústupu glaciálu (buď v posledním interglaciálu, nebo až v holocénu). Jak přesně tato událost probíhala (zda všechny tetraploidní populace pochází z jediné takové události, či jsou výsledkem několika nezávislých polyploidizačních událostí) zůstává otevřenou otázkou (Marhold et al., 2002; Zozomová-Lihová et al., 2015).

V případě rodu *Capsella* známe pouze tři evropské druhy, dva diploidní druhy – *Capsella rubella* Reut. a *Capsella grandiflora* Boiss. a jeden tetraploidní – *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik., který je velmi úspěšným druhem s širokým areálem rozšíření. Nepochybně se jedná o případ dávné polyploidizace, a protože se zdálo, že *C. rubella* vznikla z *C. grandiflora* značně později, přičemž nebyl znám jiný druh pro případnou allopolyploidizaci, usuzovalo se na autopolyploidní vznik druhu *C. bursa-pastoris* (Hurka & Neuffer, 1997; Lysák et al., 2003). V poslední době však byly odhaleny nové důkazy hovořící spíše o allopolyploidním původu druhu *C. bursa-pastoris*, případně o introgresi s druhem *C. rubella* (tato možnost se zdá být pravděpodobnější). Konkrétně byly odhaleny některé alely *C. rubella* v genomu tetraploida (Slotte et al., 2006).

### 2. 2. 2. Polyploidizace v kontextu ekologických gradientů

Existuje řada hypotéz postihujících problematiku uchycování tetraploidů a jejich stabilizace v původních diploidních populacích. Při studiu rozšíření jednotlivých ploidních úrovní je nápadné, že diploidi a polyploidi často zauímají odlišné ekologické niky. Je pravděpodobné, že změna niky (resp. posun ekologické niky polyploida oproti ekologické nicy diploida po gradientu některých ekologických faktorů) je podmínkou úspěšné stabilizace vzniklé tetraploidní linie (Beest et al., 2011; Kirchheimer et al., 2016). Situace může být samozřejmě komplikovanější, k uchycení polyploida (obecně ale jakékoliv nové linie, bez ohledu na to, zda vznikla polyploidizací či hybridizací) mohou často přispívat další vlivy, například přechod na apomiktický způsob rozmnožování (Baker, 1967; Cheptou, 2011), kdy pak může jediný jedinec založit celou novou populaci. S takovou situací se například setkáváme v případě horského druhu *Ranunculus kuepferi* Greuter & Burdet (Ranunculaceae) v evropských Alpách, kde tetraploidi zauímají drsnější a extrémnější niky než diploidi, z nichž původně vzešli (Kirchheimer et al., 2016).

Podobný přechod polyploida na samosprášení je znám i v případě rodu *Capsella* (tetraploidní *Capsella bursa-pastoris* je schopna samoopylení, na rozdíl od rodičovského diploidního druhu *Capsella grandiflora*; Hurka & Neuffer, 1997). Vztahy mezi rozmnožovacími systémy a genovou duplikací jsou obecně málo známé. Myšlenka, že s rostoucí ploidní úrovní se bude rostlina spíše rozmnožovat samosprášením, se jeví pravděpodobnou, ale není zatím podložena formálními důkazy (Mable, 2004b; Barringer, 2007). Jak přesně by takový vztah mohl fungovat je ovšem stále nejisté. Známý příklad u druhu *Arabidopsis lyrata*, kdy dvojnásobná nezávislá autopolyploidizační událost u diploida s výraznou sporofytickou inkompatibilitou vedla v jednom případě ke vzniku tetraploidní linie schopné samosprášení, ve druhém případě však nikoliv, pouze dokazuje, že je celá problematika zřejmě komplikovanější, než se může na první pohled zdát (Mable et al., 2004).

Studium koexistence různých cytotypů umožňuje existence smíšených populací obsahujících více ploidí v těsném sousedství. Takové smíšené populace jsou ohnisky možné budoucí sympatrické nebo parapatrické speciace (Otto & Whitton, 2000), avšak otázka životnosti či stability takových populací ještě nebyla zcela zodpovězena (Halverson et al., 2008). Je dokonce možné, že se jedná pouze o dočasný a krátkodobý fenomén. Dlouhodobé soužití diploidů a tetraploidů totiž naráží na podstatný problém, neboť křížením těchto dvou cytotypů dochází ke tvorbě sterilních triploidů. Aby se tomu zabránilo, tak mezi jednotlivými ploidními úrovněmi musí docházet ke tvorbě reprodukčních bariér, jejichž příkladem je již

výše zmíněný přechod na jiný rozmnožovací systém. Dalším příkladem reprodukční bariéry může být rozchod cytotypů do odlišných ekologických nik (jinak řečeno podél ekologických gradientů; Levin, 1983). Pokud vzniknou dostatečné reprodukční bariéry, může postupně dojít až k vytvoření samostatných druhů (Husband & Sabara, 2004). Reprodukční bariéry mezi vyššími ploidními úrovněmi (např. mezi pentaploidy a hexaploidy) už nebývají tak silné a jejich hybridy mohou být do značné míry fertillní (tato situace je známa např. ze skupiny *Cardamine pratensis* L. (Lövkvist, 1956). Podrobněji je o problematice smíšených populací pojednáno níže.

K divergenci cytotypů napříč ekologickými gradienty dochází mnohem nápadněji u allopolyploidů (myšlena je divergence hybridního allopolyploida vůči rodičům; Soltis & Soltis, 2012), byla ale prokázána i u autopolyploidů. Dokonce se zdá, že s postupujícími environmentálními změnami spíše dochází ke vzniku autopolyploidů, což jen potvrzuje představu o genomové duplikaci jako cestě k rychlým adaptivním změnám umožňujícím obsazovat nové ekologické niky (Parisod et al., 2010).

Rozšíření populací diploidů a tetraploidů jednoho druhu v kontextu ekologických gradientů ukazuje jednoznačný pattern také u druhu *Cardamine amara*.

Těmito ekologickými gradienty mohou typicky být nadmořská výška nebo vegetační pattern (obojí vycházející také z jistých základních geografických trendů). Tyto gradienty postihující komplexně charakter prostředí jsou samozřejmě výslednicemi dílčích gradientů ekologických ukazatelů, jakými jsou ozáření, sklon terénu, edafické poměry, půdní substrát, teplota nebo srážky (Dahlin et al., 2014). Velmi často jsou tyto gradienty mapovány pomocí informací z klimatických databází (viz příklady a následně výklad níže).

### **2. 2. 3. *Cardamine amara***

Pattern rozšíření obou cytotypů (již výše zmíněné) *Cardamine amara* je způsoben více faktory, mezi které patří hlavně omezený genový tok mezi oběma cytotypy a jejich ekologická divergence. Modelováním rozšíření pomocí dat z klimatických databází je možné rekonstruovat podobu původní kontaktní zóny a historii rozšíření obou cytotypů v kontextu pleistocénních glaciálních cyklů, kdy se výrazně měnila podoba ekologických gradientů vytyčujících rozšíření obou cytotypů (Zozomová-Lihová et al., 2015).

#### 2. 2. 4. *Senecio jacobaea*

*Senecio jacobaea* L. (*Jacobaea vulgaris* Gaertn.) roste hojně v celé Evropě a na Slovensku se nachází dvě ploidní úrovně – tetraploidi ( $2n = 40$ ) a oktoploidi ( $2n = 80$ ) vzniklí autopolyploidizací zmíněných tetraploidů, přičemž tetraploidi jsou obecně hojnější (Hodálová et al., 2007). Obě ploidní úrovně se podstatně liší svou ekologií – oktoploidy nacházíme převážně na přírodních xerothermních stanovištích, zatímco tetraploidi se vyskytují i na jiných stanovištích včetně těch antropicky ovlivněných (Hodálová & Mered'a, 2015). Tato odlišnost ekologických nik byla prokázána i pomocí ekologického modelování, kdy byly přesně vymapovány niky obou cytotypů. Zmíněné ekologické niky se tedy podstatně odlišují (zejména co se týče klimatických podmínek rozšíření obou druhů), ale jejich šíře se mezi cytotypy podstatně neodlišuje, ač by se to dalo očekávat podle výrazného rozdílu v zastoupení obou cytotypů na studovaném území (Mered'a & Kučera, 2016).

#### 2. 2. 5. Stručná metodika studia polyploidních komplexů

Mezi základní způsoby zjišťování ploidní úrovně rostliny patří počítání chromozomů (chromosome counting). Jedná se o časově náročnou karyologickou metodu, která ale jako jediná umožňuje postihnout například případné aneuploidie (Marhold et al., 2010). Mnohem jednodušší a flexibilnější metodu představuje průtoková cytometrie (Doležel et al., 2007; Kron et al., 2007; Loureiro & Travníček, 2010).

Tato kvantitativní metoda registruje množství DNA v jednotlivých jádrech rostlinné buňky (DNA byla předtím obarvena fluorescenční barvou a podle intenzity záblesku je tak možné vypočítat její množství). Protože v jediném vzorku pro průtokovou cytometrii se nachází veliké množství jader a dochází tak ke „zprůměrování“ velikého počtu záblesků, je jasné, že je poměrně jednoduché odfiltrovat případné rušivé vlivy (např. některé kontaminace, případnou endoreduplikaci v části pletiva, apod.). Podle množství DNA v jednotlivém jádře se pak dá za pomoci srovnání se standardem určit ploidy daného pletiva (dané rostliny) (Suda et al., 2006). Zde je velmi podstatné provést srovnání s využitím počítání chromozomů. Alespoň u jedné rostliny každého druhu je třeba stanovit počet chromozomů, potom u té samé rostliny změříme množství DNA pomocí průtokové cytometrie. Porovnáním obsahu DNA u rostliny, kde známe počet chromozomů, s rostlinami stejného druhu, u nichž známe jen množství DNA (ale neznáme počet chromozomů), můžeme usuzovat pravděpodobnou ploidy resp. počet chromozomů u rostlin, kde jsme neprovedli počítání chromozomů. Počítání



chromozomů tak představuje velmi podstatnou metodu pro další srovnávání s kvantitativními údaji získanými pomocí průtokové cytometrie (Leong-Škorníčková & Šída, 2007). Počty chromozomů některých druhů lze najít v internetových databázích, pro čeleď Brassicaceae existuje například databáze Brassibase (Kiefer et al., 2014).

Zajímavou metodou studia polyploidních komplexů je také tvorba nových polyploidních linií v laboratorních podmínkách. Byl tak indukován například vznik allotetraploida, křížence druhů *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. a *A. arenosa* (L.) Lawalrée. Tvorba takových linií umožňuje studium proměn transkriptomu a genového silencingu nově vzniklých heteroploidních hybridů, což přispívá k poznání genomických změn majících význam při vzniku heteroploidních hybridních linií a jejich dalším vývoji, včetně případné speciace (Wang et al., 2006).

## 2. 2. 6. Polyploidizace a hybridizace (allopolyploidizace)

Rozdíl mezi homoploidní a heteroploidní hybridizací byl již popsán výše. Na tomto místě bude dále pojednáno o hybridizaci heteroploidní, která nutně vede k procesu allopolyploidizace (mají-li být vzniklí hybridy v přírodě udržitelní).

Vhodný modelový systém pro studium allopolyploidizace představuje rod *Cardamine* (Brassicaceae), který je jedním z největších rodů čeledi, co se počtu druhů týče (některá pojetí uvádí až 200 druhů) (Al-Shehbaz, 1988). Hybridizace a s ní spojená allopolyploidizace jsou zřejmě nejpodstatnějšími procesy, které stojí za touto velkou diverzitou (Lihová & Marhold, 2006; Mandáková et al., 2013).

*Cardamine asarifolia* L. je evropský druh, který je příbuzný ostatním evropským skupinám rodu *Cardamine* (například výše zmíněnému druhu *C. amara*) (Lihová & Marhold, 2006), na rozdíl od nich ale nemá složené listy a tak se dá jednoduše morfologicky odlišit. Z hlediska ploidní úrovně se jedná o hexaploidní druh. Rozšíření *C. asarifolia* se kryje s jižní hranicí rozšíření diploidního i tetraploidního cytotypu *C. amara*, s nimiž také hybridizuje.

Schopnost hybridizace a překryv v rozšíření, spolu s vysokou ploidní úrovní vedl k domněnce, že je *C. asarifolia* výsledkem křížení a následné allopolyploidizace dvou diploidních předků. Situace byla zhodnocena pomocí sekvencí genu pro chalkon syntázu, který se v genomu diploidních *Cardamine* nachází v jediné kopii (v genomu hexaploida je tedy přítomen ve třech homologických kopiích). Jeden z homologů nebyl dohledatelný napříč sekvencemi tohoto genu pro všechny diploidní druhy rodu *Cardamine*, jedná se tedy zřejmě

o pozůstatek rodičovské linie, která je v současné době vyhynulá. Druhým rodičem pak mohl být některý druh z širší skupiny *C. amara* (Lihová et al., 2006).

Zajímavou výzvou studia allopolyploidních linií je otázka, zda každá taková linie v evoluci vznikla pouze jednou anebo došlo k několika nezávislým vznikům ze stejných rodičovských linií (Soltis et al., 2004). Tato otázka může být vyřešena genetickou analýzou alelické variability zkoumaného polyploida a jeho předků. Pokud nalezneme u jedinců vzniklého allopolyploidního druhu stejné alely homologních genů (z nichž každá pochází od jednoho z rodičovských druhů) můžeme usuzovat na jednorázový vznik. Situace je poměrně složitá – pouhé nalezení více různých kombinací odlišných alel rodičovských druhů totiž může znamenat nezávislý vznik polyploidní linie, ale může být stejně tak dobře způsoben genovým tokem. Situaci podstatně zjednodušuje, pokud jsou studované linie inbrední, jako např. u rodu *Glycine* Willd. (Fabaceae) (Doyle et al., 2004). Podobnou cestou byla tato otázka řešena u výše zmíněného druhu *Cardamine asarifolia*, kde ale nepřinesla přesvědčivé řešení (Lihová et al., 2006).

Další příklady allopolyploidizace jsou diskutovány níže ve speciální části na příkladech druhů *Arabidopsis kamchatica* (DC.) K.Shimizu & Kudoh a *A. suecica* (Fr.) Norrl. ex O.E.Schulz.

### 2. 3. Introgrese

V průběhu procesu hybridizace a souvisejících zpětných křížení dochází k toku genů mezi populacemi obou křížících se druhů, tento tok může být jednostranný i oboustranný. Díky tomuto procesu může dojít k tzv. introgesi – tj. přenášené geny mohou být stabilně zabudovány do genomů křížících se jedinců a mohou postupně obohatit genofond celé populace (Rieseberg & Wendel, 1993). Důsledkem introgrese je tedy již vlastní zvýšení genetické diverzity populace, ale také přenos adaptací mezi druhy, či dokonce vznik zcela nových adaptivních vlastností (Soltis & Rieseberg, 1986). Je pravděpodobné, že důvody úspěchu některých hybridních linií neleží v heterózním efektu (jev, kdy potomci F1 generace výrazně předstihují v hodnotě některého znaku oba rodiče), ten totiž není přenosný do dalších generací (Lippman & Zamir, 2007). Výhoda pravděpodobněji spočívá ve fixaci výhodných alel od obou rodičů (tedy v kombinaci výhodných alel kódující jednotlivé adaptivní znaky u každého z rodičů) pomocí introgrese (Baack & Rieseberg, 2008). Heterózní efekt může být

každopádně významný v rámci stabilizace linií některých asexuálních hybridů (Facon et al., 2005).

K introgresi samozřejmě nemusí docházet pouze u odlišných druhů, ale také u odlišných cytotypů jednoho druhu. Nejčastěji byl genový tok mezi ploidiemi pozorován v systémech obsahujících pouze diploidy a tetraploidy (Neuffer et al., 1999), ale z Německa známe příklad z čeledi Brassicaceae, kde byl prokázán přenos genů mezi diploidy a jedinci vyšších ploidních úrovní. Jednalo se konkrétně o dva druhy rodu *Rorippa* Scop. (diploidní invazivní druh *Rorippa austriaca* Spach a v Německu původní tetraploidní či hexaploidní druh *R. sylvestris* (L.) Besser) a genový tok byl prokázán v obou směrech, ač nebyl pozorován případný přímý vliv tohoto genového toku na změny ekologických nik studovaných populací (Bleeker, 2003).

Porozumění introgresi a toku genů je obzvlášť potřebné v případech, kdy ve styčných bodech dvou odlišných druhů (případně cytotypů) nacházíme velkou variabilitu na genotypové i fenotypové úrovni. Rodičovské fenotypy mohou být introgresí značně ovlivněny a mezi hybridy často nacházíme řadu přechodných fenotypů. V takových situacích je pouhá morfologická analýza nalézáných jedinců značně nedostatečná a introgrese je podstatným fenoménem, který tuto různorodost působí (Lihová et al., 2007).

### **2. 3. 1. Fenotypická plasticita**

Dalším podstatným faktorem komplikujícím morfologickou analýzu je fenotypická plasticita, která je například u čeledi Brassicaceae obzvlášť výrazná a významně komplikuje morfologické opisy jednotlivých druhů. Za touto fenotypickou plasticitou byl u rostlin čeledi Brassicaceae několikrát prokázán výše již několikrát zmíněný gradient prostředí, např. u druhu *Arabis serrata* Franch. & Sav. (Oyama, 1994).

Při hlubším studiu rodu *Arabis* L. (zde se hodí podotknouti, že pozice a vymezení tohoto druhu byli ještě donedávna nejisté, dnes je řazen do tribu Arabideae, který je největším tribem celé čeledi Brassicaceae), konkrétně druhů řazených do skupiny *Arabis hirsuta* agg. je pozoruhodné, že druhy jsou poměrně jasně oddělitelné na základě klimatických dat, které také vhodně definují rozšíření každého z druhů. Odlišit druhy na základě morfologie je ovšem značně problematičtější. I to je důsledkem výrazné fenotypické plasticity posílené navíc vlivem paralelní evoluce řady morfologických znaků u tohoto pružně speciujícího druhového komplexu (Karl & Koch, 2014).

### 2. 3. 2. Introgrese v kontextu ekologických gradientů

Z výhod, které introgrese jedincům přináší, vyplývá podstatné rozšíření ekologické niky, kterou je daný jedinec schopen osídlit. Ta je prokazatelně větší u linií, které získaly nové geny pomocí genového toku (Choler & Michalet, 2002).

### 2. 3. 3. *Senecio carniolicus*

Vysokohorský druh *Senecio carniolicus* Willd. představuje systém, kde se projevuje introgrese napříč ploidními úrovněmi téhož druhu. V Alpách najdeme lokality, kde se stýkají všechny tři ploidní úrovně (diploidi ( $2n = 40$ ) a dvě polyploidní linie – tetraploidi ( $2n = 80$ ) a hexaploidi ( $2n = 120$ )). Jednotlivé cytotypy jsou vázány na konkrétní ekologické podmínky. Nejčastěji jsou nacházeni diploidi a hexaploidi, kteří se leckde vyskytují i pohromadě ve formě smíšených populací (Sonnleitner et al., 2010). Za stabilitou jednotlivých kontaktních zón různých ploidií stojí nejspíše specifické postzygotické reprodukční mechanismy. Roli pravděpodobně hraje genová dóze při vývoji endospermu, tj. poměrné zastoupení sad chromozomů od otce a od matky. Fitness semenáčků je tím výrazně ovlivněno a některé kombinace ploidií tak nemohou dorůst dospělosti, a proto nejsou nacházeny v přírodních populacích. Diploidi se tak s polyploidy kříží velmi výjimečně, ale polyploidi jsou schopni se mezi sebou křížit za vzniku fertálních potomků (Sonnleitner et al., 2013). Zastoupení hybridů v přírodních populacích je ale obecně velmi malé, hybridy zřejmě vznikají pouze za specifických podmínek (Hülber et al., 2015).

Při studiu konkrétní kontaktní zóny hexaploidů a diploidů v Rakousku byla odhalena závislost rozmístění obou ploidií na ekologických gradientech, s čímž souvisela i odlišná vegetační skladba v okolí každého z cytotypů. Intermediární cytotypy (triploidi) nebyly odhaleny, což potvrzuje představu dostatečné reprodukční izolace mezi diploidy a polyploidy (Hülber et al., 2009). Naproti tomu pentaploidi byli velmi častí v zónách styku obou polyploidních cytotypů (tetraploidů s hexaploidy), což jen potvrzuje výše zmíněné. Pentaploidní hybridy jsou zřejmě prostředníky genového toku mezi tetraploidy a hexaploidy (ovšem pouze ve směru z tetraploidů, nikoliv naopak).

Podobný výskyt pentaploidů coby potomků křížení tetraploidů s hexaploidy byl zaznamenán také v případě komplexu *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) (Kolář & Štech, 2009).

## **2. 4. Modelování klimatických parametrů (Ekologické modelování)**

V předchozím textu byl několikrát zmíněn pojem ekologická nika. Existuje řada jejích definic, ale pro potřeby tohoto textu je dostatečné si ekologickou hodnotu představit jako jakýsi mnohorozměrný prostor vymezený souřadnicemi všech ekologických gradientů, které tvoří osy tohoto prostoru (Morgan, 2012).

Z toho jasně vyplývá nutnost adekvátní analýzy ekologických gradientů v každém výzkumu zabývajícím se posunem ekologické niky či ekologickou divergencí.

V současné době se převážně používají dvě možnosti získávání informací o těchto gradientech. První možností je vycházet přímo z informací zaznamenaných na lokalitě. Druhou metodu, podstatně elegantnější i rychlejší, představuje získávání informací o lokalitě z klimatických databází. Nyní budou obě metody stručně představeny a následně budou uvedeny dva příklady, již výše zmíněné, se zaměřením na metodickou rovinu spojenou s modelováním ekologických nik.

### **2. 4. 1. Indikátorové hodnoty**

Tato metoda předpokládá, že rostliny preferenčně obsazují stanoviště blízcí se podmínkám jejich optima. Toto optimum je možné kvantifikovat (přiřadit nějaké myšlené hodnoty všem faktorům, z nichž se skládá – teplota, vlhkost, acidita substrátu, aj.). Zahrnutím jednotlivých takových hodnot pro každou rostlinu na lokalitě, můžeme jejich zprůměrováním zjistit hodnotu příslušného ukazatele na lokalitě. Počítá se tedy s představou, že pouhá znalost výčtu druhů na lokalitě umožní modelovat podmínky této lokality. Výčet druhů se získává pomocí snímkování, kdy jsou zaznamenány všechny druhy v nadefinované vzdálenosti od jedince zkoumaného druhu (např. se stanoví čtverec, či kruh o určitém rozměru a v něm jsou zaznamenány všechny přítomné druhy) (Kirchheimer et al., 2016).

Bylo sestaveno více stupnic pro jednotlivé znaky, které se v některých parametrech odlišují. Zřejmě nejznámější jsou tzv. Ellenbergovy hodnoty (Ellenberg, 1988), ale používají se také novější Landoltovy hodnoty, které jsou v mnohém názornější (Farjon, 2011). Plošné použití Ellenbergových hodnot také komplikuje fakt, že byly původně navrženy pouze pro střední Evropu (Hill et al., 2000).

#### 2. 4. 2. Klimatické databáze

V dnešní době je k dispozici více klimatických databází zahrnujících celou Zemi a doplněných o řadu dílčích modelů rozvržení různých ekologických gradientů (srážky, teploty v různých měsících, nadmořská výška, atd.). Jednou z takových databází klimatických dat je databáze WorldClim (Alvarez & Deil, 2015), která je sice užitečným nástrojem, navíc dostupným zdarma, ale její rozlišení nemusí být pro potřeby některých studií zcela ideální. Alternativu představuje například databáze SolarGIS, která obsahuje mnohem podrobnější data (myšleno ve smyslu výrazně podrobnějšího rozlišení ve srovnání s databází WorldClim), zejména co se týče slunečního záření a srážek, hlavně pro oblast Evropy (Cebecauer & Šuri, 2015; Zozomová-Lihová et al., 2015). V tomto případě jde o komerční produkt, který není k dispozici zdarma. Je ale k dispozici pro spolupracující pracoviště Botanického ústavu Slovenské akademie věd.

Reálný postup při takové studii sestává ze získání souřadnic rozmístění populací daného druhu (případně poddruhu nebo cytotypu – dle povahy studie) a načtení parametrů z databáze ohledně slunečního záření, teploty, srážek, aj. odpovídající těmto souřadnicím. Tak se získá souhrn potřebných ekologických podmínek stanovišť, vhodných pro osídlení tímto druhem (poddruhem nebo cytotypem). Výhodou takových studií je možnost predikovat rozšíření druhů do budoucna díky možnosti modelovat ekologické gradienty výpočtem za pomoci současných trendů ve vývoji klimatu. Analogicky je možné vyjít z klimatických předpokladů z geologické minulosti a projektovat rozšíření druhu do těchto souvislostí (Zozomová-Lihová et al., 2015).

#### 2. 4. 3. *Ranunculus kuepferi*

Při studiu rozšíření druhu *Ranunculus kuepferi*, k němuž bylo již výše uvedeno několik poznámek, týkajících se problematiky divergence niky v průběhu polyploidní evoluce, bylo použito obou metod zmíněných výše. Konkrétně byla použita výše zmíněná databáze WorldClim a výpočet Landoltových hodnot. Je zajímavé, že v případě této studie přinesly obě metody částečně jiné výsledky. Jedním z možných vysvětlení by mohlo být, že ukazatele tak, jak jsou definovány již v popisu obou metod, zaznamenávají nepatrně odlišné faktory reálných podmínek prostředí a navíc používají jiné stupnice. Zde by se ale dalo namítnout, že mezi některé ukazatele i přes zdánlivou nepodobnost nakonec odráží stejné a jasně vymezené fyzikální gradienty (např. teplota nebo pH substrátu) a že posun po těchto

gradientech by měl být v obou modelech shodný i bez ohledu na použité jednotky. Velký rozdíl byl například pozorován v mapování ekologické niky tetraploidů v horách (je ale nutno si uvědomit, že hory představují značně divergentní prostředí, které je kromě klimatických gradientů určeno řadou přímých faktorů, které s klimatem dokonce nemusí úplně souviset a mohou být určeny pouze konkrétními podmínkami mikrostanoviště). Použití modelování za pomoci klimatických databází s menším rozlišením tak může být u horských druhů problematické (Kirchheimer et al., 2016).

#### 2. 4. 4. *Cardamine amara*

Studie se zaměřila na mapování rozšíření diploidních a tetraploidních cytotypů druhu *Cardamine amara* na území České republiky a sousedících územích Rakouska a Německa v předhůří Východních Alp. Již delší dobu byla známa přítomnost četných kontaktních zón navazujících na rozšíření diploidního a tetraploidního cytotypu. Tetraploidní cytotyp byl popsán jako poddruh *C. amara* subsp. *austriaca* Marhold (Marhold, 1999) a jsou známy morfologické znaky, jimiž je možné jeho odlišení od diploidního cytotypu, *C. amara* subsp. *amara* (Lihová & Marhold, 2003). Na sledovaném území byla však vůbec poprvé odhalena existence smíšených populací obou cytotypů, obsahujících také triploidy, kteří představují potomky obou cytotypů. Tetraploidní cytotyp se sice na sledovaném území jevil jako monofyletický, ale otázka, kolikrát nezávisle vznikla tato autopolyloidní linie v rámci celého areálu rozšíření sledovaného druhu (zda je tedy monofyletická napříč celým areálem rozšíření), zůstává nevyřešena.

Jak ukázalo použití ekologického mapování, bylo rozdílné rozšíření cytotypů kromě historických faktorů způsobeno také odlišnými klimatickými nároky, které se nejlépe projeví v jejich rozvrstvení po gradientu nadmořské výšky. Při simulaci možného budoucího rozšíření byla odhalena značně dynamická povaha vztahu obou cytotypů, kdy by při vychýlení současných ekologických podmínek zřejmě docházelo k nahrazení jednoho cytotypu druhým. Extrémní klimatické změny se také ukázaly jako reálně možná příčina budoucího úplného vymizení tetraploidního cytotypu nebo dokonce celého druhu.

Současné rozšíření druhu se ukázalo být jasně ovlivněným minulou kolonizací Východních Alp při ústupech glaciálů (Zozomová-Lihová et al., 2015).

### 3. Představení modelového rodu *Arabidopsis*

Výklad o rodu *Arabidopsis* L. (Brassicaceae) nelze začít jinak, než připomenutím zřejmě nejznámějšího druhu, který do rodu *Arabidopsis* patří. Jedná se o druh *A. thaliana* (L.) Heynh., který v sobě shrnuje řadu vlastností ideálního modelového organismu a je tak jedním z nejvyužívanějších pokusných objektů v rostlinné biologii, kde se používá v širokém spektru oborů od genomiky až po studium morfogeneze nebo evoluční biologii (Mitchell-Olds, 2001; Mitchell-Olds et al., 2004). Nicméně, i přesto jak rapidně se zvětšuje objem dostupných informací o tomto konkrétním druhu, povědomí o jeho nejbližších příbuzných a pozici v komplexní fylogenezi čeledi Brassicaceae je stále nejisté. Řada prací také používá zavádějící a překonané pohledy na systematiku skupiny (Clauss & Koch, 2006).

Komplexní pohled na fylogenezi čeledi Brassicaceae umožňuje moderní systém rozdělující čeleď do 25 tribů se zahrnutím široké nabídky znaků od morfologických až po embryologické nebo molekulární (Beilstein et al., 2006). Tento pohled také přinesl rozdělení rodů, které byly dříve chápány jako příbuzné a lišící se pouze postavením děloh – rody *Arabis* a *Arabidopsis* (rod *Arabis* se dokonce ukázal polyfyletickým a patřícím do několika tribů). Jádro rodu *Arabis* reprezentované např. druhem *Arabis alpina* L. náleží do tribu Arabideae, zatímco rod *Arabidopsis* do tribu Brassiceae (Koch et al., 1999).

Co se obsahu rodu *Arabidopsis* týče – ten před rokem 1999 obsahoval přibližně 60 druhů, poté ale byla řada druhů pro nepřibuznost vyřazena (jak do existujících, tak do zcela nově ustanovených rodů) a naopak byl rod rozšířen o dříve rozlišovaný rod *Cardaminopsis* Hayek (Al-Shehbaz et al., 1999; O’Kane & Al-Shehbaz, 2003). V současné době jsou do rodu *Arabidopsis* kromě rodu *A. thaliana* řazeny tři velké linie – *A. lyrata* (L.) O’Kane & Al-Shehbaz, *A. arenosa* (L.) Lawalrée a *A. halleri* (L.) O’Kane & Al-Shehbaz. Podle rozlišení používaných markerů lze někdy rozlišit tři další menší linie – *A. cenebensis* (DC) O’Kane & Al-Shehbaz, *A. pedemontata* (Boiss.) O’Kane & Al-Shehbaz a *A. croatica* (Schott) O’Kane & Al-Shehbaz (Al-Shehbaz & O’Kane, 2002; Hohmann et al., 2014).

Modelový druh *Arabidopsis thaliana* má v systému rodu osobité postavení, i proto, že jeho genom je tvořen pouze 10 chromosomy v diploidním stavu (ostatní zmíněné rody mají v diploidním stavu chromosomů 16, což představuje primární stav; Al-Shehbaz & O’Kane, 2002; Lysák et al., 2006) a dále již o něm nebude více pojednáváno.

Ostatní nemodelové druhy (vyjmenované výše) jsou velmi podstatné, neboť podstatně rozšiřují možnosti výzkumu směry, které *Arabidopsis thaliana* neumožňuje, ale s benefitem



všech dostupných znalostí o *A. thaliana* (např. kompletně osekvenovaný a anotovaný genom) (Koch et al., 2008). Jsou například mnohem lépe využitelné pro výzkum křížení (tyto linie jsou totiž na rozdíl od samosprašného druhu *A. thaliana* cizosporašné) (Hohmann et al., 2014).

Podobně jako některé ostatní rody čeledi Brassicaceae zmíněné výše, je i rod *Arabidopsis* velmi dynamickým rodem, kde často dochází k polyploidizaci (ať už allopolyploidizaci nebo autopolyploidizaci), hybridizaci a introgresi. Níže budou představeny základní tři linie rodu *Arabidopsis*, potom dva příklady allopolyploidizace mezi nimi a na závěr bude detailně popsána introgresní zóna mezi liniemi *A. lyrata* a *A. arenosa*, která bude námětem mé budoucí diplomové práce.

### **3. 1. *Arabidopsis arenosa***

*Arabidopsis arenosa* představuje značně variabilní polyploidní komplex s centrem diverzity v Karpatech, z nichž se ale šíří dále do střední a jihovýchodní Evropy. Na většině území je tetraploidní, jen v Karpatech a na Balkánu nacházíme diploidní populace (Měsíček, 1970; Schmickl & Koch, 2011). Další izolovaná diploidní populace byla objevena u Baltského moře (Kolář et al., 2015). Dosavadní systém, který rozlišoval druh do několika poddruhů a dále vyčleňoval některé linie jako samostatné druhy (a to především podle morfologických znaků) (Měsíček, 1970), je značně překonaný a musí být přehodnocen. Molekulární studie provedená v roce 2012 odhalila tři genetické linie (balkánskou, karpatskou a alpskou), jejichž tetraploidní populace jsou značně plastické, výsledné systematické pojetí druhu však bylo odkázáno na budoucí revizi (Schmickl et al., 2012).

Recentní a zatím nepublikovaná práce Koláře a dalších autorů přináší komplexnější a zřejmě správnější pohled na fylogenezi druhu. Předpokládá karpatské centrum diverzity a celkem čtyři nezávisle vzniklé polyploidní linie. Kromě genetického vymezení se dají tyto linie rozlišit i ekologicky – každá se nachází v jiných nadmořských výškách a teplotním rozmezí. Při detailním zaměření na distribuci ploidních úrovní napříč celým areálem rozšíření bylo potvrzeno výše zmíněné geografické vymezení ploidních úrovní s existencí dvou kontaktních zón – užší kontaktní zóny ve Slovinsku a difúzní kontaktní zóny v Karpatech. Konkrétně v Karpatech (zejména v jejich západní části) se pak oba cytotypy nachází na všech škálách habitatů (od nížin až po horské) a není možné tedy hovořit o ekologické segregaci podle ploidních úrovní. Kontaktní zóna je nicméně stálá, o čemž svědčí i nízký výskyt

triploidů (vznikajících křížením diploidů s tetraploidy), a většina populací obsahuje jedince jediného cytotypu (Kolář et al., nepubl.). Jediný pozorovatelný ekologický trend napříč ploidními úrovněmi tak představuje náchylnost tetraploidů k některým habitatům vzniklým lidskou činností, které diploidi nikdy neobsazují – hovoří se dokonce o tzv. „železničním tetraploidovi“ (railway plants), který obsazuje antropogenní habitaty (železniční koleje) a šíří se po nich směrem do střední a severní Evropy. Tyto rostliny (které představují zástupce jediné genetické linie) se v řadě rysů od ostatních linií odlišují, vznikly u nich některé extrémní adaptace na téměř plevelný způsobem života – ztratily vernalizaci a mají značně specifické stresové reakce (Baduel et al., 2016).

Fenotypická plasticita druhu je více než značná. Do jaké míry za tuto plasticitu odpovídá genetická variabilita, či do jaké míry je tato plasticita způsobena ekologickými faktory, zůstává nezodpovězeno. Na první pohled je mezi populacemi nápadné odlišení dvou morfologických typů (možná je lépe označit je za ekotypy) – horského ekotypu (kompaktní drobné rostliny s výrazně tlustými (až sukulentizujícími) listy a růžovými květy, odpovídající původnímu Měsíčkově druhu *A. neglecta* (Schult.) O’Kane & Al-Shehbaz, dnes řazenému do druhu *A. arenosa*) a nížinného ekotypu (rostliny vytáhlé, s tenčími listy a bílými květy)). Tyto ekotypy jsou ale nepochybně polyfyletické a vyskytují se napříč různými liniemi druhu (Kolář, Marhold et al., nepubl.).

### **3. 2. *Arabidopsis lyrata***

Druh *Arabidopsis lyrata* (L.) O’Kane & Al-Shehbaz, který je sesterským druhem k výše zmíněnému druhu *A. arenosa* se tradičně dělí do dvou linií (druhů nebo poddruhů dle použité literatury). Zatímco v americké literatuře se tradičně používá dělení druhu do dvou poddruhů – *A. lyrata* subsp. *lyrata* a *A. lyrata* subsp. *petraea* (L.) O’Kane & Al-Shehbaz (Al-Shehbaz & O’Kane, 2002), ve středoevropské literatuře je zvykem považovat skupinu *A. lyrata* za druhový komplex *A. lyrata* agg. s dvěma samostatnými druhy *A. lyrata* a *A. petraea* (L.) V.I.Dorof. (Aucour et al., 2011; Hohmann et al., 2014). Tyto dva poddruhy (druhy) jsou dobře geograficky definované – zatímco poddruh *A. lyrata* subsp. *lyrata* je svým rozšířením vázán na severní Ameriku, poddruh *A. lyrata* subsp. *petraea* se vyskytuje v Evropě a Asii. Jedná se tedy o typický holarktický druh, jehož poddruhy jsou vůči sobě vikariantní. Centrum rozšíření evropského poddruhu se nachází ve střední Evropě, tato oblast zřejmě sloužila i jako refugium pro pozdější šíření druhu po pleistocénním ustoupení ledovce, touto cestou zřejmě

došlo k osídlení Islandu populací druhu *A. lyrata* subsp. *petraea* (Clausen a Mitchell-Olds, 2006; Ross-Ibarra et al., 2008).

*Arabidopsis lyrata* tvoří pozoruhodný komplex se zastoupením cytotypů značně odlišným napříč areálem rozšíření. Např. na Islandu a v Severní Americe nalezneme výhradně diploidní populace. V Evropě nalezneme populace jak diploidní, tak tetraploidní – v Rakousku např. převažují tetraploidní populace (Dart et al., 2004). Tito tetraploidi vznikli cestou autopolyploidizace a obecně jsou méně hojní než diploidi (Schmickl et al., 2010). Zajímaví jsou také uměle připravení allopolyploidi, kteří byli vypěstováni z diploidního druhu *A. thaliana* a diploidní linie *A. lyrata* (Beaulieu et al., 2009).

Na většině svého rozšíření je druh cizosprašný, ale z amerického poddruhu *A. lyrata* subsp. *lyrata* známe příklady samosprašení z okrajových částí areálu (Griffin & Willi, 2014). Díky tomu může být tento druh dobře využitelným modelovým organismem pro studium evoluce samosprašení, případně různých bariér jemu bránících (Mable, 2004c).

Co se morfologie, ale také některých aspektů životního cyklu, týče, je druh velice plastický, kromě proměny morfologie po směru ekologických gradientů (teplota, složení půdy) může hrát roli i míra herbivorie (byla prokázána souvislost s hustším pokryvem trichomy při vyšších úrovních herbivorie) (Vergeer & Kunin, 2011). Po směru ekologických gradientů (konkrétně zeměpisné šířky) dochází také k proměně některých fyziologických znaků – např. různých typů odolnosti vůči teplotnímu stresu (Wos & Willi, 2015).

Nejbližším příbuzným druhem tohoto druhu je druh *Arabidopsis arenosa*. Je nezpochybnitelné, že mezi oběma probíhá čilý genový tok a to již od doby segregace obou druhů (oba druhy jsou relativně mladé, předpokládá se, že k jejich oddělení došlo v pliocénu před zhruba 5 miliony let spolu s oddělením ostatních hlavních linií rodu; Koch & Matschinger, 2007) až do současnosti. Hybridizace a s ní spojená introgrese těchto druhů je popsána níže coby budoucí námět mé diplomové práce.

### **3. 3. *Arabidopsis halleri***

*Arabidopsis halleri* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz je výhradně cizosprašný vytrvalý druh, který se na rozdíl od ostatních divoce rostoucích zástupců rodu běžně vyskytuje pouze jako diploid. Zajímavé je, že se často nachází na půdách s vysokým obsahem těžkých kovů (zinek, kadmium), které dokáže akumulovat ve svých pletivech. Bylo prokázáno, že dochází ke genetické divergenci populací podle gradientu substrátu (od méně znečištěného těžkými kovy

po těžce znečištěný těžkými kovy), kdy vznikají genotypy schopné lépe snášet zamořené substráty. S gradientem znečištění substrátu také souvisí schopnost klonálního růstu jedinců, který je obecně velmi častý, ale méně významný ve znečištěných substrátech (Van Rossum et al., 2004). Schopnost snášet substráty bohaté na těžké kovy se v rámci druhu vyskytla opakovaně („odolné“ populace jsou tedy navzájem polyfyletické a blíže příbuzné geograficky nejbližším „neodolným“ populacím než ostatním „odolným“ populacím) (Pauwels et al., 2005). Studium genetických aspektů vzniku „odolných“ populací může být velmi užitečné pro studium adaptivních vlastností u rostlin ve vztahu k novodobému antropogennímu znečištění půd (Pauwels et al., 2012).

V současnosti užívané systematické pojetí druhu předpokládá existenci pěti poddruhů (Kolník & Marhold, 2006), přičemž poddruh *A. halleri* subsp. *gemmifera* (Matsum.) O'Kane & Al-Shehbaz se jako jediný nenachází v Evropě, ale je svým rozšířením vázaný na východní Asii. Tento poddruh je pro tuto práci významný tím, že je pravděpodobně rodičovským druhem obou poddruhů allopolyploidního druhu *A. kamchatica* (viz níže). Zbývající ostatní čtyři poddruhy se již v Evropě nachází a jedná se o poddruhy *A. halleri* subsp. *halleri*, *A. halleri* subsp. *tatrica* (Pawl.) Kolník, *A. halleri* subsp. *dacica* (Heuff.) Kolník a *A. halleri* subsp. *ovirensis* (Wulfen) O'Kane & Al-Shehbaz. V Kolníkově pojetí je *A. halleri* subsp. *ovirensis* lokálním endemitem Východních Alp a *A. halleri* subsp. *tatrica* je endemitem Západních Karpat. Ostatní dva poddruhy mají podstatně širší areály rozšíření (Kolník & Marhold, 2006). Výše zmíněné populace odolné těžkým kovům pochází převážně z poddruhu *A. halleri* subsp. *halleri*, ale známe případy i z poddruhů *A. halleri* subsp. *gemmifera* nebo *A. halleri* subsp. *tatrica* (Koch & German, 2013).

V současné době je ovšem toto systematické pojetí již překonané a vyžaduje revizi. Probíhající molekulárně systematické studium poukazuje na existenci tří genetických linií v evropské části areálu rozšíření druhu. Nezměněné zůstává vymezení poddruhu *A. halleri* subsp. *gemmifera* – někteří autoři se dokonce domnívají, že by měl díky významné genetické, ale také geografické izolaci získat status samostatného druhu v rámci skupiny *A. halleri* agg. (Koch & German, 2013), vymezení stávajících evropských poddruhů se ovšem podstatně mění.

Rozšíření poddruhu *A. halleri* subsp. *ovirensis* je značně širší oproti původně popsané endemické lokalitě (Koch & German, 2013) a v moderním systému bude zřejmě zahrnovat celou východoalpskou genetickou linii. Rozšířeno bude také současné uznávané pojetí poddruhu *A. halleri* subsp. *halleri*, který do sebe zahrne hercynsko-západokarpatskou

genetickou linií a tudíž také poddruh *A. halleri* subsp. *tatrica*. Jméno *A. halleri* subsp. *dacica* se bude zřejmě vztahovat na populace třetí genetické linie, rozšířené v Jižních Karpatech (Fuxová et al., nepublikováno).

Podstatné je, že zmiňovaný druh pravděpodobně hybridizuje s předchozími dvěma zmíněnými druhy (*A. arenosa* a *A. lyrata*) a tato hybridizace je provázena introgresivní speciací (Koch, nepubl.). Otázka konkrétní podoby a významu takového genového toku však nebyla doposud podrobněji zkoumána.

### 3. 4. *Arabidopsis kamchatica*

Prvním prezentovaným allopolyploidním druhem rodu *Arabidopsis* je druh *A. kamchatica* (DC.) K. Shimizu & Kudoh. Jeho taxonomické zařazení bylo v minulosti diskutabilní, byl zařazován např. do rodu *Arabis*, aby nakonec coby druh rodu *Cardaminopsis* přešel do rodu *Arabidopsis* (Al-Shehbaz et al., 1999), buď jako samostatný druh, či jako poddruh *A. lyrata* subsp. *kamchatica*, protože byl druhu *Arabidopsis lyrata* značně morfologicky podobný. Kromě toho byl rozlišován druh *Arabis kawasakiana* Makino, někdy také označovaný jako poddruh *Arabis lyrata* subsp. *kawasakiana* (Makino) Kitam. V současné době spadají obě linie pod druh *Arabidopsis kamchatica* coby samostatné poddruhy *A. kamchatica* subsp. *kamchatica* a *A. kamchatica* subsp. *kawasakiana* (Makino) K. Shimizu & Kudoh, což bylo potvrzeno molekulárně (porovnáním sekvencí genu pro chalkon syntázu), ale také pomocí klasických karyologických a morfologických metod (Fuji, Shinji et al., 2005). Navzájem se odlišují svým rozšířením (*A. kamchatica* subsp. *kamchatica* je východoasijský poddruh zasahující svým rozšířením až na Aljašku, *A. kamchatica* subsp. *kawasakiana* se nachází v západním Japonsku) a také životním cyklem – *A. kamchatica* subsp. *kamchatica* je vytrvalý druh, zatímco *A. kamchatica* subsp. *kawasakiana* je jednoletý (Shimizu-Inatsugi et al., 2009).

Obě zmíněné linie jsou allotetraploidní, což potvrdila již zmíněná molekulární studie. Rodičovskými druhy jsou *A. lyrata* (to vysvětluje zmíněnou morfologickou podobnost) a *A. halleri*, což jsou mimochodem druhy, mezi kterými je také běžně pozorován genový tok provázený introgresí. Oba rodiče jsou diploidní a jedná se tedy o příklad homoploidní hybridizace následované genovou duplikací, vedoucí až ke vzniku allotetraploidů.

Poměrně nepřekvapivé (v souladu s informacemi zmíněnými v obecné části) se může zdát zjištění, že *A. kamchatica* je druh samosprašný, na rozdíl od obou rodičovských taxonů, které

jsou striktně cizosprašné. Některé důvody, proč se u polyploidů často vyvinula schopnost samosprašení, byly již popsány výše.

Samotný vznik této allotetraploidní linie není zcela do detailů objasněn. Zmíněná allopolyploidizační událost byla rekonstruována za pomoci analýzy přítomných haplotypů a tak bylo odhaleno několik haplotypů asijského poddruhu *A. halleri* subsp. *gemmifera*. Vysoký počet haplotypů naznačuje, že u vzniku druhu zřejmě stálo více takových polyploidizačních událostí, na nichž se podílel větší počet jedinců zmíněného poddruhu *A. halleri* subsp. *gemmifera*. Podobný efekt (velký počet haplotypů) však mohl být kromě polyploidizační události způsoben také introgresivní hybridizací mezi jedinci různých ploidních úrovní (diploidů a tetraploidů).

Nalezení některých stejných haplotypů u jistých linií *A. kamchatica* jako u *A. lyrata* vypovídá o recentním genovém toku (tyto haplotypy se totiž u ostatních linií *A. kamchatica* nenachází, k jejich přenosu tak muselo dojít až po oné první allopolyploidizační události), celý systém je tak zřejmě dynamičtější, než se může zdát na první pohled. Samozřejmě je ale nalezení takových haplotypů možné vysvětlit další nezávislou allopolyploidizační událostí s podobnou linií *A. halleri* subsp. *gemmifera*, jaká stála u dřívější allopolyploidizační události (případně u více takových událostí).

Nezpochybnitelné je ovšem zjištění, že poddruh *A. kamchatica* subsp. *kawasakiana* vznikl v rámci polyploidizační události zcela nezávislé od vzniku ostatních polyploidních jedinců. Závěrem se tak hodí znovu poznamenat, že druh *A. kamchatica* představuje pestrý systém, při jehož vzniku se nepochybně uplatnilo několik nezávislých polyploidizačních událostí – nejméně dvě, vedoucí ke vzniku samostatných poddruhů, ale vysoký počet haplotypů ukazuje na možný větší počet takových událostí. Není ale možné ani vyloučit možný vliv introgrese (Shimizu-Inatsugi et al., 2009).

### **3. 5. *Arabidopsis suecica***

*Arabidopsis suecica* je skandinávský tetraploid vzniklý křížením *A. thaliana* a *A. arenosa*, jedná se tedy o allopolyploida. Tato skutečnost byla poprvé naznačena Hylanderem (Hylander, 1957) a posléze byla potvrzena pomocí molekulárních metod (Kamm et al., 1995; O’Kane et al., 1996). Zajímavým fenoménem je jeho samosprašnost (o problematice samosprašnosti v souvislosti s přechody na vyšší ploidní úrovně již bylo pojednáno výše). Nejedná se o absolutní samosprašnost, tu známe z rodičovského druhu *A. thaliana*. Druhý

rodič je oproti tomu zcela cizosprašný. Okolnosti vzniku tohoto allopolyploida nejsou ještě zcela známy, situaci komplikuje například skutečnost, že jeden z rodičovských druhů se na většině svého evropského rozšíření vyskytuje jako tetraploid (více viz kapitola o *A. arenosa* výše), zatímco *A. thaliana* se jako tetraploid vyskytuje velice vzácně. Předpokládáme tedy, že *A. suecica* vznikl jako potomek neredukované samičí gamety *A. thaliana* (případně běžné redukované samičí gamety zmíněného vzácného tetraploida) a redukované samčí gamety tetraploidní linie *A. arenosa* (Jakobsson et al., 2006).

Z toho vychází, že *A. suecica* je allopolyploid vzniklý homoploidní hybridizací dvou tetraploidních gamet. Pozice *A. thaliana* coby maternálního rodiče byla potvrzena pokusy s uměle vzniklými hybridy *A. suecica* (Comai et al., 2000).

Pokud byla stanovována přibližná doba vzniku *A. suecica* pomocí molekulárních hodin, byla zakotvena do doby pleistocénu, kdy byl současný areál rozšíření (zahrnující Švédsko a Finsko) pokryt ledovcem, je tedy nepochybné, že ke vzniku muselo dojít jižněji a druh se do současného areálu rozšíření přesunul po ústupu glaciálu. Zajímavá je pozorovaná výrazná příbuznost *A. suecica* s liniemi *A. thaliana* v místě současného rozšíření, což naznačuje, že po ústupu ledovce mohl *A. suecica* putovat směrem na sever spolu s jedním ze svých rodičovských druhů (Jakobsson et al., 2006). Další zajímavostí je pozorovaný genový silencing, který zřejmě provází vznik všech nových allopolyploidních linií (Comai et al., 2000).

### **3. 6. Introgresní zóna styku druhů *Arabidopsis arenosa* a *A. lyrata***

#### **3. 6. 1. Hybridní zóny**

Následující oddíl bude věnován hybridním zónám, tedy místům, kde dochází ke styku dvou křížících se druhů (případně poddruhů či cytotypů). Po tomto obecném úvodu pak bude rovnou pojednáno o konkrétním příkladu takové zóny v rodu *Arabidopsis*.

Hybridní zónou nazýváme místo, kde dochází ke styku dvou druhů (poddruhů nebo cytotypů), které jsou rozšířené vzájemně parapatricky nebo sympatricky. V rámci této hybridní zóny, jejíž podoba se může značně odlišovat v konkrétních případech, zpravidla dochází k velmi dynamickým jevům, druhy (poddruhy, cytotypy) se kříží mezi sebou a nezdávka se nachází ve smíšených populacích, kde mohou produkovat potomky. Tito potomci zpravidla mají nižší fitness než rodičovské druhy, tedy nepředstavují závažné konkurenty pro rodičovské druhy. Nízká fitness případných hybridních potomků také

vysvětluje existenci velkých oblastí, kde se nachází jen jediný druh (poddruh, cytotyp) – hybridní linie zkrátka nemají možnost se vůči zavedeným rodičovským liniím prosadit (Dijk et al., 1992). Navíc druh (poddruh, cytotyp), který byl v původní smíšené populaci méně zastoupen, bude logicky tvořit menší množství hůře životaschopných potomků a záhy z populace vymizí (Levin, 1975). Všechny tyto fenomény tedy fungují proti zachování smíšených populací.

V některých případech mohou vznikající hybridní potomci etablovat novou stabilní a šířící se hybridní linii, která může dokonce nahradit původní smíšenou populaci, pokud v ní nebude zavedena dost účinná selekce proti hybridům. Hybridi se ale mohou prosadit i bez ohrožení původní populace, pokud obsadí jinou ekologickou niku, než mají oba jejich rodiče (Lihová et al., 2007).

Třetí možností je, že hybridní potomci nevznikají, neboť mezi rodičovskými druhy existuje více či méně účinná reprodukční bariéra umožňující stabilní soužití druhů (poddruhů, cytotypů) ve smíšené populaci vedle sebe. Takovou bariérou může například být posun v době kvetení (Dijk et al., 1992) nebo segregace do odlišných nik podle ekologických gradientů (viz výše) (Fowler & Levin, 1984). V takových případech mohou vznikat stabilní smíšené populace (Felber-Girard et al., 1996).

Z předchozího výkladu je tak zřejmé, že konkrétní podoba hybridní zóny se bude značně odlišovat případ od případu a kromě vlastností obou stýkajících se druhů bude značně odvislá také od charakteru prostředí a jeho heterogenity. Kontaktní zóna tak může i nemusí obsahovat smíšené populace, v nichž se dále mohou nacházet hybridní jedinci s intermediárními znaky oproti rodičovským druhům. Může mít charakter mozaiky (tato mozaika může být odvislá od heterogenity habitatu, kdy bude každý z druhů preferenčně obsahovat konkrétní výhodnější stanoviště) nebo může být souvislá, uspořádaná podle lineárních trendů introgrese nebo hybridizaci (i co se genetického a fenotypického složení jedinců týče). Takové trendy, případně zákonitosti uspořádání mozaikovitě zóny, pak mohou kopírovat některé z ekologických gradientů prostředí (Husband & Schemske, 1998; Levin, 2004).

Nyní budou popsány některé konkrétní případy hybridních zón různých druhů rostlin ze střední Evropy.

V Evropě nacházíme tři linie druhu *Lonicera nigra* L. (Caprifoliaceae). První z nich je dobře geograficky oddělen (nachází se v Pyrenejích) již od poslední doby ledové (pyrenejské refugium nehrálo žádnou roli v postglaciální kolonizaci Evropy tímto druhem). Zbylé dva,



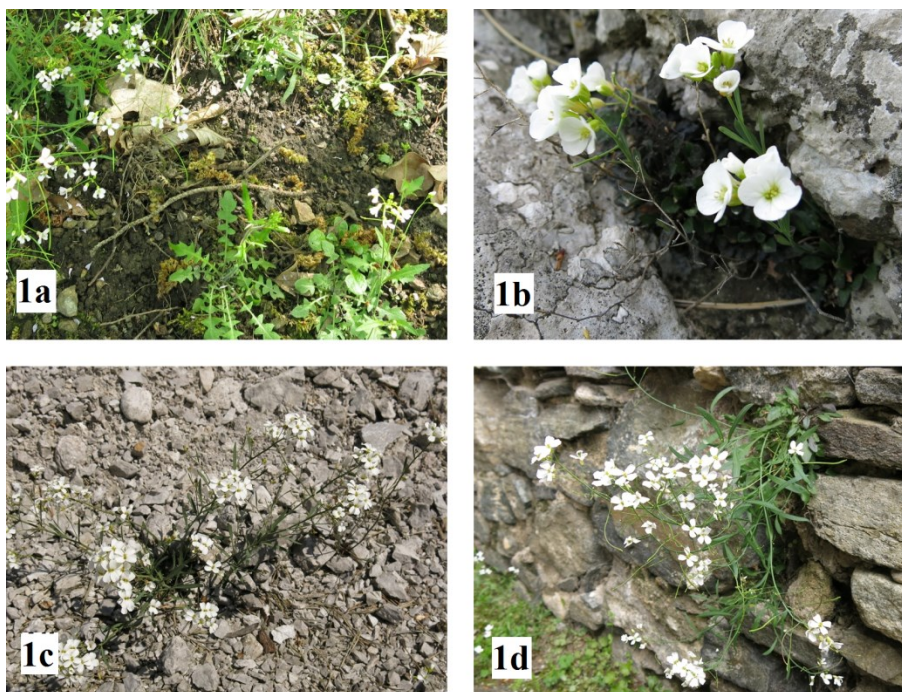
jejichž postglaciální migrační historie je komplikovanější, představují dvě geograficky i geneticky oddělené skupiny (alpská a balkánsko-karpatská) a setkávají se v údolí řeky Dunaj. Zde leží kontaktní zóna, kde se nachází smíšené populace obou linií a také populace, kde nacházíme intermediární fenotypy (Daneck et al., 2011). Podobná kontaktní zóna ve stejné oblasti leží i pro druh *Rosa pendulina* L. (Rosaceae), jak ukázala analýza chloroplastové DNA (Fer et al., 2007). Lokalizace kontaktní zóny (introgresní zóny) se ale v tomto druhu poněkud liší dle použitých markerů (konkrétně záleží, zda se použily markery na chloroplastové či jaderné DNA). Vymapování této zóny podle AFLP posunuje zónu poněkud jižněji (k jižnímu okraji Alp) oproti zmíněnému vymapování podle chloroplastové DNA. To naznačuje, že údolí řeky Dunaj nebylo dostatečnou bariérou pro případné postglaciální šíření tohoto druhu. Přesná podoba kontaktní zóny ale nebyla odhalena pro nedostatečnou hustotu terénních sběrů (Daneck et al., 2015). Podobná kontaktní zóna ve střední Evropě byla odhalena i pro druh *Festuca pratensis* Huds. (Poaceae), kde se opět jednalo o styk linií pocházejících z odlišného glaciálního refugia (Fjellheim et al., 2006).

### **3. 6. 2. Introgresní zóny druhů *A. arenosa* a *A. petraea* (= *A. lyrata* subsp. *petraea*) ve střední Evropě**

Výše byly popsány dva hybridní druhy rodu *Arabidopsis*, konkrétně *A. kamchatica* a *A. suecica*. Třetí taková hybridní linie (zda se opravdu jedná o hybridní linii na úrovni druhu, musí být teprve potvrzeno) se nachází v Rakousku, konkrétně v regionu Wachau v údolí řeky Dunaj a přilehlých oblastech. Celý region byl výrazně modelován pleistocenními glaciálními cykly a v současnosti je významným centrem diverzity pro druhy *A. arenosa* a *A. lyrata* (konkrétně tedy evropský poddruh *A. lyrata* subsp. *petraea*) (Schmickl & Koch, 2011). Co se týče ploidních úrovní – nachází se zde výhradně tetraploidní *A. arenosa*. *A. lyrata* subsp. *petraea* se v oblasti nachází jako diploidní i tetraploidní cytotyp (ač existence tetraploidů nebyla v této oblasti dlouho známá; Polatschek, 1966).

Hybridizací těchto druhů vzniká tetraploidní hybrid, o kterém bude dále řeč (viz obrázek 1). Je třeba upozornit na skutečnost, že ač jsou rodičovské druhy dobře definovány na diploidní úrovni (odlišný tvar druhého stonkového listu a jiná podoba odění na adaxiální vrstvě růžicových listů), na úrovni tetraploidní řada jejich morfologických znaků splývá, což může být způsobeno introgresí, kterou oba, poměrně mladé, druhy procházeli již od svého vzniku (cca před pěti miliony let) a která dále pokračuje. Hypotéza předpokládá, že tato

sekundární zóna styku obou druhů vznikla po proměnách klimatu po ústupu posledního glaciálu (Schmickl & Koch, 2011). Klimatické oscilace související se střídáním glaciálů a interglaciálů způsobily narušení (disturbance) prostředí v regionu Wachau a umožnili tak hybridní speciaci.



**Obrázek 1: Rostliny *Arabidopsis* z rakouské introgresní lokality (a – *Arabidopsis arenosa*, b – *Arabidopsis lyrata*, c – hybrid z Předalpí, d – hybrid z Wachau) Autor fotografií: Roswitha Elisabeth Schmickl**

Přesný způsob vzniku hybridů nebyl zatím zcela přesně objasněn, není ani jisté, zda rodičovské druhy hybridizovali na diploidní nebo tetraploidní úrovni. Analýza jaderných mikrosatelitů nicméně ukázala především jednosměrný genový tok z pylových zrn *A. arenosa* do mateřských rostlin *A. lyrata* subsp. *petraea*. Podobná je situace u *A. suecica* (genový tok z pylu *A. arenosa* do rostlin *A. thaliana*) a *A. kamchatica* (otcem *A. halleri* a matkou *A. lyrata*), což naznačuje, že může existovat jistá determinace každého z druhů k roli akceptora (*A. lyrata*) či donora pylu (*A. arenosa*) (Schmickl & Koch, 2011).

Tak jako u řady jiných modelových systémů, předpokládá se i u této rakouské lokality opakovaný vznik hybridů. Analýza odhalila staré hybridní linie, pocházející zřejmě z původních setkání druhů v rámci pleistocénních glaciálních cyklů (populace z východního předhůří Alp), ale také linie, kde zřejmě hybridní linie vznikly recentně (oblast severního Wachau). V tomto případě je také známo, že hybridní linie vznikla hybridizací rodičů na tetraploidní úrovni, čemuž odpovídá i současné rozmištnění cytotypů v okolním území – v blízkosti se nachází pouze tetraploidi (Schmickl & Koch, 2011).

Při detailním studiu genového toku v rámci lokality nebyla potvrzena možnost genového toku mezi diploidním *A. arenosa* a diploidním *A. lyrata* subsp. *petraea*, což může být způsobeno geografickou izolací obou druhů. Byl však potvrzen genový tok některými směry napříč ploidními úrovněmi stejného druhu a také mezi tetraploidy navzájem (v tomto případě oběma směry). Polyploidizace (ve smyslu autopolyploidizace) tak může být prostředkem bránícím negativním okolnostem případné mezidruhové hybridizace (Jørgensen et al., 2011).

#### **4. Praktická část**

##### **4. 1. Stručný přehled navržené metodiky**

V rámci své diplomové práce budu zpracovávat data z populací *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea*, *A. arenosa* a hybridních/introgresních populací obou druhů v Rakousku a přilehlém kontextu střední Evropy. Na každé lokalitě bude odebráno nejméně 20 jedinců (10 určených pro účely morfometrické analýzy a 10 na molekulární techniky a průtokovou cytometrii). Pro každý set dat (morfometrický a molekulární) tak budou použita data z jiných rostlin. Důvodem je snaha vyvarovat se znehodnocení herbářových položek podstatných pro morfometrickou analýzu při odběru materiálu pro jiné analýzy. Dále budou na každé lokalitě odebírána ekologická data (viz níže).

Terénní sběr materiálu je plánován do dvou vegetačních sezón. První skupina sběrů proběhla v dubnu 2016, byly sesbírány nejvýznamnější lokality v Rakousku. A dále některé lokality maďarské, německé a moravské (viz obrázek 2). Prioritou bylo získání dostatečného materiálu hybridních jedinců (Wachau, Předalpi) ve velmi podrobném rozlišení, další sampling „čistých linií“ *A. arenosa* a *A. lyrata* subsp. *petraea* si kladl za cíl získat co nejdlejší skupiny sousedící s introgresní lokalitou se zaměřením na získání materiálu z více typů substrátu (pro podchycení případného vlivu ekologických faktorů – např. složení substrátu na zastoupení sledovaných linií, případně jejich morfologii).



**Obrázek 2: Plán terénních sběrů** (modře populace diploidního *A. lyrata* subsp. *petraea*, žlutě populace tetraploidního *A. lyrata* subsp. *petraea*, zeleně populace tetraploidního *A. arenosa*) Zdroj: maps.google.com

V roce 2016 budou následovat terénní sběry v České republice a případné další sběry v Rakousku (o konkrétních sběrech bude rozhodnuto podle prvotních výsledků analýz).

Při zpracování nasbíraného materiálu budou použity všechny základní aspekty, které je možno při studiu diverzity cévnatých rostlin použít – ekologické, morfologické i molekulární. Co se ekologické stránky problematiky týče – na každé lokalitě byl zaznamenán fytoecologický snímek o rozměrech 3x3 metry, pokryvnost kamením, vegetací a zeminou v okolí každého jedince *Arabidopsis* a byl odebrán vzorek substrátu pro pozdější analýzu. Pro potřeby morfometrické analýzy bude použito nejméně 10 jedinců z populace. Vyhodnocováno bude zhruba 37 znaků se zvláštním zaměřením na znaky na listech přízemní růžice (hlavně velikost, tvar a odění), druhém stonkovém listu a jednotlivých částech květu (zejména velikost a tvar korunních lístků). Pro molekulární studie bude použito dalších nejméně 10 jedinců z populace. Vhodná molekulární metoda ještě nebyla definitivně vybrána, ale pravděpodobně bude využita metoda RAD sekvenování, která již byla úspěšně zavedena pro druh *A. arenosa*. Pro většinu jedinců budou uloženy také herbářové položky celých rostlin. Všichni jedinci budou také změřeni metodou průtokové cytometrie pro ověření ploidní úrovně.

#### 4. 2. Předběžné testování některých znaků

Pro účely studie bude potřeba vyhodnotit stálost morfologických znaků pro pozdější potřebu vytvoření jednoznačného určovacího klíče pro odbornou veřejnost. Z toho důvodu bude třeba otestovat také stabilitu znaků rodičovských druhů. Vytvořený seznam 37 znaků byl

na podzim roku 2015 v rámci projektu GAČR otestován na setu asi 400 rostlin druhu *A. arenosa* z karpatské části areálu rozšíření. Tyto rostliny byly pěstovány ve dvou odlišných teplotních režimech. Analýza dat tak může ukázat, které znaky rodu jsou závislé na ekologických podmínkách a které vypovídají o genotypu, pro pozdější použití při fenotypickém studiu jedinců více druhů z rakouské introgresní zóny.

#### 4. 3. Otázky kladené do navazující magisterské práce

- Jaká je stabilita morfologických znaků rodičovských druhů v přirozených a umělých podmínkách?
- Jaká je stabilita morfologických znaků introgresních hybridů v přirozených a umělých podmínkách?
- Do jaké míry odpovídá genetická variabilita introgresní zóny její morfologickému morfologické variabilitě?
- Pokud budou vyzorovány nějaké trendy (genetické či morfologické), jsou tyto v korelaci s ekologickými gradienty (teplota, srážky, nadmořská výška, zeměpisná šířka, substrát)?
- Jaká je podoba hybridní zóny (je uspořádána podle převažujícího ekologického gradientu, či má mozaikovitý charakter)?
- Je prokazatelná introgrese *A. lyrata* subsp. *petraea* nebo *A. arenosa* nebo hybridů předchozích s *A. halleri*? Je tato introgrese významná?

#### 5. Použitá literatura

- Al-Shehbaz, I.A. (1988): The genera of Arabideae (Cruciferae; Brassicaceae) in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 69: 85–166.
- Al-Shehbaz, I.A., O’Kane, S.L. (2002): Taxonomy and phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). The *Arabidopsis* Book 1: e0001, American Society of Plant Biologists .
- Al-Shehbaz, I.A., O’Kane, S.L., Price, R.A. (1999): Generic placement of species excluded from *Arabidopsis* (Brassicaceae). *Novon* 9: 296–307.
- Alvarez, M., Deil, U. (2015): Vascular plant assemblages of ephemeral wetland vegetation along the Mediterranean-temperate gradient in Chile. *Gayana Botanica* 72: 177–191.
- Aucour, A.M., Pichat, S., Macnair, M.R., and Oger, P. (2011): Fractionation of stable zinc isotopes in the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and nonaccumulator *Arabidopsis petraea*. *Environmental Science & Technology* 45: 9212–9217.

- Baack, E.J., and Rieseberg, L.H. (2008):** A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Current Opinion in Genetics & Development* 17: 513–518.
- Baduel, P., Arnold, B., Weisman, C.M., Hunter, B., and Bomblies, K. (2016):** Habitat-associated life history and stress-tolerance variation in *Arabidopsis arenosa*. *Plant Physiology* 171: 437–451.
- Baker, H.G. (1967):** Support for Baker's Law-As a Rule. *Evolution* 21: 853–856.
- Barringer, B.C. (2007):** Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. *American Journal of Botany* 94: 1527–1533.
- Beaulieu, J., Jean, M., and Belzile, F. (2009):** The allotetraploid *Arabidopsis thaliana*-*Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants. *Molecular Genetics and Genomics* 281, 421–435.
- Beest, M. te, Roux, J.J.L., Richardson, D.M., Brysting, A.K., Suda, J., Kubešová, M., Pyšek, P. (2011):** The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany* 109: 19–45.
- Beilstein, M.A., Al-Shehbaz, I.A., Kellogg, E.A. (2006):** Brassicaceae phylogeny and trichome evolution. *American Journal of Botany* 93: 607–619.
- Bleeker, W. (2003):** Hybridization and *Rorippa austriaca* (Brassicaceae) invasion in Germany. *Molecular Ecology* 12: 1831–1841.
- Brennan, A.C., Bridle, J.R., Wang, A.-L., Hiscock, S.J., Abbott, R.J. (2009):** Adaptation and selection in the *Senecio* (Asteraceae) hybrid zone on Mount Etna, Sicily. *New Phytologist* 183: 702–717.
- Briggs D, Walters SM. (2001):** Proměnlivost a evoluce rostlin. 1. české vyd. Olomouc: Univerzita Palackého.
- Buerkle, C.A., Morris, R.J., Asmussen, M.A., Rieseberg, L.H. (2000):** The likelihood of homoploid hybrid speciation. *Heredity* 84: 441–451.
- Buggs, R.J.A., Renny-Byfield, S., Chester, M., Jordon-Thaden, I.E., Viccini, L.F., Chamala, S., Leitch, A.R., Schnable, P.S., Barbazuk, W.B., Soltis, P.S., et al. (2012):** Next-generation sequencing and genome evolution in allopolyploids. *American Journal of Botany* 99: 372–382.
- Cebecauer, T., Šúri, M. (2015):** Typical Meteorological Year data: SolarGIS approach. In: Wang, Z. (ed.), *International Conference on Concentrating Solar Power and Chemical Energy Systems, Solarpaces 2014, 1958–1969*.
- Cheptou, P.-O. (2011):** Clarifying Baker's Law. *Annals of Botany* 109: 633–641.
- Choler, P., Michalet, R. (2002):** Niche differentiation and distribution of *Carex curvula* along a bioclimatic gradient in the Southwestern Alps. *Journal of Vegetation Science* 13: 851–858.
- Clauss, M.J., Koch, M.A. (2006):** Poorly known relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science* 11: 449–459.
- Clauss, M.J., Mitchell-Olds, T. (2006):** Population genetic structure of *Arabidopsis lyrata* in Europe. *Molecular Ecology* 15: 2753–2766.
- Comai, L., Tyagi, A.P., Winter, K., Holmes-Davis, R., Reynolds, S.H., Stevens, Y., Byers, B. (2000):** Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *The Plant Cell* 12: 1551–1568.
- Dahlin, K.M., Asner, G.P., Field, C.B. (2014):** Linking vegetation patterns to environmental gradients and human impacts in a mediterranean-type island ecosystem. *Landscape Ecology* 29: 1571–1585.
- Daneck, H., Abraham, V., Fér, T., Marhold, K. (2011):** Phylogeography of *Lonicera nigra* in Central Europe inferred from molecular and pollen evidence. *Preslia* 83: 237–257.

- Daneck, H., Fér, T., and Marhold Fls, K. (2015):** Glacial survival in northern refugia? Phylogeography of the temperate shrub *Rosa pendulina* L. (Rosaceae): AFLP vs. chloroplast DNA variation. *Biological Journal of the Linnean Society* 00: 00-00.
- Dart, S., Kron, P., Mable, B.K. (2004):** Characterizing polyploidy in *Arabidopsis lyrata* using chromosome counts and flow cytometry. *Canadian Journal of Botany - Revue Canadienne de Botanique* 82: 185–197.
- D’Hont, A., Denoeud, F., Aury, J.-M., Baurens, F.-C., Carreel, F., Garsmeur, O., Noel, B., Bocs, S., Droc, G., Rouard, M., et al. (2012):** The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* 488: 213–217.
- Dijk, P.V., Hartog, M., Delden, W.V. (1992):** Single cytotype areas in autopolyploid *Plantago media* L. *Biological Journal of the Linnean Society* 46: 315–331.
- Dolezel, J., Greilhuber, J., Suda, J. (2007):** Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes. New York: John Wiley & Sons.
- Doyle, J.J., Egan, A.N. (2010):** Dating the origins of polyploidy events. *New Phytologist* 186: 73–85.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., Rauscher, J.T., Brown, A.H.D. (2004):** Evolution of the perennial soybean polyploid complex (*Glycine* subgenus *Glycine*): A study of contrasts. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 583–597.
- Ellenberg, H. (1988):** Vegetation ecology of Central Europe. Cambridge: Cambridge University Press.
- Estep, M.C., McKain, M.R., Vela Diaz, D., Zhong, J., Hodge, J.G., Hodkinson, T.R., Layton, D.J., Malcomber, S.T., Pasquet, R., Kellogg, E.A. (2014):** Allopolyploidy, diversification, and the Miocene grassland expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 15 149–15 154.
- Facon, B., Jarne, P., Pointier, J.P., David, P. (2005):** Hybridization and invasiveness in the freshwater snail *Melanoides tuberculata*: hybrid vigour is more important than increase in genetic variance. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 524–535.
- Farjon, A. (2011):** Flora indicativa Ökologische Zeigerwerte und biologische Kennzeichen zur Flora der Schweiz und der Alpen / Ecological indicator values and biological attributes of the flora of Switzerland and the Alps. *Botanical Journal of the Linnean Society* 167: 478–479.
- Felber-Girard, M., Felber, F., Buttler, A. (1996):** Habitat differentiation in a narrow hybrid zone between diploid and tetraploid *Anthoxanthum alpinum*. *The New Phytologist* 133: 531–540.
- Fér, T., Vašák, P., Vojta, J., Marhold, K. (2007):** Out of the Alps or Carpathians? Origin of Central European populations of *Rosa pendulina*. *Preslia* 79: 367–376.
- Fjellheim, S., Rognli, O.A., Fosnes, K., Brochmann, C. (2006):** Phylogeographical history of the widespread meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) inferred from chloroplast DNA sequences. *Journal of Biogeography* 33: 1470–1478.
- Fowler, N.L., and Levin, D.A. (1984):** Ecological constraints on the establishment of a novel polyploid in competition with its diploid progenitor. *The American Naturalist* 124: 703–711.
- Fuji, S., Kudoh, H., Shimizu, K. K., Watanabe, K., Marhold, K. (2005):** *Arabidopsis kamchatica* (Fisch. ex DC.) K. Shimizu & Kudoh and *A. kamchatica* subsp. *kawasakiana* (Makino) K. Shimizu & Kudoh, new combinations. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 56: 163-172.
- Griffin, P.C., Willi, Y. (2014):** Evolutionary shifts to self-fertilisation restricted to geographic range margins in North American *Arabidopsis lyrata*. *Ecology Letters* 17: 484–490.

- Halverson, K., Heard, S.B., Nason, J.D., Stireman, J.O. (2008).** Origins, distribution, and local co-occurrence of polyploid cytotypes in *Solidago altissima* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 95: 50–58.
- Hill, M.O., Roy, D.B., Mountford, J.O., Bunce, R.G.H. (2000):** Extending Ellenberg's indicator values to a new area: an algorithmic approach. *Journal of Applied Ecology* 37: 3–15.
- Hilu, K.W. (1993):** Polyploidy and the evolution of domesticated plants. *American Journal of Botany* 80: 1494–1499.
- Hodálová, I. (1999):** Multivariate analysis of the *Senecio nemorensis* group (Compositae) in the Carpathians with a new species from the East Carpathians. *Folia Geobotanica* 34: 321–335.
- Hodálová, I. (2002):** A new hybrid *Senecio x slovacus* from the *S. nemorensis* group (Compositae) in the West Carpathians. *Biologia* 57: 75–82.
- Hodálová, I., Marhold, K. (1996):** Sympatric populations of *Senecio ovatus* subsp. *ovatus*, *S. germanicus* subsp. *germanicus* (Compositae) and their hybrid in the Carpathians and the adjacent part of Pannonia. I. Multivariate morphometric study. *Flora* 191: 283–290.
- Hodálová, I., Mered'a, P., Kučera, J., Marhold, K., Kempa, M., Olšavská, K., Slovák, M. (2015):** Origin and systematic position of *Jacobaea vulgaris* (Asteraceae) octoploids: genetic and morphological evidence. *Plant Systematics and Evolution* 301: 1517–1541.
- Hodálová, I., Valachovič, M. (1996):** Sympatric populations of *Senecio ovatus* subsp. *ovatus*, *S. germanicus* subsp. *germanicus* (Compositae) and their hybrid in the Carpathians and the adjacent part of Pannonia. II. Synecological differentiation and distribution. *Flora* 191: 291–302.
- Hodálová, I., Grulich, V., Horová, L., Valachovič, M., Marhold, K. (2007):** Occurrence of tetraploid and octoploid cytotypes in *Senecio jacobaea* ssp. *jacobaea* (Asteraceae) in Pannonia and the Carpathians. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 231–242.
- Hohmann, N., Schmickl, R., Chiang, T.-Y., Lučanová, M., Kolář, F., Marhold, K., Koch, M.A. (2014):** Taming the wild: resolving the gene pools of non-model *Arabidopsis* lineages. *BMC Evolutionary Biology* 14: 224.
- Hülber, K., Sonnleitner, M., Flatscher, R., Berger, A., Dobrovsky, R., Niessner, S., Nigl, T., Schneeweiss, G.M., Kubešová, M., Rauchová, J., et al. (2009):** Ecological segregation drives fine-scale cytotype distribution of *Senecio carniolicus* in the Eastern Alps. *Preslia* 81: 309–319.
- Hülber, K., Sonnleitner, M., Suda, J., Krejčíková, J., Schönswetter, P., Schneeweiss, G.M., Winkler, M. (2015):** Ecological differentiation, lack of hybrids involving diploids, and asymmetric gene flow between polyploids in narrow contact zones of *Senecio carniolicus* (syn. *Jacobaea carniolica*, Asteraceae). *Ecology and Evolution* 5: 1224–1234.
- Hurka, H., Neuffer, B. (1997):** Evolutionary processes in the genus *Capsella* (Brassicaceae). *Plant Systematics and Evolution* 206: 295–316.
- Husband, B.C., and Sabara, H.A. (2004):** Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist* 161: 703–713.
- Husband, B.C., Schemske, D.W. (1998):** Cytotype distribution at a diploid-tetraploid contact zone in *Chamerion (Epilobium) angustifolium* (Onagraceae). *American Journal of Botany* 85: 1688–1694.
- Hylander (1957):** *Cardaminopsis suecica* (Fr.) Hiit., a northern amphidiploid species. *Bulletin du Jardin botanique de l'État a Bruxelles* 27: 591–604.
- Jakobsson, M., Hagenblad, J., Tavaré, S., Säll, T., Halldén, C., Lind-Halldén, C., Nordborg, M. (2006):** A unique recent origin of the allotetraploid species *Arabidopsis suecica*: Evidence from nuclear DNA markers. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1217–1231.



- Jørgensen, M.H., Ehrich, D., Schmickl, R., Koch, M.A., Brysting, A.K. (2011):** Interspecific and interploidal gene flow in Central European *Arabidopsis* (Brassicaceae). *BMC Evolutionary Biology* 11: 346.
- Kamm, A., Galasso, I., Schmidt, T., Heslop-Harrison, J.S. (1995):** Analysis of a repetitive DNA family from *Arabidopsis arenosa* and relationships between *Arabidopsis* species. *Plant Molecular Biology* 27: 853–862.
- Karl, R., Koch, M.A. (2014):** Phylogenetic signatures of adaptation: The *Arabis hirsuta* species aggregate (Brassicaceae) revisited. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 16: 247-264
- Kiefer, M., Schmickl, R., German, D.A., Mandáková, T., Lysák, M.A., Al-Shehbaz, I.A., Franzke, A., Mummenhoff, K., Stamatakis, A., Koch, M.A. (2014):** BrassiBase: introduction to a novel knowledge database on Brassicaceae evolution. *Plant Cell Physiology* 55: e3.
- King, R.C., Stansfield, W.D., Mulligan, P.K. (2006):** A dictionary of genetics. Oxford: Oxford University Press).
- Kirchheimer, B., Schinkel, C.C.F., Dellinger, A.S., Klatt, S., Moser, D., Winkler, M., Lenoir, J., Caccianiga, M., Guisan, A., Nieto-Lugilde, D., et al. (2016):** A matter of scale: apparent niche differentiation of diploid and tetraploid plants may depend on extent and grain of analysis. *Journal of Biogeography* 43: 716–726.
- Koch, M.A., German, D.A. (2013):** Taxonomy and systematics are key to biological information: *Arabidopsis*, *Eutrema* (*Thellungiella*), *Noccaea* and *Schrenkiella* (Brassicaceae) as examples. *Frontiers in Plant Science* 4:267. 10.3389/fpls.2013.00267.
- Koch, M.A., Matschinger, M. (2007):** Evolution and genetic differentiation among relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 6272–6277.
- Koch, M., Bishop, J., Mitchell-Olds, T. (1999):** Molecular systematics and evolution of *Arabidopsis* and *Arabis*. *Plant Biology* 1: 529–537.
- Koch, M.A., Wernisch, M., Schmickl, R. (2008):** *Arabidopsis thaliana*'s wild relatives: an updated overview on systematics, taxonomy and evolution. *Taxon* 57: 933-943.
- Kolář, F., Stech, M. (2009):** Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. *Annals of Botany* 103: 963–974.
- Kolář, F., Lučanová, M., Záveská, E., Fuxová, G., Mandáková, T., Španiel, S., Senko, D., Svitok, M., Kolník, M., Gudžinskas, Z., et al. (2015):** Ecological segregation does not drive the intricate parapatric distribution of diploid and tetraploid cytotypes of the *Arabidopsis arenosa* group (Brassicaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, doi 10.1111/bij.12479.
- Kolník, M., and Marhold, K. (2006):** Distribution, chromosome numbers and nomenclature conspect of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) in the Carpathians. *Biologia* 61: 41–50.
- Kron, P., Suda, J., Husband, B.C. (2007):** Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 847–876.
- Larson, J.L. (1968):** The species concept of Linnaeus. *Isis* 59: 291–299.
- Leong-Škorničková, J., Šída, O., Jarolímová, V., Sabu, M., Fér, T., Trávníček, P., Suda, J. (2007):** Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae). *Annals of Botany* 100: 505–526.
- Levin, D.A. (1975):** Minority cytotype exclusion in local plant populations. *Taxon* 24: 35–43.
- Levin, D.A. (1983):** Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist* 122: 1–25.

- Levin, D.A. (2004):** Ecological speciation: Crossing the divide. *Systematic Botany* 29: 807–816.
- Lihova, J., Marhold, K. (2003):** Chromosome numbers and distribution of *Cardamine amara* (Brassicaceae) in Slovenia. *Biologia* 58: 37–43.
- Lihová, J., Marhold, K. (2006):** Phylogenetic and diversity patterns in *Cardamine* (Brassicaceae) – a genus with conspicuous polyploid and reticulate evolution. In: Sharma A. K., Sharma A. (eds.), *Plant genome: biodiversity and evolution*, vol. 1C: Phanerogams (Angiosperms - Dicotyledons). Enfield: Science Publishers, Inc., 149-186.
- Lihová, J., Shimizu, K.K., Marhold, K. (2006):** Allopolyploid origin of *Cardamine asarifolia* (Brassicaceae): incongruence between plastid and nuclear ribosomal DNA sequences solved by a single-copy nuclear gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 759–786.
- Lihová, J., Kučera, J., Perný, M., Marhold, K. (2007):** Hybridization between two polyploid *Cardamine* (Brassicaceae) species in north-western Spain: Discordance between morphological and genetic variation patterns. *Annals of Botany* 99: 1083–1096.
- Lippman, Z.B., Zamir, D. (2007):** Heterosis: revisiting the magic. *Trends in Genetics* 23: 60–66.
- Loureiro, J., Trávníček, P. (2010).** The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia* 82: 3–21.
- Lövkvist, B. (1956):** The *Cardamine pratensis* complex. Outline of its cytogenetics and taxonomy. *Symbolae Botanicae Upsalienses* 14: 1-131.
- Lowe, A.J., Abbott, R.J. (2015):** Hybrid swarms: catalysts for multiple evolutionary events in *Senecio* in the British Isles. *Plant Ecology & Diversity* 8: 449–463.
- Lysák, M.A., Pecinka, A., Schubert, I. (2003):** Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species. *Chromosome Research* 11: 195–204.
- Lysák, M.A., Berr, A., Pecinka, A., Schmidt, R., McBreen, K., Schubert, I. (2006):** Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 5224–5229.
- Mable, B.K. (2004a):** “Why polyploidy is rarer in animals than in plants”: myths and mechanisms. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 453–466.
- Mable, B.K. (2004b):** Polyploidy and self-compatibility: is there an association? *New Phytologist* 162: 803–811.
- Mable, B.K. (2004c):** Evolutionary genetics of self-incompatibility in a new “model” plant: *Arabidopsis lyrata*. In: Cronk, Q. C. B. et al., *Plant adaptation: Molecular genetics and ecology*. Ottawa: National Research Council Canada, 127-134.
- Mable, B.K., Beland, J., Di Berardo, C. (2004):** Inheritance and dominance of self-incompatibility alleles in polyploid *Arabidopsis lyrata*. *Heredity* 93: 476–486.
- Mallet, J. (2005):** Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution* 20: 229–237.
- Mandáková, T., Kovařík, A., Zozomová-Lihová, J., Shimizu-Inatsugi, R., Shimizu, K.K., Mummenhoff, K., Marhold, K., Lysák, M.A. (2013):** The more the merrier: recent hybridization and polyploidy in *Cardamine*. *Plant Cell* 25: 3280–3295.
- Marhold, K. (1999):** Taxonomic evaluation of the tetraploid populations of *Cardamine amara* (Brassicaceae) from the Eastern Alps and adjacent areas. *Botanica Helvetica* 109: 67–84.
- Marhold, K., Lihová, J. (2006):** Polyploidy, hybridization and reticulate evolution: lessons from the Brassicaceae. *Plant Systematics and Evolution* 259: 143–174.

- Marhold, M., Huthmann, M., Hurka, H. (2002):** Evolutionary history of the polyploid complex of *Cardamine amara* (Brassicaceae): isozyme evidence. *Plant Systematics and Evolution* 233: 15–28.
- Marhold, K., Kudoh, H., Pak, J.-H., Watanabe, K., Španiel, S., Lihová, J. (2010):** Cytotype diversity and genome size variation in eastern Asian polyploid *Cardamine* (Brassicaceae) species. *Annals of Botany* 105: 249–264.
- McNeill, J., Barrie, F. R., Buck, W. R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'homme van Reine, W. F., Smith, G. F., Wiersema, J. H., Turland, N. J. (eds.) (2012):** International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code): adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. – Königstein, Koeltz Scientific Books [Regnum Vegetabile 154: 1-208].
- Mered'a, P., Kučera, J., Marhold, K., Senko, D., Slovák, M., Svitok, M., Šingliarová, B. & Hodálová, I. (2016):** Ecological niche differentiation between tetra- and octoploids of *Jacobaea vulgaris*. *Preslia* 88: 113–136.
- Měsíček, J. (1970):** Chromosome counts in *Cardaminopsis arenosa* agg. (Cruciferae). *Preslia* 42: 225–248.
- Mitchell-Olds, T. (2001):** *Arabidopsis thaliana* and its wild relatives: a model system for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 693–700.
- Mitchell-Olds, T., Al-Shehbaz, I., Koch, M., Sharbel, T.F. (2004):** Crucifer evolution in the post-genomic era. In: Henry, R. (ed.), *Plant diversity and evolution, genotypic and phenotypic variation in higher plants*, CABI Press, 119–138.
- Morgan, J. (2012):** *The Princeton guide to ecology*. Princeton: Princeton University Press.
- Muir, G., Osborne, O.G., Sarasa, J., Hiscock, S.J., Filatov, D.A. (2013):** Recent ecological selection on regulatory divergence is shaping clinal variation in *Senecio* on Mount Etna. *Evolution* 67: 3032–3042.
- Neuffer, B., Auge, H., Mesch, H., Amarell, U., Brandl, R. (1999):** Spread of violets in polluted pine forests: morphological and molecular evidence for the ecological importance of interspecific hybridization. *Molecular Ecology* 8: 365–377.
- Oberprieler, C. (1994):** Die *Senecio nemorensis*-Gruppe (Compositae, Senecioneae) in Bayern. *Berichte: Bayerische Botanische Gesellschaft* 64: 7–54.
- Oberprieler, C., Hartl, S., Schauer, K., Meister, J., Heilmann, J. (2011):** Morphological, phytochemical and genetic variation in mixed stands and a hybrid swarm of *Senecio germanicus* and *S. ovatus* (Compositae, Senecioneae). *Plant Systematics and Evolution* 293: 177–191.
- O'Kane, S.L., and Al-Shehbaz, I.A. (2003):** Phylogenetic position and generic limits of *Arabidopsis* (Brassicaceae) based on sequences of nuclear ribosomal DNA. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 90: 603.
- O'Kane, S.L., Schaal, B.A., Al-Shehbaz, I.A. (1996):** The origins of *Arabidopsis suecica* (Brassicaceae) as indicated by nuclear rDNA sequences. *Systematic Botany* 21: 559–566.
- Otto, S.P., and Whitton, J. (2000):** Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34: 401–437.
- Oyama, K. (1994):** Differentiation in phenotypic plasticity among populations of *Arabis serrata* Fr. & Sav. (Brassicaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 51: 417–432.
- Parisod, C., Holderegger, R., Brochmann, C. (2010):** Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist* 186: 5–17.

- Pauwels, M., Saumitou-Laprade, P., Holl, A.C., Petit, D., Bonnin, I. (2005):** Multiple origin of metallicolous populations of the pseudometallophyte *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) in central Europe: the cpDNA testimony. *Molecular Ecology* 14: 4403–4414.
- Pauwels, M., Vekemans, X., Godé, C., Frérot, H., Castric, V., Saumitou-Laprade, P. (2012):** Nuclear and chloroplast DNA phylogeography reveals vicariance among European populations of the model species for the study of metal tolerance, *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist* 193: 916–928.
- Polatschek, A. (1966):** Cytotaxonomische Beiträge zur Flora der Ostalpenländer, *Österreichische Botanische Zeitschrift* 113: 1–46.
- Ramsey, J., Schemske, D.W. (1998):** Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 467–501.
- Rieseberg, L., Wendel, J. (1993):** Introgression and its consequences in plants. In: Harrison, R. (ed.), *Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford: Oxford University Press, 70–109.
- Rieseberg, L.H., Willis, J.H. (2007):** Plant speciation. *Science* 317: 910–914.
- Ross-Ibarra, J., Wright, S.I., Foxe, J.P., Kawabe, A., DeRose-Wilson, L., Gos, G., Charlesworth, D., Gaut, B.S. (2008):** Patterns of polymorphism and demographic history in natural populations of *Arabidopsis lyrata*. *PLoS ONE* 3: e2411.
- Schmickl, R., Koch, M.A. (2011):** *Arabidopsis* hybrid speciation processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 14192–14197.
- Schmickl, R., Jorgensen, M.H., Brysting, A.K., Koch, M.A. (2010):** The evolutionary history of the *Arabidopsis lyrata* complex: a hybrid in the amphi-Beringian area closes a large distribution gap and builds up a genetic barrier. *BMC Evolutionary Biology* 10: 98.
- Schmickl, R., Paule, J., Klein, J., Marhold, K., and Koch, M.A. (2012):** The evolutionary history of the *Arabidopsis arenosa* complex: Diverse tetraploids mask the Western Carpathian center of species and genetic diversity. *PLOS ONE* 7: e42691.
- Shimizu-Inatsugi, R., Lihová, J., Iwanaga, H., Kudoh, H., Marhold, K., Savolainen, O., Watanabe, K., Yakubov, V.V., Shimizu, K.K. (2009):** The allopolyploid *Arabidopsis kamchatica* originated from multiple individuals of *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis halleri*. *Molecular Ecology* 18: 4024–4048.
- Slotte, T., Ceplitis, A., Neuffer, B., Hurka, H., Lascoux, M. (2006):** Intrageneric phylogeny of *Capsella* (Brassicaceae) and the origin of the tetraploid *C. bursa-pastoris* based on chloroplast and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 93: 1714–1724.
- Soltis, D.E., Rieseberg, L.H. (1986):** Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): Genetic Insights from Enzyme Electrophoresis. *American Journal of Botany* 73: 310–318.
- Soltis, P., Soltis, D.E. (2012):** Polyploidy and genome evolution. Berlin: Springer Science & Business Media.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Tate, J.A. (2004):** Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist* 161: 173–191.
- Sonnleitner, M., Flatscher, R., García, P.E., Rauchová, J., Suda, J., Schneeweiss, G.M., Hülber, K., and Schönswetter, P. (2010):** Distribution and habitat segregation on different spatial scales among diploid, tetraploid and hexaploid cytotypes of *Senecio carniolicus* (Asteraceae) in the Eastern Alps. *Annals of Botany* 106: 967 - 977.
- Sonnleitner, M., Weis, B., Flatscher, R., García, P.E., Suda, J., Krejčíková, J., Schneeweiss, G.M., Winkler, M., Schönswetter, P., Hülber, K. (2013):** Parental ploidy strongly affects offspring fitness in heteroploid crosses among three cytotypes of autopolyploid *Jacobaea carniolica* (Asteraceae). *PLOS ONE* 8: e78959.

- Stace, C.A. (1975):** Hybridization and the Flora of the British Isles. London, New York: Academic Press Inc.
- Stebbins, G.L. (1959):** The role of hybridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society* 103: 231–251.
- Suda, J., Krahulcová, A., Trávníček, P., Krahulec, F. (2006):** Ploidy level versus DNA ploidy level: An appeal for consistent terminology. *Taxon* 55: 447.
- Van Rossum, F., Bonnin, I., Fenart, S., Pauwels, M., Petit, D., Saumitou-Laprade, P. (2004):** Spatial genetic structure within a metalicolous population of *Arabidopsis halleri*, a clonal, self-incompatible and heavy-metal-tolerant species. *Molecular Ecology* 13: 2959–2967.
- Vergeer, P., Kunin, W.E. (2011):** Life history variation in *Arabidopsis lyrata* across its range: effects of climate, population size and herbivory. *Oikos* 120: 979–990.
- Wang, J., Tian, L., Lee, H.-S., Chen, Z.J. (2006):** Nonadditive regulation of FRI and FLC loci mediates flowering-time variation in *Arabidopsis* allopolyploids. *Genetics* 173: 965–974.
- White, M.A., Stubbings, M., Dumont, B.L., Payseur, B.A. (2012):** Genetics and evolution of hybrid male sterility in House Mice. *Genetics* 191: 917–934.
- Wos, G., Willi, Y. (2015):** Temperature-stress resistance and tolerance along a latitudinal cline in North American *Arabidopsis lyrata*. *PLoS One* 10: e0131808.
- Yakimowski, S.B., and Rieseberg, L.H. (2014):** The role of homoploid hybridization in evolution: a century of studies synthesizing genetics and ecology. *American Journal of Botany* 101: 1247–1258.
- Zozomová-Lihová, J., Malánová-Krásná, I., Vít, P., Urfus, T., Senko, D., Svitok, M., Kempa, M., Marhold, K. (2015):** Cytotype distribution patterns, ecological differentiation, and genetic structure in a diploid-tetraploid contact zone of *Cardamine amara*. *American Journal of Botany* 102: 1380–1395.