

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky

Charles University in Prague, Faculty of Science

Department of Botany

Doktorský studijní program: Botanika

Ph.D. study program: Botany

Autoreferát disertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis



Fylogeneze a evoluční trendy v subtribu *Hieraciinae* (Asteraceae)

Phylogeny and evolutionary trends in subtribe *Hieraciinae* (Asteraceae)

Mgr. Jaroslav Zahradníček

Školitel/Supervisor: Mgr. Jindřich Chrtěk, CSc.

Praha, 29. 5. 2017

Souhrn

Do subtribu *Hieraciinae* jsou řazeny taxonomicky složité polyploidní a většinou apomiktické rody *Hieracium* a *Pilosella*, stejně jako diploidní sexuálně se rozmnožující rod *Andryala*. Tyto rozdíly nabízí unikátní možnost porovnat evoluční trendy a procesy u blízce příbuzných skupin s odlišným zastoupením polyploidie, odlišným způsobem rozmnožování a zeměpisným rozšířením. Předložená disertační práce se zabývá pouze skupinou *Hieracium* s. str. a rodem *Andryala*; rod *Pilosella* byl studován jinými autory.

Byla stanovena velikost genomu tzv. „základních druhů“ rodu *Hieracium* s. str. (*Hieracium* podrod *Hieracium*) a naměřené hodnoty byly porovnány s výsledky fylogenetické analýzy sekvencí jaderné ribozomální DNA, ploidní úrovní, reprodukčními mechanismy a ekogeografickými faktory. Byla analyzována jak vnitrodruhová, tak mezidruhová variabilita velikosti genomu. Variabilita velikosti genomu koresponduje s výsledky molekulární fylogeneze, která oddělila tři hlavní skupiny druhů v souladu s jejich geografickým rozšířením v Evropě („západní“, „východní“ a „hybridogenní“). Monoploidní velikost genomu „západní“ skupiny je signifikantně menší než velikost genomu „východní“ skupiny. Vnitrodruhová variabilita je obecně velmi malá. Při porovnání monoploidních velikostí genomu diploidních a polyploidních rostlin byl zjištěn „genome downsizing“. Byla prokázána korelace velikosti genomu a zeměpisné délky. Korelace s jinými ekogeografickými faktory prokázána nebyla.

U rodu *Andryala* byla rekonstruována evoluční historie a stanoveny velikosti genomu. K rekonstrukci fylogenetických vztahů uvnitř rodu jsme použili tři jaderné úseky DNA (ETS, ITS a single-copy gen *sqs*) a dva chloroplastové úseky (*trnT-trnL* and *trnV-ndhC*). Zatímco analýza chloroplastových úseků potvrdila předešlé zjištění, tedy velmi vzdálenou introgresi z rodu *Pilosella*, jaderné úseky DNA ukazují na monofyletický původ rodu *Andryala*. V důsledku nízké variability obou jaderných ribozomálních a obou chloroplastových úseků DNA a vysoké míře homoplazií u nejvariabilnějšího úseku *sqs*, neumožnil žádný z použitých markerů podrobně rekonstruovat fylogenetické vztahy. Fylogenetická analýza oddělila pouze dvě bazální dobře podpořené skupiny, přičemž každá je tvořena jedním reliktním druhem *A. laevitomentosa*, *A. agardhii*. Do třetí dobře podpořené skupiny

("Major Radiation Group") spadají všechny ostatní analyzované druhy. Vztahy uvnitř této skupiny zůstaly nevyřešené. Největší velikost genomu byla stanovena u reliktních druhů (*A. laevitomentosa*, *A. agardhii*) a u dvou populací druhu *A. ragusina*. Oproti tomu dvě jiné populace druhu *A. ragusina* mají výrazně menší velikost genomu. Vyšší vnitrodruhová variabilita velikosti genomu u několika málo druhů může být vysvětlena alopatrickou speciací zahrnující ostrovní populace nebo introgresivní hybridizací.

Zvláštní pozornost byla také věnována fylogeografii a cytotypové struktuře druhu *Hieracium intybaceum*, sesterské skupině všech čtyř rodů subtribu *Hieraciinae* tvořící linii s ne úplně jasným postavením. Bylo zkoumáno 43 populací napříč celým areálem tohoto druhu (Alpy, Vogézy a Schwarzwald). Všechny populace byly podrobeny cytometrickým a molekulárním (AFLP) analýzám. Byly odhaleny dvě ploidní úrovně – diploidní a tetraploidní, které se liší reprodukčními způsoby (sexuální u diploidů, apomixe u tetraploidů, stejně jako u ostatních zástupců rodu *Hieracium* s. str.). Diploidní populace byly zjištěny napříč celými Alpami, tetraploidní populace jsou omezeny pouze na malé území západních Alp a Vogéz; ploidně smíšené populace nebyly nalezeny. Genetická variabilita je celkově velmi nízká. Bayesovská analýza našla čtyři klastry/genetické skupiny, které částečně korespondují s ploidní strukturou a geografickým rozšířením (východní vs. západní Alpy). Domníváme se, že odledněná území byla pravděpodobně kolonizována z mateřských diploidních populací západních Alp.

Summary

Subtribe *Hieraciinae* includes taxonomically intricate polyploid and mostly apomictic genera *Pilosella* and *Hieracium* as well as diploid sexual genus *Andryala*. It offers a unique possibility to compare evolutionary trends and processes in closely related genera with contrasting frequency of polyploids, modes of reproduction, and geographical distribution. The thesis is focused on *Hieracium* s.str. and *Andryala*; the genus *Pilosella* was studied by another authors.

Genome size of so called 'basic' species of *Hieracium* s. str. (*Hieracium* subgen. *Hieracium*) was estimated and correlated with results of phylogenetic analysis based on nuclear DNA marker ETS, ploidy level, breeding system and

ecogeographical features. Inter- and intraspecific variability in genome size was also analyzed. Genome size variation corresponded with results of molecular phylogeny that separated three main clades reflecting geographical distribution in Europe ('western', 'eastern' and hybridogenous). The monoploid genome size in the 'western' species was significantly lower than in the 'eastern' ones. Intraspecific variability was generally low. Genome size downsizing was confirmed in monoploid C values comparison among diploid and polyploid cytotypes. Correlation of genome size with longitude was apparent for the whole data, correlations with latitude and altitude were not significant.

Evolutionary history and genome size pattern and evolution were explored in *Andryala*, a medium-size genus distributed mainly in the Mediterranean Basin and Macaronesia. To reconstruct the relationships within the genus we used three nuclear markers (ETS, ITS and single-copy gene *sqs*) and two chloroplast markers (*trnT-trnL* and *trnV-ndhC*). While cpDNA analysis confirmed a previously inferred chloroplast capture event with the sister genus *Pilosella*, nuclear markers supported the monophyletic origin of *Andryala*. None of phylogenetic analyses resulted in sufficient resolution, due to very low levels of nucleotide divergence of two nuclear and two chloroplast markers and a high degree of homoplasmy and incomplete lineage sorting in the variable *sqs* marker. Only two well-supported basal lineages corresponding to relict species *A. laevitomentosa* and *A. agardhii* were separated. The rest of *Andryala* species collapsed to well-supported large group named here 'Major Radiation Group'. Relationships inside this group are largely unresolved. Regarding the genome size, highest C values were detected in basal relict species (*A. laevitomentosa*, *A. agardhii*) and in two populations of *A. ragusina*. Another two populations of *A. ragusina* have distinctly lower C values. Higher intraspecific variation of genome size in a few species might be explained by allopatric differentiation including island populations.

In addition, special attention was also paid to phylogeography and cytotype structure of *Hieracium intybaceum*, the sister member of all *Hieraciinae* genera forming transitional lineage among the four *Hieraciinae* genera. 43 populations collected across the distribution range in the Alps and the Vosges Mts were explored using flow cytometry and AFLP molecular markers. We detected two ploidy levels, diploid and tetraploid with contrasting modes of reproduction

(sexuality in diploids, apomixis in tetraploids). Diploids were found all across the Alps, while tetraploids only in the westernmost Alps and the Vosges Mts. Genetic variation was very low. Bayesian clustering identified four clusters/genetic groups, which are partly congruent with the ploidy pattern and geographical distribution. We suppose that diploids colonized the deglaciated areas from source populations most likely located in the southern part of the recent distribution range and in the western Alps.

Úvod

Taxonomie a evoluční historie subtribu *Hieraciinae*

V posledním desetiletí je častým tématem studium blízkce příbuzných monofyletických skupin. Přesto však detailních srovnání blízkých skupin s výrazně odlišnými reprodukčními způsoby, různým zastoupením apomixie a polyploidie, je stále málo. Subtribus *Hieraciinae* (tribus *Cichoriae*) je mimořádně vhodný modelový systém díky přítomnosti dvou různých typů apomixe (aposporie, diplosporie) ve dvou vysoce rozrůzněných a komplikovaných rodech (*Hieracium* a *Pilosella*) a zároveň také přítomnosti výlučně sexuálního sesterského rodu *Andryala*. Tato kombinace vlastností u blízkce příbuzných skupin je unikátní nejen u čeledi *Asteraceae* (Noyes 2007).

Již po dlouhé roky je studium fylogenetických vztahů a taxonomie subtribu *Hieraciinae* v hledáčku mnoha botaniků. Na základě morfologické kladistické analýzy a chromozomových počtů subtribus *Hieraciinae* původně zahrnoval *Hieracium* s.l. (včetně *Pilosella* Hill a *Chionoracium* Dumort.), *Andryala* L., *Hispidella* Barnad. ex Lam., *Hololeion* Kitam., *Tolpis* L. a *Arnosoris* L. (Bremer 1994). Později Lack (2006) umístil *Arnosoris* do subtribu *Hypochaeridinae* a Gemeinholzer et al. (zahrnuto v Kilian et al. 2009) došli k závěru, že se shlučuje s rodem *Cichorium*. Další změny ve vymezení subtribu *Hieraciinae* se týkají rodu *Tolpis*, který utvořil skupinu s *Cichorium* jako součástí subtribu *Cichoriinae*, a rodu *Hololeion*, který byl zařazen do skupiny *Heteracia-Sorosoris* v rámci subtribu *Crepidinae*. Vyjmutí rodu *Hololeion* je podpořeno i jeho základním chromozomovým číslem $x = 8$, které se liší od ostatních rodů subtribu *Hieraciinae* ($x = 9$).

Molekulární analýza na bázi jednoho jaderného a dvou chloroplastových úseků DNA (Fehrer et al. 2007) nově řadí do subtribu *Hieraciinae* pouze *Hieracium* s.l. (včetně *Pilosella* a *Chionoracium*), *Andryala* a *Hispidella*. Toto nové členění je i v souladu s morfologickými znaky (Krak & Mráz 2008). Tři hlavní linie rekonstruované na bázi jaderného úseku (Fehrer et al. 2007) se shodují s vymezením rodů: (i) rody *Pilosella* a *Hispidella* jsou sesterské rody, (ii) stejně tak *Hieracium/Chionoracium*, a (iii) rod *Andryala* je sesterský rod celé skupiny. Všechny rody mají stejné základní chromozomové číslo $x = 9$. Jednotlivé rody se liší frekvencí

polyploidních cytotypů, frekvencí a typem apomixy a jejím vlivem na jejich evoluci. Zatímco úseky chloroplastové DNA ukazují na dávnou mezirodovou introgresi z rodu *Hieracium* do „západoevropské linie“ rodu *Pilosella* a z této linie do rodu *Andryala*, úseky jaderné DNA ukazují na monofyletický původ všech rodů (Fehrer et al. 2007, Ferreira et al. 2015). Vzhledem k tomu, že této introgrese se účastnily diploidní druhy, proběhla pravděpodobně před přechodem těchto rodů k apomixi (Fehrer et al. 2009).

U rodů *Hieracium* a *Pilosella* můžeme polyploidizaci a apomixi označit za významnou hnací sílu evoluce. Oproti tomu, rod *Andryala* je příkladem alopatrické a parapatrické speciace a může dobře sloužit jako modelová skupina pro studium biogeografických otázek ve Středozeří a Makaronésii.

Disertační práce byla zaměřena na dva rody s odlišnou evoluční historií – *Hieracium* s. str. jako polyploidní apomiktickou skupinu a *Andryala*, jako menší a výlučně diploidní rod. Zvláštní pozornost byla také věnována druhu *Hieracium intybaceum*, který na základě jaderné ribozomální DNA tvoří sesterskou skupinu všech čtyř rodů subtribu *Hieraciinae* a na základě chloroplastové DNA jasně spadá do rodu *Hieracium* (Fehrer et al. 2007).

Hieracium

Vymezení rodu *Hieracium* je předmětem mnoha diskusí (více v disertační práci). V této studii bylo přijato vymezení, kde *Hieracium* obsahuje dva podrody – *Hieracium* a *Chionoracium*. Tento koncept podporují morfologická data, způsob rozmnožování (podrod *Chionoracium* zahrnuje nejpravděpodobněji pouze diploidní sexuální druhy, zatímco v podrodu *Hieracium* převažují polyploidní apomiktické druhy) a také rozšíření (*Chionoracium* je rod Nového světa a *Hieracium* je hlavně eurasijským rodem). Molekulární data toto členění podporují. V *Hieracium* subgen. *Hieracium* fylogenetická analýza rozlišila dvě hlavní skupiny („východní“ a „západní“) odpovídající většinou geografickému rozšíření jednotlivých druhů (Fehrer et al. 2009). Fylogenetický strom na bázi ETS ukazuje, že *Chionoracium* je odvozeno od druhů „východní“ skupiny podrodu *Hieracium*, což také podporuje relativně velká velikost genomu druhů podrodu *Chionoracium* (Zahradníček & Krauhulcová, nepublikováno). „Východní“ skupina má

prokazatelně větší velikost genomu než „západní“. Výsledky kombinované analýzy dvou chloroplastových úseků DNA zase ukazují na monofyletický původ podrodu *Chionoracium*, kde leží na bázi některých skupin podrodu *Hieracium*. To ukazuje, že žádný ze současných analyzovaných druhů podrodu *Hieracium* nemá žádný vztah k americké linii (Fehrer et al. 2007).

Hieracium podrod. *Hieracium* zahrnuje vytrvalé druhy rozšířené hlavně v temperátním pásu Evropy, Asie, vzácně v mediteránní Africe, Severní Americe a zavlečené do některých jiných oblastí (např. Nový Zéland). Podrod má širokou ekologickou amplitudu a jeho druhy rostou na rozličných stanovištích, jako jsou lesy, meze, různé typy travinných porostů a skály od nížin až do alpského stupně.

Hieracium podrod *Hieracium* je rozsáhlý polyploidní komplex s převažujícími triploidními a tetraploidními (Merxmüller 1975, Schuhwerk 1996, Schuhwerk & Lippert 1998, Chrtek et al. 2007), a vzácně pentaploidními (Chrtek et al. 2004) druhy. V porovnání s polyploidními jsou diploidní druhy velmi vzácné (cca 20 druhů) a soustředěné do oblastí glaciálních refugií jižní Evropy a východních Karpat (např. Merxmüller 1975, Chrtek 1996, Mráz 2003, Castro et al. 2007). Pouze jediný diploidní druh, *H. umbellatum*, je široce rozšířený v celé Eurasii.

Polyploidní zástupci podrodu *Hieracium* jsou tradičně považováni za obligátně nebo téměř obligátně apomiktické. Mechanismus apomixy u této skupiny je označován jako diplosporie typu *Antennaria* (Bergman 1941, Skawińska 1963, Gustafsson 1947, Nogler 1984), embryo a endosperm se vytvářejí nezávisle bez oplození. U některých rostlin s tímto typem apomixy byl zaznamenán i sexuální způsob rozmnožování, tzv. zbytková sexualita (Bergman 1941, Skawińska 1963, Hand et al. 2015). Diploidní rostliny jsou sexuální s pravidelnou mikro- a megasporogenezí (Gustafsson 1947) a autoinkompatibilitou (Rosenberg 1927, Bergman 1941). Při větší přítomnosti pylu jiných druhů na blizně může ale dojít k prolomení autoinkompatibility (proces označovaný jako "mentor effect"; Mráz 2003). Reprodukční mechanismy také určují potenciál k hybridizaci. Ta je v současnosti pozorována vzácně mezi diploidními druhy jak v přírodě, tak v rámci experimentálních křížení. Hybridní rostliny pak ale v téměř naprosté většině produkují sterilní nažky (Mráz & Paule 2006, Mráz et al. 2005, Chrtek et al. 2006). Křížení je možné ale i mezi diploidními mateřskými rostlinami a tetraploidními rostlinami jako donory pylu (pyl ale zdaleka neprodukuje všichni tetraploidi). Úspěšnost křížení v experi-

mentálních podmínkách je i tak obecně malá (nepublikováno). V přírodě bylo nalezeno pouze několik hybridních rostlin a pouze ve dvou případech byly nálezy publikovány (*Hieracium krasanii* (Mráz et al. 2005, 2011) a *H. grofae* (Chrtek et al. 2006)). I tyto hybridy jsou však většinou sterilní nebo produkují jen malé množství životaschopných nažek. V minulosti byla ale hybridizace jedním z nejvýznamnějších evolučních procesů v tomto rodu (Fehrer et al. 2009).

Pro rod *Hieracium* byly v Evropě používány dva taxonomické přístupy. V předkládané práci jsme použili středoevropský přístup, založený na pracích Nägeli & Peter (1885) a Zahn (1921–1923). Dle našeho mínění tento přístup lépe odráží situaci napříč celým areálem rodu *Hieracium*. Hlavně pak v jižní a jihovýchodní Evropě, kde se vyskytují diploidní druhy, ze kterých jsou odvozeni polyploidní zástupci. Na základě středoevropského přístupu je v podrodu *Hieracium* rozeznáváno cca. 500 druhů (Zahn 1921–1923). Druhy jsou členěny na „základní“ a „přechodné“. Základní druhy (cca 45 druhů) jsou považovány za nehybridogenní, jsou často, ale zdaleka ne ve všech případech diploidní a jsou považovány za základní jednotky v evoluci jestřábníků. Druhy přechodné jsou hybridogenního původu mezi dvěma nebo více druhy hlavními a sdílejí tak jejich morfologické znaky.

Andryala

Současný taxonomický koncept rodu *Andryala* uznává cca 17 vytrvalých nebo vzácněji jednoletých nebo dvouletých druhů (Greuter 2006, Blanca 2011, Ferreira et al. 2014). Rod je rozšířen hlavně ve Středozeří a v Makaronésii, s centry diversity v severozápadní Africe, na Pyrenejském poloostrově a Kanárských ostrovech. Doposud byly nalezeny pouze diploidní ($2n = 18$; Goldblatt & Johnson 1979-) sexuálně se rozmnožující rostliny.

Rod *Andryala* zahrnuje jak reliktní druhy rostoucí na několika málo lokalitách *A. laevitometosa* s jednou lokalitou v rumunských Karpatech (Kukula et al. 2003) a *A. agardhii* s několika lokalitami v horách Andalusie a severní Afriky (Blanca et al. 1998), tak široce rozšířené druhy časté i na synantropních stanovištích jako je morfologicky velmi varibilní *A. integrifolia* s.l.

Hieracium intybaceum

Hieracium intybaceum je vytrvalý druh rostoucí na silikátovém podloží v alpínském a subalpínském stupni Alp a na dvou odlehlých lokalitách ve Vogézách a Schwarzwaldu. Pro tento druh byly doposud nalezeny tři ploidní stupně: diploidní ($2n = 18$), triploidní ($2n = 27$) a tetraploidní ($2n = 36$; Favarger 1997, Chrtek et al. 2007). Diploidní cytotyp zcela převažuje a je k nalezení napříč celým areálem výskytu. Tetraploidní populace se vyskytují pouze na malém území v jihozápadních Alpách a ve Vogézách.

Na základě jaderné ribozomální DNA tvoří *Hieracium intybaceum* sesterskou skupinu všech čtyř rodů subtribu *Hieraciinae* a je dosti vzdálené od ostatních druhů rodu *Hieracium* (Fehrer et al. 2007, 2009). Oproti tomu chloroplastová DNA řadí *H. intybaceum* zcela jasně do rodu *Hieracium* (Fehrer et al. 2007). Již v minulosti někteří autoři řadili tento druh do samostatného rodu *Schlagintweitia* Griseb., zejména na základě odlišnosti v některých morfologických znacích. Později pak výsledky molekulární fylogeneze podpořily toto členění. Navzdory tomuto zařazení ale tvoří *H. intybaceum* mnoho hybridogenních druhů se zástupci rodu *Hieracium* s. str. a možná hybridizace byla také potvrzena křížicím experimentem mezi *H. intybaceum* a *H. prenanthoides* (Zahradníček & Chrtek, nepublikováno).

Polyploidie

Polyploidizace je jeden z nejzásadnějších mechanismů v evoluci rostlin a je velmi častá i u dvou rodů subtribu *Hieraciinae*. V minulosti probíhající polyploidizace (Soltis et al. 2009) byla zjištěna u téměř všech rostlinných skupin. Dle původu duplikovaného genomu můžeme rozlišit dva typy polyploidů: autopolyploidy a alopolyploidy (Clausen et al. 1945, Ramsey & Schemske 1998). Autopolyploidi vznikají genomovou duplikací v rámci jednoho jedince nebo křížením jedinců stejného druhu za účasti nejméně jedné neredukované gamety. Tento typ polyploidizace se zdá být méně častý. Rozlišení autopolyploidů od alopolyploidů je však zpravidla velmi komplikované (více Soltis et al. 2007, Parisod et al. 2010).

Mnohem častější je pravděpodobně alopolyploidie. Alopolyploidi mají více než dvě chromozomové sady, které jsou odlišné a pocházejí od jedinců různých druhů. Tento proces je výsledkem mezidruhové hybridizace a následné polyploidizace

hybridních rostlin (např. Mallet 2007) nebo hybridizace za účasti neredukovaných gamet. U hybridních rostlin byla zaznamenána vyšší produkce neredukovaných gamet, a tak polyploidizace zcela jistě souvisí s hybridizací (Ramsey & Schemske 1998). Polyploidizace hraje také významnou roli při stabilizaci hybridů. U diploidních hybridů se často homologní chromozomy nepárují díky strukturálním odlišnostem a hybrid je sterilní (Grant 1981, Ramsey & Schemske 1998). U alopolyploidního genomu jsou rodičovské genomy duplicitní a tak se mohou homologní chromozomy párovat. Polyploidie je tak pro mnoho hybridů jediná úniková cesta ze sterility (Ramsey & Schemske 1998).

Další nejčastější mechanismus vzniku alopolyploidních rostlin je účast nejméně jedné neredukované gamety při hybridizaci (Ramsey & Schemske 1998, Thompson & Lumaret 1992). V případě účasti jedné neredukované gamety vznikají triploidní jedinci (triploidní most), kteří se pak mohou následně účastnit formování vyšších polyploidů zpětným křížením s diploidními rostlinami nebo křížením mezi triploidy. Tato cesta je však velmi komplikovaná kvůli časté sterilitě triploidních rostlin (např. Levin 1975, Ramsey & Schemske 1998, Burton & Husband 2000, Husband 2004, Köhler et al. 2010). Polyploidní rostliny pravděpodobně nevznikly pouze jednou, ale opakovaně v různých diploidních populacích (v případě autopolyploidů např. Segraves et al. 1999, Dobeš et al. 2004, Halverson et al. 2008).

Apomixie

Apomixie je asexuální způsob tvorby semen, který produkuje klonální potomstvo s mateřským genotypem. Dosud byla zdokumentována u více než 125 rodů krytosemenných rostlin (Carman 1997). Rozšíření apomixie u krytosemenných rostlin není náhodné nebo rovnoměrné, zřetelně převažuje u některých čeledí (*Poaceae*, *Rosaceae*, *Asteraceae*; Richards 2003); téměř všechny apomiktické rostliny jsou polyploidní.

Vývoj apomikticky vzniklých semen můžeme rozdělit do tří kroků: vynechání nebo modifikace meiotického dělení při vzniku megasporu, partenogenetický vývoj embrya z neoplozené vaječné buňky a na oplození závislý nebo nezávislý vývoj endospermu (Koltunow 1993, Richards 2003, Bicknell & Koltunow 2004). Dle vývoje zárodečného vaku můžeme apomixi dělit na dva základní typy: i) u

diplosporie vzniká zárodečný vak z megaspor, ii) u aposporie vzniká zárodečný vak ze somatické buňky nucelu (např. Bergman 1941, Gustafsson 1947, Skawińska 1963, Nogler 1984, Richards 1997, Koltunow et al. 2000).

Apomixe může být buď obligátní, nebo fakultativní. Obligátní apomixe je uváděna u některých skupin s diplosporickým mechanismem vzniku zárodečného vaku (Richards 1997). Fakultativní apomixe, kombinace sexuálního způsobu rozmnožování a apomixe je podle všeho častější a je většinou vázána na aposporii. Mnoho apomiktických rostlin ale tvoří vitální pyl, umožňující křížení zejména s blíže příbuznými diploidními typy (Mogie 1992). Apomixe je u krytosemenných rostlin dědičná a vznikala nezávisle vícekrát (Carman 1997, Van Dijk & Vijverberg 2005). Regulační mechanismy apomixie jsou však velmi složité a stále v mnoha ohledech nejasné.

Sexuální a apomiktické rostliny se částečně liší svým rozšířením a ekologickými nároky. V porovnání se sexuálními druhy mají apomiktické druhy nebo cytotypy téhož druhu širší rozšíření a vyskytují se spíše ve vyšších nadmořských výškách, zeměpisných šířkách nebo na různým způsobem narušených stanovištích (Bierzuchudek 1985, Van Dijk 2003, Hörandl 2006, 2009, Cosendai et al. 2013). K této problematice bylo formulováno několik hypotéz, ale žádná z nich není zcela jednoznačná (Hörandl 2006).

Taxonomické hodnocení apomiktických skupin je obecně velmi obtížné. Dva krajní přístupy obhajují buď rozlišování všech geneticky a morfologicky definovaných jednotek na úrovni druhů (mikrospecií, „splitting approach“) nebo uznávání širěji pojatých druhů, v některých ohledech odpovídajících druhům u sexuálně se rozmnožujících rostlin („lumping approach“) (např. Dickinson 1998, Hörandl 1998, Stace 1998).

U rodů *Hieracium* a *Pilosella* je apomixe široce rozšířená a ovlivňuje morfologickou variabilitu a evoluční potenciál jednotlivých skupin. Detailní poznání mechanismů apomixe a jejich důsledků je tak u rodu *Hieracium* zcela zásadní.

Velikost jaderného genomu

Velikost genomu je důležitý znak využívaný v mnoha typech studií. Používání souvisí s rozvojem metody průtokové cytometrie, která se používá již tři desetiletí

(např. Galbraith et al. 1983, Laurie & Bennett 1985, Doležel et al. 1994, Bennett & Leitch 1995, Bennett & Leitch 2005, Suda et al. 2007). První záznam velikosti genomu je však ještě mnohem starší (Swift 1950).

Velikost genomu u krytosemenných roslin kolísá ve více než 2300 násobku mezi nejmenším dosud změřeným genomem druhu *Gentiana tuberosa* a *G. aurea* (1C = 0.061pg; 1C= 0.064 pg; Fleischmann et al. 2014, Greilhuber et al. 2006) a největším známým genomem u *Paris japonica* (1C=152.23 pg, Pellicer et al. 2010). Vysoká variabilita ve velikosti genomu je vysvětlena několika mechanismy. Dříve se předpokládalo, že genom může pouze růst („one-way path to genome obesity“) prostřednictvím polyploidizace a proliferace retrotransponů (Flavell et al. 1977, Barakat et al. 1997, Bennetzen & Kellogg 1997). Novější studie však ukazují, že jak růst, tak pokles velikosti genomu hraje důležitou roli v evoluci rostlin (Wendel et al. 2002, Hawkins et al. 2008). Mechanismy zodpovědné za změny velikosti genomu jsou především duplikace genomu, aktivita retroelementů, rekombinační mechanismy, poměr insercí a delecí a události jako poškození či ztráta celého chromozomu (např. Kirik et al. 2000, Morgan 2001, Petrov 2002, Wendel et al. 2002, Gregory 2004, Leitch & Bennett 2004, Bennetzen et al. 2005, Hawkins et al. 2009, Ågren & Wright 2011).

Interpretace variability velikosti genomu je velmi obtížná bez znalosti evoluční historie studované skupiny, a tak mnoho prací studuje velikost genomu ve fylogenetickém kontextu (Albach & Greilhuber 2004, Price et al. 2005, Weiss-Schneeweiss et al. 2006, Chrtek et al. 2009, Mandák et al. 2016). U polyploidních cytotypů byl zaznamenán pokles velikosti genomu (downsizing) v porovnání s diploidními cytotypy stejného druhu (Keellog & Bennetzen 2004, Leitch & Bennett 2004). U tetraploidního cytotypu druhu *Orobancha transcaucasica* byl naopak zaznamenán opačný jev (Weiss-Schneeweiss et al. 2006) a u rodu *Nicotiana* byl zaznamenán jak pokles, tak růst genomu (Leitch et al. 2008).

Přestože následky velké variability velikosti genomu nejsou dosud plně objasněny, mnohokrát již bylo zjištěno, že velikost genomu může ovlivňovat některé fenotypové znaky, které významně ovlivňují vývoj rostlin, fenologii a jejich ekologické nároky (Leitch & Bennett 2007, Greilhuber & Leitch 2013).

Často velké mezidruhové rozdíly ve velikosti genomu a zároveň malá variabilita v rámci druhů umožňují používat velikost genomu jako pomocný znak při vymezení

druhu (např. Buitendijk et al. 1997, Thalmann et al. 2000, Zonneveld 2001, Šiško et al. 2003, Bureš et al. 2004, Baack et al. 2005, Závěský et al. 2005, Suda et al. 2007, Chumová et al. 2015). Velikost genomu může být dále velmi užitečná při identifikaci hybridních jedinců mezi druhy s odlišnou velikostí genomu a k detekci aneuploidů. V rostlinné ekologii může velikost genomu naznačit potenciál daného druhu k invaznímu šíření. Rostliny s malou velikostí genomu obvykle lépe invadují (více Suda et al. 2015).

Velikost genomu se osvědčila jako velmi užitečný druhově specifický marker pro vymezení druhů u rodu *Pilosella* (Suda et al. 2007). Předložená práce se proto zaměřila na zhodnocení významu tohoto znaku u ostatních skupin subtribu *Hieracii-nae*.

Hlavní cíle práce

- I. Vysvětlit variabilitu velikosti genomu u *Hieracium* podrodu *Hieracium* ve fylogenetickém kontextu a ve vztahu k ekogeografickým faktorům a polyploidii (Paper 1)
- II. Rekonstruovat evoluční historii málo známého mediteránně-makaronézkého rodu *Andryala* sekvenováním několika jaderných a chloroplastových úseků (Paper 2)
- III. Objasnit cytotypovou variabilitu a genetickou strukturu ve vztahu ke geografickému rozšíření druhu *Hieracium intybaceum* (Paper 3)
- IV. Vyhodnotit variabilitu ve velikosti genomu rodu *Andryala* ve fylogenetickém kontextu a s ohledem na geografické rozšíření a životní formy (Paper 4)

Materiál a metodika

Pro účely tohoto výzkumu byly sbírány živé rostliny, nažky nebo pouze čerstvý materiál (listy) spolu s herbariovým dokladem 42 druhů (82 populací) rodu *Hieracium* a 18 druhů nebo poddruhů rodu *Andryala* (67 populací). Pokud to bylo možné, vzorky byly odebrány vždy z tří populací každého druhu a pěti rostlin z každé populace. Několik výjimek tvořily vzácně se vyskytující druhy. Také bylo

sebráno 43 populací druhu *Hieracium intybaceum* napříč celým areálem výskytu (Alpy, Vogézy). Sebrané živé rostliny byly pěstovány v experimentální zahradě Botanického ústavu AV ČR.

Metoda průtokové cytometrie byla použita k měření absolutní velikosti genomu (Greilhuber et al. 2005) a zjištění ploidní úrovně (Suda et al. 2006) za použití metodiky popsané Doleželem (Doležel et al. 2007). Chromozomy byly počítány klasickou metodou roztakových preparátů. Použity byly rostoucí kořenové špičky. Při přípravě preparátu jsme použili metodiku popsanou Dyerem (Dyer 1963). Ke zjištění reprodukčních mechanismů jsme použili sérii klasických emaskulačních pokusů (Gadella 1987, Krahulcová & Krahulec 1999) ve třech krocích: 1) test sprášením cizím pylem (sterilita). 2) uzavření květenství v mikrotenovém sáčku (autogamie, apomixie). 3) Emaskulace s následným uzavřením v mikrotenovém sáčku (apomixie).

K extrakci DNA byl použit postup popsaný Štorchovou (Štorchová et al. 2000). Byly sekvenovány dva chloroplastové úseky, dva úseky jaderné ribosomální DNA (ITS, ETS) a jeden jaderný „single copy gen“ *sq5* (Krak et al. 2012). Úseky byly amplifikovány již vyvinutými (Shaw et al. 2007, Blattner 1999, Blattner et al. 2001, Noyes 2006) nebo modifikovanými primery. Fylogenetická analýza byla provedena pomocí programů PAUP* (Swofford 2002) a MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck 2003).

K molekulární AFLP analýze jedinců druhu *Hieracium intybaceum* byl použit AFLP Core Reagent Kit I (Invitrogen) a AFLP Pre-Amp Primer Mix I (Invitrogen). Použili jsme modifikovaný postup popsaný Rejzkovou et al. (2008). Na bázi předběžných testů jsme vybrali tři primerové kombinace určené k selektivní amplifikaci: *EcoRI*-AAC + *MseI*-CTA, *EcoRI*-ACG + *MseI*-CAC and *EcoRI*-ACA + *MseI*-CTG. K nalezení genetické struktury jsme použily tři odlišné přístupy: K-means clustering (Hartigan & Wong 1979), Bayesovské klastrování (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2007) a analýzu hlavních koordinát.

Výsledky a diskuse

Velikost genomu byla změřena (většinou se jedná o první záznam) u 42 druhů rodu *Hieracium* s. str. Průměrné 2C hodnoty se lišily 2,37krát mezi jednotlivými druhy

(od 7,03 pg u diploidních rostlin po 16,67 pg u tetraploidních rostlin), 1Cx hodnota se lišila 1,22krát (mezi 3,51 a 4,34 pg). Vnitrodruhová variabilita byla obecně velmi malá, pouze u sedmi druhů s polytopním vznikem byla nalezena variabilita větší než 3,5 %. U polyploidních cytotypů byl prokázán pokles velikosti genomu (downsizing) oproti diploidním cytotypům. Fylogeneze se ukázala jako nejdůležitější faktor vysvětlující variabilitu ve velikosti genomu.

Fylogenetická analýza sekvencí jaderného ribosomálního úseku DNA (ETS) oddělila dvě hlavní linie korespondující s geografickým rozšířením jednotlivých druhů, označené jako „východní“ a „západní“. Obě skupiny jsou signifikantně odlišné velikostí genomu. Pouze v případě druhu *Hieracium transylvanicum* velikost genomu nekoresponduje s fylogenezí oddělenými skupinami. Jak ukazuje jeho současné rozšíření a velikost genomu tento druh má východní původ ale spadá do „západní“ fylogenetickou analýzou oddělené skupiny. Byla prokázána pozitivní korelace velikosti genomu se zeměpisnou délkou, žádné jiné korelace s ekogeografickými faktory nebyly nalezeny.

Pro studium fylogenetických vztahů v rodu *Andryala* byly použity tři jaderné úseky DNA (ETS, ITS a „single-copy“ gen *sqs*) a dva chloroplastové úseky (*trnT-trnL* a *trnV-ndhC*). Zatímco analýza chloroplastové DNA potvrdila předchozí hypotézu o velmi vzdálené introgresi z rodu *Pilosella*, jaderné úseky DNA podporují monofyletický původ rodu *Andryala*.

Kvůli nízké variabilitě použitých úseků DNA žádná z fylogenetických analýz nepřinesla podrobný fylogenetický strom. Byly odděleny pouze tři dobře podpořené základní linie, dvě z nich reflektují reliktní druhy *A. agardhii* a *A. laevitomentosa*. Do třetí dobře podpořené skupiny, označené jako „Major Radiation Group“ spadají všechny ostatní studované druhy. V rámci této skupiny však zůstaly fylogenetické vztahy nevyřešené. Extrémně nízká genetická variabilita je ale v rozporu s vysokou morfologickou variabilitou a ukazuje na relativně nedávnou a rychlou speciaci v rámci „Major Radiation Group“. Na druhé straně dva dobře oddělené reliktní druhy představují původní a dlouze izolované linie.

Velikost genomu byla změřena u 18 druhů rodu *Andryala*. Z toho u 17 z nich se jednalo o vůbec první údaj o velikosti genomu a u 6 druhů byl poprvé stanoven počet chromozomů ($2n=18$). Potvrdili jsme, že na rozdíl od rodu *Hieracium* rod *Andryala* obsahuje pouze diploidní druhy.

Nejvyšší 2C hodnoty (4,8–5,01 pg) byla naměřeny u reliktních druhů *A. laevitomentosa* a *A. agardhii* a u dvou populací *A. ragusina*. Jiné dvě populace druhu *A. ragusina* mají výrazně menší velikost genomu.

Velikost genomu druhů spadajících do třetí, fylogenezi podpořené skupiny „Major Radiation Group“ se pohybuje v rozmezí od 2,69 do 3,63 pg. Nalezli jsme také korelaci mezi velikostí genomu a životní formou (vyšší u vytrvalých a nižší u jednoletých/dvouletých druhů).

Ke studiu fylogeografie a cytotypové struktury druhu *Hieracium inbtibaceum* jsme použili metody průtokové cytometrie a AFLP molekulární analýzy. *Hieracium inbtibaceum* je vytrvalá rostlina rostoucí na silikátovém podloží v alpínském a subalpínském pásmu Alp a na dvou odlehlých lokalitách ve Vogézách a Schwarzwald. Byly nalezeny pouze dvě ploidní úrovně (diploidní a tetraploidní) tohoto druhu, triploidní a cytotypově smíšené populace nebyly nalezeny. Nesoulad mezi námi publikovanými výsledky a dříve publikovanými triploidními populacemi může být vysvětlen záměnou triploidních rostlin s morfologicky podobným hybridogenním druhem *H. pallidiflorum*. Zatímco diploidní sexuální populace jsou široce rozšířené napříč celým areálem rozšíření, tetraploidní apomiktické populace jsou soustředěny do západních Alp a Vogéz. Tato struktura není v souladu s obecným modelem „geografické partenogeneze“, který předpokládá širší rozšíření polyploidních apomiktických cytotypů a posun do vyšších nadmořských výšek oproti diploidním sexuálním cytotypům. Byla zjištěna velmi nízká genetická variabilita. Bayesovská analýza odhalila čtyři klastry/genetické skupiny, které částečně korespondují s ploidní strukturou a geografickým rozšířením. Domníváme se, že odledněná území byla pravděpodobně kolonizována z mateřských diploidních populací západních Alp. Tetraploidní apomiktické populace pocházejí pravděpodobně ze západních Alp anebo z refugia na jihozápadním úpatí Alp. Velmi omezený výskyt tetraploidních populací by mohl být vysvětlen relativně nedávným vznikem polyploidních cytotypů.

Závěry

Navzdory malé genetické variabilitě použitých jaderných úseků DNA, fylogenetické vztahy jsou nejvýznamnějším faktorem vysvětlujícím variabilitu velikosti genomu

v *Hieracium* podrod. *Hieracium*. Druhy západoevropského původu tvořící jednu monofyletickou skupinu mají signifikantně menší velikost genomu než druhy východoevropského původu patřící do druhé hlavní evoluční linie.

Podobné závěry platí i pro rod *Andryala*. Malá variability jaderných i chloroplastových úseků DNA vysvětlila fylogenetické vztahy jen velmi málo. Fylogeneze oddělila pouze dvě bazální skupiny tvořené reliktními druhy a třetí velkou skupinu, která zahrnuje všechny ostatní analyzované druhy. Nízké genetické odlišnosti mezi většinou druhů, v kontrastu s velkou morfologickou diversitou a přítomnost bazálních polytomí u všech použitých úseků DNA ukazují na relativně nedávnou a rychlou diverzifikaci většiny druhů a naopak dávný původ a dlouho trávající izolaci reliktních druhů *A. laevitomentosa* a *A. agardhii*. Reliktní druhy mají větší velikost genomu než druhy spadající do třetí skupiny „Major Radiation Group“. Jak u podrodu *Hieracium*, tak u rodu *Andryala* velikost genomu koresponduje s výsledky molekulární fylogeneze. Malé rozlišení fylogenetických vztahů však brání podrobnějšímu vysvětlení variability velikosti genomu.

Geografické zastoupení jednotlivých cytotypů druhu *Hieracium intybaceum* (převažující sexuální diploidi, apomiktičtí tetraploidi omezení na poměrně malé území) neodpovídá obecnému modelu geografické partenogeneze, který předpokládá širší rozšíření polyploidních apomiktických cytotypů a posun do vyšších nadmořských výšek oproti diploidním sexuálním cytotypům. To by mohlo být vysvětleno relativně nedávným vznikem polyploidů.

Introduction

Taxonomy and evolutionary history of subtribe *Hieraciinae*

Evolution in closely related lineages of a monophyletic group is a timely topic with numerous studies published within the last decades. However, a detailed comparison of related lineages with strongly contrasting breeding systems with various proportions of apomixis and polyploidy is still lacking. Subtribe *Hieraciinae* (tribe *Cichorieae*) is a particularly well-suited model system due to the evolution of two different mechanisms of apomixis (diplospory, apospory) in two highly diverse and taxonomically intricate genera (*Hieracium* and *Pilosella*) and the presence of an entirely sexual sister genus (*Andryala*). This combination of features is unique, not only in the *Asteraceae* (Noyes 2007), but generally in plants.

Phylogenetic relationships, delimitation and taxonomy of the subtribe *Hieraciinae* was in the focus of botanists for a long time. Based on morphological cladistic analysis and chromosome numbers (Bremer 1994) it originally included *Hieracium* s.l. (incl. *Pilosella* Hill and *Chionoracium* Dumort.), *Andryala* L., *Hispidella* Barnad. ex Lam., *Hololeion* Kitam., *Tolpis* L. and *Arnosseris* L. Later on, Lack (2006) placed *Arnosseris* into the *Hypochaeridinae*, and Gemeinholzer et al. (in Kilian et al. 2009) came to a conclusion that it clusters with *Cichorium*. Further changes in delimitation of the subtribe refer to *Tolpis*, which clusters with *Cichorium* as part of the *Cichoriinae*, and to *Hololeion*, which falls into the *Heteracia-Sorosseris* subclade of the *Crepidinae*. The exclusion of *Hololeion* is also supported by its basic chromosome number $x = 8$, different from the rest of *Hieraciinae* genera ($x = 9$) in the former circumscription. According to a recent molecular phylogeny based on two chloroplast and one nuclear DNA markers (Fehrer et al. 2007) the tribe *Hieraciinae* includes only *Hieracium* s.l. (incl. *Pilosella* and *Chionoracium*), *Andryala* and *Hispidella*, which is also in agreement with morphological characters (Krak & Mráz 2008). Three major lineages (Fehrer et al. 2007) generally match the generic circumscriptions: (i) *Pilosella* with *Hispidella* as a sister group, (ii) *Hieracium/Chionoracium*, and (iii) *Andryala* which is a sister genus of the whole group. All genera have the same basic chromosome number $x = 9$. Particular genera considerably differ in the frequency of polyploidy, frequency, mechanisms and manifestation of apomixis and

consequently by their past and recent evolutionary potential. While the chloroplast DNA shows ancient intergeneric introgression from *Hieracium* into an ‘Eastern European lineage’ of *Pilosella*, and from this lineage into all *Andryala* species, nuclear DNA show monophyletic origin of this genera (Fehrer et al. 2007, Ferreira et al. 2015). Genetic exchanges among the lineages most likely occurred before the shifts from sexuality to apomixis, because they affected diploid taxa (Fehrer et al. 2009).

Various evolutionary processes contributed to present diversity in the subtribe *Hieraciinae*. In *Hieracium* and *Pilosella*, hybridization and polyploidization have been a pervasive evolutionary forces. In contrast, *Andryala* is a model example of allopatric and parapatric speciation and can serve as a suitable model group for studies aimed at Mediterranean and Macaronesian biogeography.

The thesis is focused on two genera with contrasting evolutionary histories – *Hieracium* s.str. with common polyploidy and gametophytic apomixis and *Andryala*, a purely diploid genus.

Special attention was also paid to *Hieracium intybaceum*, which is a sister-group to all four genera of the subtribe *Hieraciinae* based on nrDNA, but clearly belong to *Hieracium* based on cpDNA (Fehrer et al. 2007).

Hieracium

Delimitation of the genus *Hieracium* has been a matter of debate (read more in thesis). The genus *Hieracium* in the circumscription accepted here includes two subgenera, subgen. *Hieracium* and subgen. *Chionoracium*. This concept is supported by morphological data, mode of reproduction (most likely only diploid sexuals in subgen. *Chionoracium* in contrast to prevailing apomictic polyploids in subgen. *Hieracium*) and also geographical distribution (*Chionoracium* is a New World group, in contrast to mostly Euroasian *Hieracium*). Molecular data favor this separation. In *Hieracium* subgen. *Hieracium*, two major phylogenetic clades were recognized, composed of species with either western or eastern European origin. The ETS tree revealed that *Chionoracium* is derived from the ‘Eastern’ clade of *Hieracium* subgen. *Hieracium* species, which also fits well to the relatively high genome size of *Chionoracium* taxa. The ‘Eastern’ clade has significantly higher

genome size than ‘Western’ clade. These two main lineages were separated in phylogenetic analysis and mostly correspond with geographical distribution of analysed species. Results of a combined analyses of two cpDNA regions suggest that the subgenus *Chionoracium* is monophyletic and nests near the base of several *Hieracium* subgen. *Hieracium* lineages, i.e. none of the present-day *Hieracium* subgen. *Hieracium* taxa show particular affinities to the American lineage (Fehrer et al. 2007).

Hieracium subgen. *Hieracium* comprises perennial plants which are distributed in temperate regions of Europe, Asia, rarely Mediterranean Africa, North America and have been also introduced into several other regions (e.g. New Zealand). The subgenus has a broad ecological amplitude, and its species occupy different habitats as forests, forest margins, various grasslands and rocks from the lowlands to the alpine belt.

Hieracium subgen. *Hieracium* is a huge diploid-polyploid complex with prevailing triploids and tetraploids (Merxmüller 1975, Schuhwerk 1996, Schuhwerk & Lippert 1998, Chrtek et al. 2007), and very rare pentaploids (Chrtek et al. 2004). Compared to polyploids, diploid species are very rare (cca 20 species) and mostly confined to refugial areas in southern Europe and the Eastern Carpathians, not affected by the Pleistocene glaciation (e.g. Merxmüller 1975, Chrtek 1996, Mráz 2003, Castro et al. 2007). *Hieracium umbellatum* L. seems to be the only one widely distributed (Euroasian) diploid species.

Traditionally, the polyploid *Hieracium* species have been considered near-obligate apomicts. The pathway taken to form chromosomally unreduced embryo sacs is diplospory of the *Antennaria* type (Bergman 1941, Gustafsson 1947, Skawińska 1963, Nogler 1984), embryo and endosperm are formed independently without fertilization. Recently, Hand et al. (2015) revealed meiosis and megaspore tetrad formation in 1–7% of ovules in 16 *Hieracium* species, confirming residual sexuality in this genus as suggested by Bergman (1941) and Skawińska (1963). The diploid species or cytotypes are sexual with regular micro- and megasporogenesis (Gustafsson 1947) and are self-incompatible (Rosenberg 1927, Bergman 1941). However, the presence of heterospecific pollen on stigma can induce the breakdown of self-incompatibility (mentor effect; Mráz 2003). As expected, modes of reproduction also determine the capability for hybridization. It

can recently proceed between diploid parents, both in field and experimental conditions, but hybrids are nearly or completely seed sterile (Mráz et al. 2005, Chrtek et al. 2006, Mráz & Paule 2006). Besides of them, pollen bearing tetraploids can serve as pollen parents in crosses with diploid sexual maternal plants (Mogie 1992). In contrast to the genus *Pilosella*, successful crosses with polyploids as maternal plants have not been reported yet.

There are two basic taxonomic concepts applied for intrageneric classification of *Hieracium*. Scandinavian, British and Russian botanists follow a narrow species concept (nearly all morphologically recognizable forms are treated at species rank ('microspecies')). A second concept, based on monographic studies by Nägeli & Peter (1885) and Zahn (1921–1923) and mostly used by Central European botanists accepts a broad species definition (species are further divided into subspecies, varieties, etc.). In the papers presented here, we follow the Central European concept, because, in our opinion, it better reflects the situation across the whole distribution range.

According to Central European concept, it is recognized ca 500 species of *Hieracium* subgenus *Hieracium* (Zahn 1921–1923), divided into so-called 'basic' and 'intermediate' species. Basic species were believed to be non-hybridogenous, either diploid, tentatively considered as the main units of the species evolution, or polyploid. Intermediate taxa share morphological characters of two or more basic species and are supposed to be of hybridogenous origin (hybrids stabilized by polyploidization and apomixis). Despite a high number of hybridogenous species, recent hybridization in *Hieracium* subgen. *Hieracium* is highly restricted, only a very few recent hybrids are found in nature, and only two cases have been published so far, namely *Hieracium krasanii* Woł. (Mráz et al. 2005, 2011) and *H. grofae* Woł. (Chrtek et al. 2006). Moreover, these hybrids are often sterile and produce only small amount of viable pollen.

Andryala

According to a recent taxonomic concept, the genus *Andryala* (including *Paua* Caball., *Rothia* Schreb., and *Pietrosia* Nyár. ex Sennikov) comprises ca. 17 perennial, less often annual or biennial species (Greuter 2006, Blanca 2011, Ferreira

et al. 2015) distributed mainly in the Mediterranean Basin and Macaronesia with centers of diversity in north-western Africa, the Iberian Peninsula and Macaronesia. Only diploid ($2n = 18$) plants (Goldblatt & Johnson 1979-) with strictly sexual reproduction were found so far.

Taxonomic complexity and geographical distribution differ remarkably between most of the species. The genus includes both relict species confined to a few localities – *A. laevitometosa* with one locality (a few microlocalities) in the Romanian Carpathians (Kukula et al. 2003) and *A. agardhii* with a few localities in mountains of Andalusia and Morocco (Blanca et al. 1998) as well as widely distributed (often at localities strongly influenced by human activities) species as *A. integrifolia* s.l. with complex pattern of morphological variation.

Hieracium intybaceum

Hieracium intybaceum is a perennial herb scattered to locally common on siliceous bedrock in the subalpine and alpine belts of the Alps, and spatially isolated in the Vosges Mts and the Schwarzwald Mts. (the latter not confirmed recently). Three ploidy levels have been reported so far, namely diploids ($2n = 18$), triploids ($2n = 27$) and tetraploids ($2n = 36$; Favarger 1997, Chrtek et al. 2007). The diploid cytotype prevail across the distribution range, tetraploids are restricted to a small area in the southwestern Alps and the Vosges Mts.

Hieracium intybaceum forms a sister-group to all four genera of the subtribe *Hieraciinae* and is strongly divergent from other *Hieracium* species based on nrDNA analysis (Fehrer et al. 2007, 2009). In contrast, according to cpDNA (Fehrer et al. 2007), this species clearly belongs to *Hieracium*, a pattern that was attributed to a chloroplast capture event (Fehrer et al. 2007). A distinct morphology of *H. intybaceum* well matches phylogenetic data and was a principal reason for its separation into the genus *Schlagintweitia* Griseb., proposed and accepted by several authors in the past. Despite its strange position, there are many hybridogenous intermediate species with assumed parentage of *H. intybaceum* (Zahn 1921–1923). Moreover, hybridization between *H. intybaceum* and another *Hieracium* species (*H. prenanthoides*) was also confirmed by experimental crosses (Zahradníček & Chrtek, unpubl. data).

Polyploidy

Polyploidization (whole genome duplication) is one of the most crucial mechanisms in the plant evolution, and very common also in several genera of the subtribe *Hieraciinae*. Ancient polyploidization was detected for almost all plant groups (Soltis et al. 2009). Two types of polyploidy can be distinguished based on origin of the duplicated genome: autopolyploids and allopolyploids (Clausen et al. 1945, Ramsey & Schemske 1998). Autopolyploids arise by genome duplication within individuals or by crossing of individuals (with participation of at least one unreduced gamete) of the same species. This type of polyploidy seems to be less frequent. However, the detection of autopolyploids and their recognition from allopolyploids is often difficult (for more details see Soltis et al. 2007, Parisod et al. 2010).

Probably more frequent is allopolyploidy. Allopolyploids have more than two chromosome sets which are dissimilar and derived from different species. This process is a result of interspecific hybridization of diploid taxa and subsequent polyploidization of hybrids (e.g. Mallet 2007) as well as simple genome duplication via unreduced gametes. Higher production of unreduced gametes in hybrid plants was detected and thus polyploidy is clearly related with hybridization (Ramsey & Schemske 1998). Polyploidy also plays a key role in establishment and stabilization of hybrids. In diploid hybrids, homologous chromosomes do not pair properly due to structural differences between chromosome sets and the hybrids often suffer from sterility (Grant 1981, Ramsey & Schemske 1998). In the allopolyploid genome, the parental chromosome sets are duplicated and pairing of homologous chromosomes is possible and thus, for many hybrids, polyploidy represents a way to escape from sterility (Ramsey & Schemske 1998).

The second most common mechanism of allopolyploids origin is probably through simple genome duplication of unreduced gametes (Ramsey & Schemske 1998, Thompson & Lumaret 1992, Kreiner et al. 2017). Polyploids may arise directly by fusion of two unreduced gametes or by fusion of one unreduced and one reduced gametes. The second path gives rise to triploids (triploid bridge) which consequently participate in forming of higher polyploids by backcrossing with diploids or crossing between triploids. The way is complicated by triploid block

(triploids are often sterile; e.g. Levin 1975, Ramsey & Schemske 1998, Burton & Husband 2000, Husband 2004, Köhler et al. 2010). Polyploid cytotypes do not arise only once but probably frequently in various diploid populations (in case of autopolyploidy e.g. Segraves et al. 1999, Dobeš et al. 2004, Halverson et al. 2008).

Apomixis

Apomixis is an asexual mode of seed formation that produces clonal progeny with a maternal genotype (Asker & Jerling 1992). It has been documented in more than 125 angiosperm genera (Carman 1997). Distribution of apomixis in the flowering plants (angiosperm) is not random. It clearly prevails in some families (*Poaceae*, *Rosaceae*, *Asteraceae*; Richards 2003) and almost all apomictic plants are polyploids.

The apomictic development of seeds includes three elementary steps: avoidance or strong modification of meiosis during megaspore formation, fertilisation-independent embryo formation and autonomous or fertilization-dependent (fusion of sperm cell with central cell of the embryo sac) generation of endosperm (Koltunow 1993, Richards 2003, Bicknell & Koltunow 2004). Regarding the embryo sac formation, two basic mechanisms of apomixis can be distinguished: (i) In diplospory, embryo sac originates from the megaspore mother cell, like in sexual reproduction, but meiosis is avoided in the first cell division and unreduced megaspores are formed by mitosis. (ii) In apospory, the embryo sac is formed from a somatic cell (e.g. Bergman 1941, Gustafsson 1947, Skawińska 1963, Nogler 1984, Richards 1997, Koltunow et al. 2000).

Obligatory apomixis was documented only in some diplosporous plant groups (Richards 1997). Also production of fertile pollen was detected in some obligate apomictic plants (Mogie 1992), pollen of these plants could be involved in crosses with their sexual relatives. Combination of apomictic reproduction with sexual reproduction (facultative apomixis) is more common and more or less corresponds with apospory type of apomixis. From the taxonomic point of view, classification of apomictic complexes is very difficult and often a matter of controversies, especially the concepts of large agamospecies vs. narrow microspecies (e.g., Dickinson 1998, Hörandl 1998, Stace 1998).

Apomixis in angiosperms is heritable and has evolved independently multiple times (Carman 1997, Van Dijk & Vijverberg 2005). However, the regulatory mechanisms are complex and still largely unknown. Sexual and asexual plant species seem to at least partly differ in the distribution pattern and ecological demands. Compared to sexuals, asexuals are wider distributed and rather tend to occur in higher latitudes and altitudes or in otherwise harsh conditions (Bierzuchudek 1985, Van Dijk 2003, Hörandl 2006, 2009, Cosendai et al. 2013). Several hypotheses have been formulated, but none of them alone seems to be unequivocal (reviewed in Hörandl 2006).

Apomixis is widespread in *Hieracium* and *Pilosella* and strongly influences the pattern of morphological variation and evolutionary potential of particular groups. Detailed understanding of mechanisms and consequences of apomixis in *Hieraciinae* is thus crucial.

Genome size

Genome size is a powerful biosystematic marker for many types of studies. As a rule, it relates to flow cytometry which is used by botanists for more than three decades (e.g. Galbraith et al. 1983, Laurie & Bennett 1985, Doležel et al. 1994, Bennett & Leitch 1995, Bennett & Leitch 2005, Suda et al. 2007) but first report of plant genome size is much older (Swift 1950).

In flowering plants C-values vary more than 2300-fold among smallest known values in *Gentiana tuberosa* and *G. aurea* ($1C = 0.061\text{pg}$; $1C = 0.064\text{ pg}$; Fleischmann et al. 2014, Greilhuber et al. 2006) and highest known value in *Paris japonica* ($1C = 152.23\text{ pg}$; Pellicer et al. 2010). The high genome size variation is explained by several mechanisms. Firstly, it was considered that the genome size can only increase ('one-way path to genome obesity') due to polyploidization and retrotransposon proliferation (Flavell et al. 1977, Barakat et al. 1997, Bennetzen & Kellogg 1997). More recent studies conclude that genome size increases and also decreases have played a key role in the evolution of many plant groups (Wendel et al. 2002, Hawkins et al. 2008). The mechanisms responsible for genome size changes include mainly genome duplication, transposable element activity, recombination mechanisms, double stranded break repair, insertion-deletion rate

and even losses of whole chromosomes (e.g. Kirik et al. 2000, Morgan 2001, Petrov 2002, Wendel et al. 2002, Gregory 2004, Leitch & Bennett 2004, Bennetzen et al. 2005, Hawkins et al. 2009, Ågren & Wright 2011).

Interpretation of genome size variability is very difficult (sometimes impossible) without a phylogenetic context (Albach & Greilhuber 2004, Price et al. 2005, Weiss-Schneeweiss et al. 2006, Chrtek et al. 2009, Mandák et al. 2016). In polyploid plants genome size reduction was proved (downsizing) in comparison with diploid cytotypes of the same species (Keelogg & Bennetzen 2004, Leitch & Bennett 2004). However, a reverse path was detected in tetraploid cytotypes *Orobanche transcaucasica* (Weiss-Schneeweiss et al. 2006), *Chenopodium* (Mandák et al. 2016) and in the genus *Nicotiana* both processes have been recognized (Leitch et al. 2008).

Although the full consequence of high variation of genome size is still not completely known, it has been many times suggested that genome size can constrain some phenotypic traits and that it significantly affects plant development, phenology and ecology (Greilhuber & Leitch 2013, Leitch & Bennett 2007).

Often large differences between species together with a fairly constant amount of nuclear DNA within species (or evolutionary entity) make the genome size a useful supportive character for taxonomic decision-making, i.e. taxa delimitation (e.g. Buitendijk et al. 1997, Thalmann et al. 2000, Zonneveld 2001, Šiško et al. 2003, Bureš et al. 2004, Baack et al. 2005, Závěský et al. 2005, Suda et al. 2007, Chumová et al. 2015). Last but not least, it can be a valuable tool for detection of hybrids between homoploid species with different DNA contents, and (with some limitations) for detection of aneuploids. In plant ecology, genome size can predict e.g. invasibility of a given species, as species with lower genome are usually better invaders (see more details Suda et al. 2014). Relations between genome size and ecogeographical factors are still matter of controversies.

Genome size was proved to be very useful species-specific marker for taxa delimitation in closely related genus *Pilosella* (Suda et al. 2007). Therefore the genome size variation and evolution of genome size in the rest of the subtribe *Hieraciinae* was tested

Aims of thesis

- I. To explain the genome size variability in *Hieracium* subgen. *Hieracium* in phylogenetic context and in relations to ecogeographical factors and polyploidy (Paper 1)
- II. To reconstruct the evolutionary history of a little-known Mediterranean-Macaronesian genus *Andryala* (*Asteraceae*) by multigene sequencing (Paper 2)
- III. To clarify the cytotype distribution and geographical pattern of genetic variation of *Hieracium intybaceum* (Paper 3)
- IV. To analyze the genome size variability in the genus *Andryala* within phylogenetic context and with respect to selected life history and geographical traits (Paper 4)

Material and methods

Living plants, seeds and fresh leaves of 42 *Hieracium* species (82 population) and 18 *Andryala* species and subspecies (67 populations) were collected and mostly cultivated in the Experimental garden of the Institute of Botany in Průhonice. As a rule, plants from at least three populations per species were collected with exception of a few rare species. Fourty-three populations of *Hieracium intybaceum* across the whole distribution area were collected.

Flow cytometry was applied to asses of absolute genome sizes (C-values; Greilhuber et al. 2005) and DNA ploidy levels (Suda et al. 2006) were determined following methodology of Doležel et al. 2007.

Chromosome numbers were counted by squash preparation method using root-tip meristems, staining followed . Dyer (1963). Reproductive modes analysis followed standard emasculation tests (Gadella 1987, Krahulcová & Krahulec 1999). Test was applied in three steps: (i) Foreign pollen addition (sterility test). (ii) capitulum covered by textile bag (autogamy and apomixis test). (iii) Emasculated capitulum covered by textile bag (apomixis test). DNA extractions were performed according to Štorchová et al. (2000). Sequences of two intergenic spacers of the cpDNA, internal and external transcribed spacers (ITS and ETS) of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) and one single copy gene *sqs* (Krač et al. 2012) were amplified and

sequenced using already developed (Shaw et al. 2007) or modify primers. In case of sequence heterogeneity the PCR products were subcloned and several clones per accessions were sequenced. Phylogenetic analyses based on maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian analyses were performed using PAUP* (Swofford 2002) and MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck 2003).

Hieracium intybaceum individuals were analysed for AFLPs using the AFLP Core Reagent Kit I (Invitrogen) and AFLP Pre-Amp Primer Mix I (Invitrogen). The whole procedure (restriction, ligation, pre-amplification and selective amplification) followed Rejzková et al. (2008) with some modifications. Based on preliminary tests, three primer combinations were used for selective amplification: *EcoRI*-AAC + *MseI*-CTA, *EcoRI*-ACG + *MseI*-CAC and *EcoRI*-ACA + *MseI*-CTG. The genetic structure was evaluated using three different approaches: (i) K-means clustering (Hartigan & Wong, 1979), (ii) Bayesian clustering (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2007) and (iii) Principal coordinate analysis.

Results and discussion

Genome size was established (mostly for the first time) for 42 ‘basic’ *Hieracium* species. The mean 2C values differed up to 2.37-fold among different species (from 7.03 pg in diploid to 16.67 in tetraploid accessions), the 1Cx values varied 1.22-fold (between 3.51 and 4.34 pg). Intraspecific variation was generally low, variation higher than 3.5% was detected in only seven species, which may have a polytopic origin. Downsizing of genomes in polyploids was detected (mean 1Cx values of the 2n, 3n and 4n accessions differed significantly). Phylogeny was the most important factor explaining the pattern of genome size variation in *Hieracium* sensu stricto. Two main groups corresponding with species distribution (named ‘western’ and ‘eastern’ clade) separated in phylogenetic analyses based on nuclear ribosomal DNA marker (ETS) significantly differed in the genome size, species of western European origin having significantly lower genome size in comparison with those of eastern European origin. *Hieracium transylvanicum*, the only one exception, fell into the phylogenetically defined western lineage, but has a genome size and geographic range congruent with the ‘eastern’ group. Correlation with ecogeographic variables were not significant, outweighed by the divergence of the genus into two major phylogenetic lineages, except for a relations between genome

size and geographical latitude for the whole data set (both major groups).

Phylogenetic relationships in the genus *Andryala* were studied using three nuclear markers (ETS, ITS and single-copy gene *sqs*) and two chloroplast markers (*trnT-trnL* and *trnV-ndhC*). While cpDNA analysis confirmed a previously inferred chloroplast capture event with the sister genus *Pilosella*, nuclear markers supported the monophyletic origin of *Andryala*. None of phylogenetic analyses gave well resolution, due to low level of nucleotide divergence in the case of two nuclear and two chloroplast markers and high degree of homoplasy and incomplete lineage sorting in the *sqs* marker. Only two well-supported basal lineages corresponding with relict mountains species *A. agardhii* and *A. laevitomentosa* were separated. Third well-supported group named ‘Major Radiation Group’ comprised the rest of *Andryala* species without resolution among them. The extremely low level of genetic divergence among most of the species, high morphological diversity and basal polytomy found in all markers, suggests their relatively recent and rapid speciation and old origin and long-time mountain separation of relict species *A. laevitomentosa* and *A. agardhii*.

Genome size was established for 18 *Andryala* species and subspecies, for 17 of them for the first time. It ranges (2C values) from 2.69 to 5.01 pg. First chromosome counts ($2n = 18$) were recorded for 6 species. It is likely that *Andryala* comprises only diploid species with $2n = 18$, in contrast to *Hieracium* s. str. with a high frequency of polyploids. Highest C values (4.8–5.01 pg) were detected in basal relict species *A. laevitomentosa* and *A. agardhii* and in two populations of *A. ragusina*; another two populations of *A. ragusina* had distinctly lower C values. Genome size in species of the ‘Major Radiation Group’ ranges from 2.69 to 3.63 pg. We also found a correlation between genome size and life form (higher in perennials compared to annuals and biennials), and insularity (lower genome size in island accession compared to continental ones).

Cytogeography and phylogeography of *Hieracium intybaceum*, a perennial silicicolous species distributed in the Alps and the Vosges Mts, was studied using flow cytometry and amplified fragment length polymorphism (AFLP). Only two ploidy levels, diploid and tetraploid, were found, mixed-ploidy populations were not detected. The discrepancy between our results and previous reports of triploids can be explained by misidentifications of the plants (they might have belong to morpho-

gically similar and triploid *H. pallidiflorum*). While diploid and sexual populations are widely distributed across the nearly whole distribution range, apomictic tetraploids seem to be rare and restricted to the western Alps and the Vosges Mts. This pattern does not correspond with the general model of geographical parthenogenesis which supposes that apomictic polyploids have larger distribution ranges shifted to higher latitudes and elevations compared to related sexual diploids. We detected an overall low level of genetic variation. Bayesian clustering identified four clusters/genetic groups, which are partly congruent with the ploidal pattern and cytogeographical distribution. We suppose that diploids colonized the deglaciated areas from source populations most likely located mainly in the southern part of the recent distribution range and probably also in the western Alps. Gene flow and further differentiation likely took place. Apomictic tetraploids most likely originated in the western Alps or in the refugium at the south-western foot of the Alps. Their limited geographical range can be explained by their rather recent origin.

Conclusions

Despite low genetic variation of nuclear markers and thus low results in phylogenetic analyses, phylogeny was the most important factor explaining the pattern of genome size variation in *Hieracium* s. str. Species of Western European origin had significantly lower genome size in comparison with those of Eastern European origin.

In *Andryala*, low genetic variation of chloroplast and nuclear DNA markers resulted in a phylogenetic tree with low resolution. Only two basal phylogenetic groups formed by relict species and third large group with rest of *Andryala* species were distinguished. The extremely low level of genetic divergence among most of the species, high morphological diversity and basal polytomy found in all markers suggest their relatively recent and rapid speciation and ancient origin and long lasting mountain separation of relict species *A. laevitomentosa* and *A. agardhii*. Relict species have higher genome size than species from the ‘Major Radiation Group’. Genome size values correspond well with results of phylogenetic analyses in both genera *Hieracium* and *Andryala*, but low phylogenetic resolution prevents further explanation.

Cytotype distribution patterns of *Hieracium intybaceum* does not correspond with the general model of geographical parthenogenesis which supposes that apomictic polyploids have larger distribution ranges shifted to higher latitudes and elevations compared to related sexual diploids. A wide geographic range of diploids and limited range of tetraploids can be explained by rather recent origin of polyploid plants.

Literature

- Ågren J.A., Wright S.I.** (2011): Co-evolution between transposable elements and their hosts: a major factor in genome size evolution? – *Chromosome Research* 19: 777–786.
- Albach D.C. & Greilhuber J.** (2004): Genome size variation and evolution in *Veronica*. – *Annals of Botany* 94: 897–911.
- Baack E.J., Whitney K.D. & Rieseberg L.H.** (2005): Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. – *New Phytologist* 167: 623–630.
- Barakat A., Carels N. & Bernardi G.** (1997): The distribution of genes in the genomes of Gramineae. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 6857–6861.
- Bicknell R.A. & Koltunow A.M.** (2004): Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums. – *Plant Cell* 16: 228–245.
- Bierzychudek P.** (1985): Patterns in plant parthenogenesis. – *Experientia* 41: 1255–1264.
- Blanca G., Cueto M., Martínez-Lirola M.J. & Molero-Mesa J.** (1998): Threatened vascular flora of Sierra Nevada (southern Spain). – *Biological Conservation* 85: 269–285.
- Bennett M.D. & Leitch I.J.** (1995): Nuclear DNA amounts in angiosperms. – *Annals of Botany* 76: 113–176.
- Bennett M.D. & Leitch I.J.** (2005): *Plant DNA C-values Database* (release 5.0, December 2004).
- Bennetzen J.L. & Kellogg E.A.** (1997): Do plants have a one-way ticket to

genomic obesity? – *Plant Cell* 9: 1509–1514.

- Bennetzen J.L., Ma J.X. & Devos K.M.** (2005): Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. – *Annals of Botany* 95: 127–132.
- Bergman B.** (1941): Studies on the embryo sac mother cell and in development in *Hieracium* subg. *Archieracium*. – *Svensk Botanisk Tidskrift* 35: 1–45.
- Blanca G.** (2011): *Andryala* L. – In: Blanca G., Cabezudo B., Cueto M., Salazar C., Morales Torres C. (eds), *Flora vascular de Andalucía Oriental*, Universidades de Almería, Granada, Jaén y Málaga, Granada, p. 1572–1573.
- Bremer K.** (1994): *Asteraceae* – cladistics and classification. – Timber Press, Portland.
- Buitendijk J.H., Boon E.J. & Ramanna M.S.** (1997): Nuclear DNA content in twelve species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. – *Annals of Botany* 79: 343–353.
- Bureš P., Yi-Feng Wang, Horová L. & Suda J.** (2004): Genome size variation in Central European species of *Cirsium* (Compositae) and their natural hybrids. – *Annals of Botany* 94: 353–363.
- Burton T. L. & Husband B. C.** (2000): Fitness differences among diploids and tetraploids and their triploid progeny in *Chamerion angustifolium* (Onagraceae): mechanisms of inviability and implications for polyploid evolution. – *Evolution* 54: 1182–1191.
- Carman J. G.** (1997): Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. – *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 51–94.
- Castro M., Mateo G. & Rosselló J.A.** (2007): Chromosome numbers in *Hieracium* and *Pilosella* species (Asteraceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. – *Botanical Journal Linnean Society* 153: 311–320.
- Chrtek J. jun.** (1996): Chromosome numbers in selected species of *Hieracium* (Compositae) in the Sudeten Mts. and the Western and Ukrainian Eastern Carpathians. – *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 41: 783–790.
- Chrtek J. jun., Mráz P. & Severa M.** (2004): Chromosome numbers in selected species of *Hieracium* s.str. (*Hieracium* subgen. *Hieracium*) in the Western

- Carpathians. – *Preslia* 76: 119–139.
- Chrtek J., Mráz P. & Sennikov A.N.** (2006): *Hieracium grofiae* – a rediscovered diploid hybrid from the Ukrainian Carpathians. – *Biologia, Bratislava*, 61: 365–373.
- Chrtek J., Mráz P., Zahradníček J., Mateo G., Szelağ Z.** (2007): Chromosome numbers and DNA ploidy levels of selected species of *Hieracium* s. str. (*Asteraceae*). – *Folia Geobotanica* 42: 411–430.
- Chrtek J., Zahradníček J., Krak K. & Fehrer J.** (2009): Genome size in *Hieracium* subgenus *Hieracium* (*Asteraceae*) is strongly correlated with major phylogenetic groups. – *Annals of Botany* 104: 161–178.
- Chumová Z., Krejčíková J., Mandáková T., Suda J. & Trávníček P.** (2015): Evolutionary and taxonomic implications of variation in nuclear genome size: Lesson from the grass genus *Anthoxanthum* (*Poaceae*). – *Plos One* 10
- Clausen J., Keck D.D. & Hiesey W.M.** (1945): II. Plant evolution through amphiploidy and autopoloidy with examples from the *Madiinae*. – Carnegie Institution of Washington, Washington, DC.
- Cosendai A.C., Wagner J., Ladinig U., Rosche C., Hörandl E.** (2013): Geographical parthenogenesis and population genetic structure in the alpine species *Ranunculus kuepferi* (*Ranunculaceae*). – *Heredity* 110: 560–569.
- Dickinson T. A.** (1998): Taxonomy of agamic complexes in plants: A role for metapopulation thinking. – *Folia Geobotanica* 33: 327–332.
- Dobeš C., Mitchell-Olds T. & Koch M.A.** (2004): Intraspecific diversification in North American *Boechera stricta* (= *Arabis drummondii*), *Boechera divaricarpa*, and *Boechera holboellii* (*Brassicaceae*) inferred from nuclear and chloroplast molecular markers – an integrative approach. – *American Journal of Botany* 91: 2087–2101.
- Doležel J., Doleželová M. & Novák F.** (1994): Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). – *Biologia Plantarum* 36: 351–357.
- Doležel J., Greilhuber J. & Suda J.** (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – *Nature Protocols* 2: 2233–2244.

- Dyer A.F.** (1963): The use of lacto-propionic orcein in rapid squash methods for chromosome preparations. *Stain Technology* 38: 85–90.
- Falush D., Stephens M. & Pritchard J.K.** (2007): Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. – *Molecular Ecology Notes* 7: 574–578.
- Favarger C.** (1997): Notes de caryologie Alpine VI. – *Bulletin de la Société Neuchâtoise des Sciences Naturelles* 120: 19–33.
- Fehrer J., Gemeinholzer B., Chrtek J. & Bräutigam S.** (2007): Incongruent plastid and nuclear DNA phylogenies reveal ancient intergeneric hybridization in *Pilosella* hawkweeds (*Hieracium*, *Cichorieae*, *Asteraceae*). – *Molecular Phylogenetic and Evolution* 42: 347–361.
- Fehrer J., Krak K. & Chrtek J.Jr** (2009): Intra-individual polymorphism in diploid and apomictic polyploid hawkweeds (*Hieracium*, *Lactuceae*, *Asteraceae*): disentangling phylogenetic signal, reticulation, and noise. – *BMC Evolutionary Biology* 9: 239
- Ferreira M.Z., Jardim R. Álvarez Fernández I. & Menezes de Sequeira M.** (2014): *Andryala perezii* (Asteraceae), a New Species from the Canary Islands. – *Novon* 23(2): 147–156.
- Ferreira M.Z., Zahradníček J., Kadlecová J., Menezes de Sequeira M., Chrtek J. Jr, Fehrer J.** (2015): Tracing the evolutionary history of the little-known Mediterranean-Macaronesian genus *Andryala* (Asteraceae) by multigene sequencing. – *Taxon* 62: 535–551.
- Flavell R.B., Rimpau, J. & Smith D.B.** (1977): Repeated sequence DNA relationships in four cereal genomes. – *Chromosoma* 63: 205–222.
- Fleischmann A., Michael T.P., Rivadavia F., Sousa A., Wang W., Tensch E.M., Greilhuber J., Müller K.F. & Heubl G.** (2014): Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. – *Annals of Botany* 114: 1651–1663.
- Gadella T.W.J.** (1987): Sexual tetraploid and apomictic pentaploid populations of *Hieracium pilosella* (Compositae). – *Plant Systematic and Evolution* 157: 219–245.

- Galbraith D.W., Harkins K.R., Maddox J. M., Ayres N.M., Sharma D.P. & Firoozabady E.** (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. – *Science* 220: 1049–1051.
- Goldblatt P. & Johnson D.E.** (1979-): Index to plant chromosome numbers. – Missouri Botanical Garden, St. Louis, <http://www.tropicos.org/Project/IPCN> (accessed 2 Nov 2016).
- Grant V.** (1981): Plant speciation. – Columbia University Press, New York.
- Gregory T.R.** (2004): Insertion–deletion biases and the evolution of genome size. – *Gene* 324: 15–34.
- Greilhuber J., Doležel J., Lysák M. A. & Bennett M. D.** (2005): The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “genome size” and “C-value” to describe nuclear DNA contents. – *Annals of Botany* 95: 255–260.
- Greilhuber J., Borsch T., Müller K., Worberg A., Porembski S. & Barthlott W.** (2006): Smallest angiosperm genomes found in *Lentibulariaceae*, with chromosomes of bacterial size. *Plant Biology* 8: 770–777.
- Greilhuber J. & Leitch I.J.** (2013): Genome size and the phenotype. – In: Leitch I.J., Greilhuber J., Doležel J. & Wendel J.F. (eds), *Plant genome diversity. Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes*, Springer, Vienna, pp. 323–344.
- Greuter W.** (2006): *Compositae* (pro parte majore). – In Greuter W. & Raab-Straube E.V. (eds), *Compositae*. – Euro+Med Plantbase – the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity.
- Gustafsson A.** (1947): Apomixis in higher plants II. The causal aspect of apomixis. – *Acta Universitatis Lundensis, ser. n.*, 43(2): 69–179.
- Hand, M.L., Vít, P., Krahulcová, A., Johnson, S.D., Oelkers, K., Siddons, H., Chrtek, J. Jr., Fehrer, J., Koltunow, A.M.G.** (2015): Evolution of apomixis loci in *Pilosella* and *Hieracium* (*Asteraceae*) inferred from the conservation of apomixis-linked markers in natural and experimental populations. – *Heredity* 114: 17–26.
- Halverson K., Heard S.B., Nason J.D. & Stireman J.O. III** (2008): Origins, distribution, and local co-occurrence of polyploid cytotypes in *Solidago altissima*

- (*Asteraceae*). – American Journal of Botany 95: 50–58.
- Hartigan J.A. & Wong M.A.** (1979): A K-means clustering algorithm. – Applied Statistics 28: 100–108.
- Hawkins J.S., Grover C.E. & Wendel J.F.** (2008): Repeated big bangs and the expanding universe: directionality in plant genome size evolution. – Plant Science 174: 557–562.
- Hawkins J.S., Proulx S.R., Rapp R.A. & Wendel J.F.** (2009): Rapid DNA loss as a counterbalance to genome expansion through retrotransposon proliferation in plants. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A. 106: 17811–17816.
- Hörandl E.** (1998): Species concepts in agamic complexes: Applications in the *Ranunculus auricomus* complex and general perspectives. – Folia Geobotanica 33: 335–348.
- Hörandl E.** (2006): The complex causality of geographical parthenogenesis. – New Phytologist 171: 525–538.
- Hörandl E.** (2009): Geographical parthenogenesis: Opportunities for asexuality. – In: Schön I., Martens K. & Van Dijk P.J. (eds), Lost sex, Springer, Dordrecht, pp. 161–186.
- Husband B.C.** (2004): The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. – Biological Journal of Linnean Society 82: 537–546.
- Keelogg E.A. & Bennetzen J.L.** (2004): The evolution of nuclear genome structure in seed plants. – American Journal of Botany 91: 1709–1725.
- Kirik A., Salomon S. & Puchta H.** (2000): Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants. – EMBO Journal 19: 5562–5566.
- Köhler C., Scheid O.M. & Erilova A.** (2010): The impact of triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. – Trends in Genetics 26: 142–148.
- Koltunow A.M.** (1993): Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. – Plant Cell 5: 1425–1437.
- Koltunow A.M., Johnson S.D. & Bicknell R.A.** (2000): Apomixis is not develop-

- mentally conserved in related, genetically characterized *Hieracium* plants of varying ploidy. – Sexual Plant Reproduction 12: 253–266.
- Krahulcová A. & Krahulec F.** (1999): Chromosome numbers and reproductive systems in selected representatives of *Hieracium* subgen. *Pilosella* in the Krkonoše Mts (the Sudeten Mts). – Preslia 71: 217–376.
- Krak K. & Mráz P.** (2008): Trichomes in the tribe *Lactuceae* (*Asteraceae*) – taxonomic implications. – Biologia, Bratislava, 63: 616–630.
- Krak K., Álvarez I., Caklová P., Costa A., Chrtek J. & Fehrer J.** (2012): Development of novel low-copy nuclear markers for *Hieraciinae* (*Asteraceae*) and their prospects for other tribes. – American Journal of Botany 99: e74–e77.
- Kukula K., Okarma H., Pawlowski J., Perzanowski K., Ruzicka T., Sandor J., Stanova V., Tasenkevich L. & Vlasin M.** (2003): Carpathian list of endangered species. – Carpathian Ecoregion Initiative, Vienna & Krakow.
- Lack H. W.** (2006 [“2007”]): Tribe Cichorieae Lam. & DC. – In: Kubitzki K. (ed.), Families and genera of flowering plants 8. Asterales, Berlin, etc., pp. 180–199.
- Laurie D.A. & Bennett M.D.** (1985): Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*. Intergeneric, interspecific and intraspecific variation. – Heredity 55: 307–313.
- Leitch I. & Bennett M.D.** (2004): Genome downsizing in polyploid plants. – Biological Journal of the Linnean Society 82: 651–663.
- Leitch I.J. & Bennett M.D.** (2007): Genome size and its uses: the impact of flow cytometry. – In: Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (eds), Flow cytometry with plant cells. Analysis of genes, chromosomes and genomes, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 153–176.
- Leitch I.J., Hanson L., Lim K.Y., Kovarik A., Chase M.W., Clarkson J.J. & Leitch A.R.** (2008): The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (*Solanaceae*). – Annals of Botany 101: 805–814.
- Levin D.A.** (1975): Minority cytotype exclusion in local plant populations. – Taxon 24: 35–43.
- Mallet J.** (2007): Hybrid speciation. – Nature 446: 279–283.

- Mandák B., Krak K., Vít P., Pavlíková Z., Lomonosova M.N., Habibi F., Wang L., Jellen E. N. & Douda J.** (2016): How genome size variation is linked with evolution within *Chenopodium* sensu lato. – *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 23: 18–32.
- Merxmüller H.** (1975): Diploide Hieracien. – *Anales del Instituto Botánico A. J. Cavanilles* 32: 89–196.
- Mogie M.** (1992): The evolution of asexual reproduction in plants. – Chapman & Hall, London.
- Morgan M.T.** (2001): Transposable element number in mixed mating populations. – *Genetical Research* 77: 261–275.
- Mráz P.** (2003): Mentor effects in the genus *Hieracium* s. str. (Compositae, Lactuceae). – *Folia Geobotanica* 38: 345–350.
- Mráz P., Chrtek J. jun., Fehrer J. & Plačková I.** (2005): Rare recent natural hybridization in the genus *Hieracium* s.str. – evidence from morphology, allozymes and chloroplast DNA. – *Plant Systematics and Evolution* 255: 177–192.
- Mráz P. & Paule J.** (2006): Experimental hybridization in the genus *Hieracium* s.str. (*Asteraceae*): crosses between selected diploid taxa. – *Preslia* 78: 1–26.
- Mráz P., Chrtek J. & Fehrer J.** (2011): Interspecific hybridization in the genus *Hieracium* s. str.: evidence for bidirectional gene flow and spontaneous allopolyploidization. – *Plant Systematics and Evolution* 293: 237–245.
- Nägeli C. & Peter A.** (1885): Die Hieracien Mittel-Europas. Monographische Bearbeitung der Piloselloiden mit besonderer Berücksichtigung der mitteleuropäischen Sippen. – München.
- Nogler G.A.** (1984): Gametophytic apomixis. – In: Johri B.M. (ed.), *Embryology of Angiosperms*, Springer, Berlin etc., pp. 475–518.
- Noyes R.D.** (2007): Apomixis in the *Asteraceae*: Diamonds in the rough. – *Functional Plant Science and Biotechnology* 1: 207–222.
- Parisod C., Holderegger R. & Brochmann C.** (2010): Evolutionary consequences of autopolyploidy. – *New Phytologist* 186: 5–17.
- Pellicer J., Fay M.F. & Leitch I.J.** (2010): The largest eukaryotic genome of them all? – *Botanical Journal of the Linnean Society* 164: 10–15.

- Petrov D.A.** (2002): DNA loss and evolution of genome size in *Drosophila*. – *Genetica* 115: 81–91.
- Price H.J., Dillon S.L., Hodnett G., Rooney W.L., Ross L. & Johnson S.** (2005): Genome Evolution in the Genus *Sorghum* (Poaceae). – *Annals of Botany* 95: 219–227.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P.** (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. – *Genetics* 155: 945–959.
- Ramsey J. & Schemske D.W.** (1998): Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. – *Annual Reviews in Ecology and Systematics* 29: 467–501.
- Raven P.H., Evert R.F. & Eichhorn E.** (1986): *Biology of plants*, 4th ed. – Worth Publishers, New York.
- Rejzková E, Fér T, Vojta J. & Marhold K.** (2008): Phylogeography of the forest herb *Carex pilosa* (Cyperaceae). – *Botanical Journal of the Linnean Society* 158: 115–130.
- Richards A.J.** (1997): *Plant Breeding Systems*. – Chapman and Hall, London.
- Richards A.J.** (2003): Apomixis in flowering plants: an overview. – *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B – Biological Sciences*, 358: 1085–1093.
- Ronquist F. & Huelsenbeck J.P.** (2003): MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. – *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Rosenberg O.** (1927): Die semiheterotypische Teilung und ihre Bedeutung für die Entstehung verdoppelter Chromosomenzahlen. – *Hereditas* 8: 305–338.
- Schultz F.W. & Schultz C.H.** (1862): *Pilosella* als eigene Gattung aufgestellt. – *Flora* 45: 417–441.
- Schuhwerk F.** (1996): Published chromosome counts in *Hieracium*. – <http://www-botanischestaatssammlung.de/projects/chrzlit.html> (accessed 15 September 2016)
- Schuhwerk F. & Lippert W.** (1998): Chromosomenzahlen von *Hieracium* (Compositae, Lactuceae). – *Sendtnera* 5: 269–286.
- Segraves K.A., Thompson P.S., Soltis P.S. & Soltis D.E.** (1999): Multiple origin

- of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossulariifolia*. – *Molecular Ecology* 8: 253–262.
- Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E. & Small R.L.** (2007): Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. – *American Journal of Botany* 94: 275–288.
- Skawińska R.** (1963): Apomixis in *Hieracium alpinum* L. – *Acta Biologica Cracoviensia* 5: 7–14.
- Soltis D.E., Soltis P.S., Schemske D.W., Hancock J.F., Thompson J.N., Husband B.C. & Judd W.S.** (2007): Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? – *Taxon* 56: 13–30.
- Soltis P.S. & Soltis D.E.** (2009): The role of hybridisation in plant speciation. – *Annual Reviews of Plant Biology* 60: 561–588.
- Stace C.A.** (1998): Sectional names in the genus *Hieracium* (*Asteraceae*) sensu stricto. – *Edinburgh Journal of Botany* 55: 417–441.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P. & Krahulec F.** (2006): Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. – *Taxon* 55: 447–450.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P., Rosenbaumová R., Peckert T. & Krahulec F.** (2007): Genome size variation and species relationships in *Hieracium* subgenus *Pilosella* (*Asteraceae*) as inferred by flow cytometry. – *Annals of Botany* 100: 1323–1335.
- Suda J., Meyerson L. A., Leitch I. J. & Pyšek P.** (2015): The hidden side of plant invasions: the role of genome size. – *New Phytologist* 205: 994–1007.
- Swift H.** (1950): The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 36: 643–654.
- Swofford D.L.** (2002): PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. – Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts.
- Šiško M., Ivanić A. & Bohanec B.** (2003): Genome size analysis in the genus *Cucurbita* and its use for determination of interspecific hybrids obtained using the embryo rescue technique. – *Plant Science* 165: 663–669.

- Štorchová H., Hrdličková R., Chrtek J. Jr, Tetera M., Fitze D. & Fehrer J.** (2000): An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. – *Taxon* 49: 79–84.
- Thalmann C., Guadagnuolo R. & Felber F.** (2000): Search for spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) in agricultural zones and evaluation of the genetic diversity of the wild species. – *Botanica Helvetica* 111: 107–119.
- Thompson J.D. & Lumaret R.** (1992): The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. – *Trends in Ecology and Evolution* 7: 302–307.
- Van Dijk P.J.** (2003): Ecological and evolutionary opportunities of apomixis: insights from *Taraxacum* and *Chondrilla*. – *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B – Biological Sciences*, 358: 1113–1120.
- Van Dijk P.J. & Vijverberg K.** (2005): The significance of apomixis in the evolution of the angiosperms: a reappraisal. – In: Bakker F.T., Chatrou L.W., Gravendeel B. & Pelser P. (eds), *Plant species-level systematics: new perspectives on pattern & proces*, *Regnum Vegetabile* 143: 101–116, Koeltz, Königstein.
- Weiss-Schneeweiss H., Greilhuber J. & Schneeweiss G.M.** (2006): Genome size evolution in holoparasitic *Orobanche* (*Orobanchaceae*) and related genera. – *American Journal of Botany* 93: 148–156.
- Wendel J.F., Cronn R.C., Johnston S. & Price H.J.** (2002): Feast and famine in plant genomes. – *Genetica* 115: 37–47.
- Zahn K. H. (1921–1923):** *Hieracium* L. – In: Engler H.G.A. (ed.), *Das Pflanzenreich: Regni vegetabilis conspectus*. IV/280, *Compositae–Hieracium*, Band 76: 1–32, Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Záveský L., Jarolímová V. & Štěpánek J.** (2005): Nuclear DNA content variation within the genus *Taraxacum* (*Asteraceae*). – *Folia Geobotanica* 40: 91–104.
- Zonneveld B.J.M.** (2001): Nuclear DNA content of all species of *Helleborus* (*Ranunculaceae*) discriminate between species and sectional division. – *Plant Systematics and Evolution* 229: 125–130.

Professional Curriculum vitae

Mgr. Jaroslav Zahradníček

5 August 1982 Varnsdorf

Czech Republic

Education and employment

since 2008 Ph.D. study in Botany, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague

2002–2008 Msc. study in Botany, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague

Employment

2010–2016 Institute of Botany ASCR, Průhonice, Czech Republic

Research interests

- karyology
- flow cytometry
- breeding systems
- taxonomy and evolution of *Hieracium* and *Andryala*
- molecular approaches and data analyses

SCI publication

Chrtek J. jun., Mráz P., **Zahradníček J.**, Mateo G. & Szélag Z. (2007): Chromosome numbers and DNA ploidy levels of selected species of *Hieracium* s.str. (*Asteraceae*). – Folia Geobotanica 42: 411-430.

Chrtek J. jun., **Zahradníček J.**, Krak K. & Fehrer J. (2009): Genome size in

Hieracium subgenus *Hieracium* (*Asteraceae*) is strongly correlated with major phylogenetic groups. – *Annals of Botany* 104: 161–178.

Ferreira M. Z., **Zahradníček J.**, Kadlecová J., de Sequeira M. M., Chrtek Jr., J. & Fehrer J. (2015): Tracing the evolutionary history of the little-known Mediterranean-Macaronesian genus *Andryala* (*Asteraceae*) by multigene sequencing. – *Taxon* 64: 535–551.

Zahradníček J. & Chrtek J. (2015): Cytotype distribution and phylogeography of *Hieracium intybaceum* (*Asteraceae*). – *Botanical Journal of the Linnean Society* 179: 487–498.

Chrtek J., Herben T., Rosenbaumová R., Münzbergová Z., Dočkalová Z., **Zahradníček J.**,

Krejčíková J. & Trávníček, P. (2017): Cytotype coexistence in the field cannot be explained by inter-cytotype hybridization alone: linking experiments and computer simulations in the sexual species *Pilosella echioides* (*Asteraceae*). – *BMC Evolutionary Biology* 17: 87.

Grant projects:

2005–2007: Molecular phylogeny and evolutionary trends in *Hieracium* (*Asteraceae*, *Lactuceae*) (GA ČR, Czech Science Foundation, GA206/05/0657, project leader J. Chrtek)

2007–2009: Interaction between cytotypes in sympatric populations of *Hieracium echioides* (GA UK, Grant Agency of Charles University in Prague, 1207/2007, project leader P. Trávníček)

2009–2011: Phylogeography and cytotype distribution of *Hieracium intybaceum* (GA UK, Grant Agency of Charles University in Prague, 72309/2009, project leader J. Zahradníček)

2010–2013: Phylogeny of subtribe *Hieraciinae* (*Asteraceae*) – a model example of contrasting evolutionary strategies in closely related lineages (GA ČR, Czech Science Foundation, GAP506/10/1363, project leader J. Chrtek)

2013–2015: Remarkable cytotype co-existence of *Pilosella echioides*: the only known sexual system with triploid dominance (GA ČR , Czech Science Foundation, 13-18610P, project leader P. Trávníček)