

## Introduction

### *Hieracium* s. l.

Within the family Asteraceae, *Hieracium* L. has been classified as a member of the tribe Lactuceae Cass. (e.g., Bremer 1994).

The genus *Hieracium* s. l. comprises perennial herbs with one to numerous leafless or foliated stems terminated by one to numerous capitula. Leaves are shaped from entire to deeply dentate or lobed. Involucres are formed by several irregularly imbricate rows of linear to lanceolate bracts. Individual ligules are usually yellow. Achenes are covered with 10-13 ribs of narrowly obconical shape (never beaked), carrying 1 or 2 rowed pappi. The basic chromosome number in the genus is  $x = 9$  (Zahn 1921-1923, 1922-1930, Sell & West 1976, Bräutigam & Schuhwerk 2002, Chrtek 2002, 2004). The genus is distributed in temperate areas of Europe, Asia, and North America, and in Central and South American mountains. Main centres of *Hieracium* diversity are located in European mountain ranges (Alps, Pyrenees, Carpathians, Sudeten Mts., mountains of the Balkan Peninsula), in American mountains and westernmost Asia.

*Hieracium* s. l. is famous for its high morphological diversity, and the opinions on its taxonomy are almost as diverse as the genus itself: the number of recognized species varies from 500 to almost 10 000 (Willis 1973) among the different taxonomic concepts. Two main directions are traditionally distinguished in 'Hieraciology'. Species concepts elaborated by Scandinavian and British authors (Norrlin 1888, Elfstrand 1893, Norrlin 1912, Pugsley 1948, Sell & West 1976, Sell & Murrell 2006, Tennant & Rich 2008, Tyler 2011) and followed by botanists from the former Soviet countries (Juxip 1960, Shlyakov 1989) are based on the recognition of microspecies, i.e., morphologically and ecologically discrete forms are given species rank. On the contrary, Central European taxonomists (e.g., Nägeli & Peter 1885, Zahn 1921-1923, 1922-1930) are supporting a broader definition of species. Within each species, numerous taxa of lower rank were described. Generally, the subspecies recognised by the Central European botanists are taxonomically equivalent to the species of the Scandinavian and British concepts. According to Sell (1987), the basic difference among these two schools of thought is that: "The Central European botanists believe they can tell how these species originated and the Scandinavian and British botanists do not think this is possible."

The most comprehensive taxonomic treatment was published by Zahn (1921-23). According to his monograph, the genus includes 756 species further divided into many subspecies (the index of his work contains approximately 18,000 names). Based on morphology, he distinguished two classes of species: (i) Basic species (*species principales collectivae*, Hauptarten) that possess unique sets of morphological characters and are therefore well distinguishable from each other, and (ii) Intermediate species (*species intermediae collectivae*, Zwischenarten) that combine characters typical for two or more basic species in their morphology and are supposed to be of hybrid origin.

Zahn divided the genus into four subgenera, namely subgen. *Euhieracium* (= *Hieracium* s.str.), subgen. *Pilosella* (Hill) S.F.Gray, subgen. *Stenotheca* Fries (correct name: subgen. *Chionoracium* Dum.), and subgen. *Mandonia* (Schultz-Bip.) Zahn. The subgenus *Mandonia* is nowadays merged with subgen. *Chionoracium* by most

authors. The subgenera markedly differ from each other with respect to morphology, breeding systems, DNA content, geographic distribution, and ecological demands. Furthermore, there is no evidence for recent hybridization among the subgenera, although hybridization is (or was in the past) frequent within the genus (see below). Species of the rather well-defined subgen. *Pilosella* are often treated as a separate genus (Sell & West 1976, Bräutigam & Greuter 2007). Similarly, a separate genus *Stenotheca* Monn. was described and is accepted by some authors (Sennikov & Illarionova 2002).

### ***Hieracium* s. str.**

*Hieracium* s. str. comprises perennial herbs with one to few leafless or foliated stems. Basal leaves form rosettes or may be missing completely. The leaf margin is entire to deeply dentate, and at least the basal leaves are usually distinctly petiolate. The margins of receptacle pits are more or less dentate, sometimes with more or less long fimbriae. Ligules are yellow, sometimes dingy yellow, rarely greenish. Achenes are 2.5-5 mm long, 10-ribbed; ribs are apically confluent in an obscure ring. The pappus hairs are arranged into two unequal series (Sell 1987). The subgenus is distributed in temperate regions of Europe, Asia, northernmost Mediterranean Africa, and North America (and introduced to several other regions, e.g. to New Zealand). The subgenus has a broad ecological amplitude and can be found in diverse kinds of different habitats from lowland meadows through forest and forest margins to alpine highlands (Zahn 1921-1923).

The estimated number of species highly varies depending on the taxonomic concept (Sell 1987). According to Zahn (1921-1923), the subgenus comprises 500 species. Only a small part of the species is diploid; the vast majority of the taxa are tri- and tetraploids (Merxmüller 1975, Schuhwerk 1996, Schuhwerk & Lippert 1998, Chrtek et al. 2007); pentaploids are extremely rare (Chrtek et al. 2004, Tennant & Rich 2008). Aneuploidy is considered to be very rare (for reference see Schuhwerk 1996). Diploids are confined to certain geographic areas that mostly represent never glaciated refuges. They have been reported from Southwest Europe, the Eastern Carpathians and the Balkan Peninsula (e.g. Merxmüller 1975, Chrtek 1996, Mráz 2003, Castro et al. 2007). On the other hand, polyploids are widespread also in areas that have been covered by ice sheets during the last glacial age (Merxmüller 1975). For some taxa, diploid as well as polyploid cytotypes were detected (e.g. Schuhwerk & Lippert 1998, Chrtek et al. 2007).

Variation in reproductive modes was recognized in *Hieracium* s. str. as well. The diploid species (and diploid cytotypes of species, if diploids as well as polyploids were recorded) are considered to be obligatory sexual with regular micro- and macrosporogenesis (Gustafsson 1947) and self-incompatible (Bergman 1941, Rosenberg 1927). However, the presence of heterospecific pollen on stigma can induce the breakdown of self-incompatibility under some circumstances (a process called mentor effect; Mráz 2003; Mráz & Paule 2006). The polyploid species are apomictic. Diplospory of the *Antennaria*-type was described for the subgenus (Bergman 1941, Noyes 2007). So far, there is no evidence for residual sexuality in the polyploid taxa, therefore they are considered to be obligatory apomictic (Mráz & Paule 2006, Zahradníček 2008).

The high number of intermediate species nowadays recognized as distinct taxa could serve as evidence for extensive hybridization occurring in the past. The majority of the diploid sexuals are considered as basic species (Mráz et al. 2005).

Therefore, hybridization involving these taxa is most probably the source of the huge morphological variation observed in the subgenus. Hybrid forms arising from these crosses were stabilized by polyploidization and apomixis. On the contrary, recent hybridization in *Hieracium* s. str. is highly restricted. Despite successful crossing experiments among diploids (Mráz & Paule 2006) as well as diploids and polyploids (where the latter acted as pollen donors; Mráz & Tomčíková 2004), only a very few recent hybrids are found in nature (Chrtek, personal communication), and only two cases have been published so far, namely *Hieracium krasanii* (Mráz et al. 2005, 2011) and *H. grofae* (Chrtek et al. 2006). Moreover these hybrids are often sterile and produce only small amount of viable pollen.

### **Previous molecular and cytological studies on *Hieracium***

While much attention was paid to examine *Hieracium* species diversity, very little is known about their relationships. Only two molecular phylogenetic studies dealing with *Hieracium* s. l. have been published so far (Fehrer et al. 2007; Gaskin & Wilson 2007). Although both studies include some representatives of *Hieracium* s. str., neither of them was primarily focused on the relationships within this subgenus. The work of Fehrer et al. (2007) used sequences of two cpDNA markers (*trnT-trnL* intergenic spacer and *matK* gene) and the nrDNA ITS to elucidate the relationships within the subgenus *Pilosella*. However, a representation of taxa from the subtribe Hieraciinae (including several species of *Hieracium* s. str.) was sampled that allowed revealing some patterns concerning *Hieracium* s. str. as well. In the ITS analyses, it formed a monophyletic group together with subgen. *Chionoracium*, whereas this relationship was not supported based on the cpDNA data, the reason of which was a chloroplast capture event involving a *Pilosella* lineage. Most of the relationships among the investigated *Hieracium* s. str. remained unresolved due to low genetic variation and apparently very recent speciation. Gaskin & Wilson (2007) investigated the phylogenetic relationships of the native North American *Hieracium* s. str. and *Chionoracium* taxa to the introduced *Pilosella* species based on the *trnT-trnF* and *petN-psbM* cpDNA spacers. In concordance with Fehrer et al. 2007, *Hieracium* s. str. taxa were found to be polyphyletic with these markers, and the relationships among them were not completely resolved. The results of these studies suggested that additional and more variable markers have to be used in order to reconstruct the phylogenetic relationships within *Hieracium* s. str. in more detail.

In contrast to molecular genetic approaches, flow cytometry is widely used to investigate *Hieracium* s. l. (Bräutigam & Bräutigam 1996, Suda et al. 2007, Trávníček et al. 2011). Several studies confirmed that variation in genome size exists among *Hieracium* s. str. and *Pilosella* (Suda et al. 2007) as well as within both of these subgenera (Bräutigam & Bräutigam 1996, Suda et al. 2007, Zahradníček 2008). In *Hieracium* s. str., up to 1.22- fold variation of 1Cx values among species was observed (Zahradníček 2008). Not much is known about the origin of this variation, and the lack of information on species relationships precluded its investigation from the phylogenetic perspective. Therefore, the data obtained in the frame of the diploma thesis of J. Zahradníček (the diploma thesis was part of the same research project as the presented PhD. thesis) were used in combination with molecular data to evaluate the significance of the phylogenetic signal of the observed genome size variation.

## Aims of the thesis

The present work is the first attempt to elucidate the interspecific relationships within *Hieracium* s. str. using multiple molecular markers. Due to the extremely high number of recognized species, it is focused on Zahn's (1921–1923) basic species (both diploid and polyploid). This approach would cover the entire genetic variation and delimit the major evolutionary lineages within the subgenus and allow the identification the basic patterns and processes of speciation. The concrete aims of the thesis could be summarized as follows:

- 1.) Identify the basic phylogenetic relationships among the species of *Hieracium* s. str. using cpDNA and nrDNA markers and compare it with the existing sectional classification
- 2.) Investigate whether the well documented variation in genome size could be correlated to the subgenus' phylogeny
- 3.) Develop highly variable low-copy nuclear markers for further phylogenetic studies of *Hieracium* s. l. and related groups
- 4.) Assess the extent of hybridization among the major evolutionary lineages of *Hieracium* s. str. and infer the origin of polyploids

## Material and methods

Forty six basic species of *Hieracium* s. str., diploids as well as polyploids, represented by 58 accessions were included to the phylogenetic studies. For development of low-copy nuclear markers (LCNM) plants from 7 other tribes (represented by one species) of the Asteraceae were sampled in addition to the selected *Hieracium* accessions. Living plants were collected and transferred to the experimental garden of the Institute of Botany of the Academy of Sciences of the Czech Republic in Průhonice. Fresh leaf material from cultivated plants was used for flow-cytometry and DNA extractions.

Chromosome counts, breeding system and genome size estimate were carried out in frame of the diploma thesis of J. Zahradníček (2008), where all the procedures are described.

DNA extractions were performed according to Štorchová et al. (2000). Sequences of two intergenic spacers of the cpDNA, *trnT-trnL* and *trnV-ndhC*, internal and external transcribed spacers (ITS and ETS) of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) and one newly developed LCNM (*squalene synthase* – *sqs*) were amplified and sequenced using already developed (Noyes 2006, Shaw et al. 2007, 2005, Blattner 1999, Taberlet et al. 1991) or newly designed 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), RAxML (Stamatakis 2006) and MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck 2003).

Candidate genes for novel LCNM were selected based on database comparison of *Lactuca* expressed sequence tag (EST) libraries (obtained at <http://compgenomics.ucdavis.edu>) with Asteraceae nucleotide sequences from obtained from public databases. The selected genes were checked for copy number

and sequence divergence of paralogs (if detected) based on literature search and sequences from broad range of taxa spanning several families obtained from public databases. Primers targeting five candidates were designed. Pilot study based on a small set of diploid accession from the subtribe Hieraciinae was performed to evaluate the evolutionary dynamics (presence of paralogs and pseudogenes), variability and phylogenetic signal of these candidate genes. Furthermore these genes were cross-amplified on representatives of 7 other Asteraceae tribes.

## Results and discussion

Initially, the basic phylogenetic relationships within *Hieracium* s. str. were investigated based on the analyses of nrDNA ITS and ETS and the *trnT-trnL* region of the cpDNA. The variation in the ITS was very low and revealed no phylogenetic pattern. Therefore, the data for this marker are not presented in the thesis, but will be published later in a paper on the molecular evolution of this marker. The variation in the ETS was slightly higher, and two major phylogenetic lineages composed of taxa with Eastern or Western European origin were identified. Several well supported lineages were further resolved within the Eastern clade. Within the Western clade, only one monophyletic subgroup, formed by Pyrenean accessions, was found. Most of the western accessions had unresolved positions at the base of the clade. In contrast to the low interspecific variation, extremely high intraindividual polymorphism was observed in most of the accessions independent of the ploidy level, indicating a lack of sequence homogenization via concerted evolution. However, in several accessions, even polyploid ones, completely homogenized sequences were found. Interspecific hybrids were identified based on character state additivity of the sites showing intraindividual polymorphism. Hybrid origin was inferred for half of the analyzed accessions, including many diploid taxa. Further, hybrids were identified based on incongruence of the nuclear and chloroplast datasets. Hybridization among as well as within the major clades was evident. Altogether, 17 different parental combinations of these hybrids were described. However, this represents only a conservative estimate; the real extent of hybridization is most probably higher, but remained undetected due to the low interspecific variation that usually allowed only an assignment to subclades, but not to individual species. Several ETS ribotypes not matching any of the sequences identified in non-hybrid accessions were found in the genomes of several hybrids. Similarly, several polyploid hybrids with unique cpDNA haplotypes were found that did not correspond to those of any diploid taxon. These 'unknown' ribotypes and haplotypes may be attributed to unsampled or extinct variation.

Variation in genome size within the subgenus was previously reported in the diploma thesis of J. Zahradníček. Therefore, we investigated whether this variation reflects the revealed phylogeny or whether it rather correlates with other, mainly geographic (latitude, altitude) and ecological (light intensity, temperature) patterns. Phylogeny was found to be the most important factor explaining the patterns of variation in genome size. No significant correlation with ecology or geography was found.

The still relatively low variability in the ETS indicated that additional nuclear markers with higher variability had to be applied to issues that could not be solved in frame of the previous study. Therefore, novel low-copy nuclear markers were developed for further phylogenetic study of the subgenus. Candidate genes were

selected based on the comparison of an expressed sequence tags (EST) library of *Lactuca* with Asteraceae sequences available from public sequence databases. Three low-copy nuclear genes – *squalene synthase (sqs)*, *gamma-glutamylcysteine synthetase (gsh1)* and *glycine hydroxymethyltransferase (shmt)* – were included to a pilot study in which their variability, phylogenetic signal and evolutionary dynamics (pseudogenization or locus duplication) were investigated on a representative set of accessions from the subtribe Hieraciinae. All three genes showed to be single-copy within this sample set, and all had substantially higher variation than ITS. Furthermore, successful cross-amplification in members of seven other tribes of the Asteraceae was performed, demonstrating that these markers can be used beyond the Hieraciinae as well.

Finally, one of the newly developed low-copy nuclear markers (*sqs*) and an additional cpDNA region (the *trnV-ndhC* intergenic spacer) were analyzed on the same set of accessions as the ETS. Both, the combined cpDNA dataset (composed of the previously used *trnT-trnL* and the newly analyzed *trnV-ndhC* regions) and *sqs* were incongruent with the results based on the ETS with respect to the major phylogenetic groups. Instead, they rather reflected the subgroups recognized within these major groups. In several cases, the cpDNA haplogroups of the western accessions formed monophyletic groups with those identified for the eastern accessions. According to the *sqs*, 14 monophyletic groups were resolved within the subgenus, but the relationships among these were hardly supported at all. Furthermore, more than half of the accessions were polyphyletic and contained alleles from more than one clade. These included several accessions where hybrid origin had not been proposed based on ETS. Additional hybridization or incomplete lineage sorting or a combination of these could explain these patterns, but with the currently available data, neither of these hypotheses can be confirmed or rejected. Most of these were accessions with basal western position according to ETS, or members of the *H. porrifolium* and Balkan subgroups of the Eastern clade. On the other hand, several hybrid accessions were monophyletic with respect to their *sqs* alleles, probably due to genetic drift or selection (not necessarily acting directly on *sqs*, but on some locus in close physical proximity), eliminating one of the parental alleles from the hybrid genomes. Several clades composed exclusively of alleles isolated from hybrid accessions were identified. In these, alleles mainly from accessions that contained the ‘unknown’ ribotypes were placed. Similarly, unique cpDNA haplotypes were found in hybrids or polyploids.

## Conclusions

The low variation of the ETS and the absence of deeper phylogenetic relationships in the *sqs* and cpDNA data may be explained by relatively recent speciation of *Hieracium* s. str. Extensive hybridization was previously anticipated for the subgenus, concerning especially the intermediate species. This study involved solely basic species, for which hybrid origin was not previously anticipated based on their morphology. Initially, we expected that some of the polyploids might be hybrids. However, the extent of hybridization revealed by this study by far exceeded all expectations. Particularly surprising is the fact that even several diploid accessions were found to be of hybrid origin. Therefore, interspecific hybridization and allopolyploidy can be considered as the major driving forces of speciation in the subgenus.

Unique genetic material was found in hybrid accessions by all three markers.

With high probability it could represent extinct diploid parental lineages of these accessions, indicating that the diversity within the subgenus was much higher in the past than is observed nowadays. From this perspective, even those taxa that were considered as major evolutionary units rather represent intermediate derivatives of this immense past variation.

## Úvod

### *Hieracium* s.l.

Rod jestřábník (*Hieracium* s. l.) je v rámci čeledi Asteraceae zařazen do tribu Lactuceae (např. Bremer 1994). Do rodu jsou řazeny víceleté byliny s jednou nebo několika bezlistými nebo listnatými lodyhami, které jsou zakončeny jedním nebo několika úbory. Listy jsou různorodé od celokrajných přes zubaté až po laločnaté. Zákrov je tvořen několika řadami listů. Barva květů je žlutá. Plodem jsou nažky, většinou vroubkaté s jedno nebo dvouřadým chmýrem. Základní počet chromozomů v rodě je  $n = 9$  (Chrtek 2004, 2002, Bräutigam & Schuhwerk 2002, Sell & West 1976, Zahn 1921-1923, 1922-1930). Rod je rozšířený v oblastech mírného pásma Evropy, v Asii, Severní Americe a v pohořích Střední a Jižní Ameriky. Za hlavní centra diverzity rodu jsou považovány Evropské pohoří (Alpy, Pyreneje, Karpaty, Sudety a pohoří Balkánského poloostrova), Západní Asie a Americká pohoří.

Jestřábníky jsou známy svou nesmírnou morfologickou variabilitou. Názory na jejich taxonomii jsou skoro tak různorodé jako je rod sám: jenom počet druhů popsaných v rámci různých taxonomických přístupů se liší drasticky (od 500 po téměř 10 000; Willis 1973). V taxonomii jestřábníků existují dva základní přístupy. Taxonomické koncepty skandinávských a britských botaniků (Tyler 2011, Tennant & Rich 2008, Sell & Murrell 2006, Sell & West 1976, Pugsley 1948, Norrlin 1912, Elfstrand 1893, Norrlin 1888), uznávané také vědci z bývalého Sovětského Svazu (Shlyakov 1989, Juxip 1960), jsou založeny na rozlišování mikrospecií (t. j. jednotlivé morfologicky a nebo ekologicky diskrétní typy jsou klasifikovány na úrovni druhů). V opozici k těmto názorům stojí středoevropská škola hieraciologů (např. Nägeli & Peter 1885, Zahn 1921-1923, 1922-1930), vycházející ze širšího pojetí druhů, v rámci kterých jsou dále rozlišovány četné kategorie nižších taxonomických úrovní. Obecně ale lze říct, že poddruhy popsané středoevropskými botaniky jsou ekvivalentem druhů rozlišovaných v rámci britského a skandinávského názorového proudu.

Asi nejpropracovanější taxonomický koncept byl publikován Zahnem (1921–1923). Podle této monografie je do rodu *Hieracium* zařazeno 756 druhů, které jsou dále rozděleny do četných poddruhů (jmenný rejstřík monografie obsahuje celkem 18 000 položek). Na základě morfologie vyčlenil Zahn dvě kategorie druhů: (i) základní druhy (species principales collectivae, Hauptarten), jsou morfologicky jedinečné a navzájem dobře odlišitelné, jsou chápány jako základní evoluční linie rodu a (ii) přechodné druhy (species intermediae collectivae, Zwischenarten), z hlediska morfologie jsou kombinací znaků charakteristických pro dva a nebo i více základních druhů a předpokládá se že vznikali jejich hybridizací.

Zahn (1921–1923) rozdělil rod do čtyř podrodů: subgen. *Euhieracium* (= *Hieracium* s.str.), subgen. *Pilosella* (Hill) S.F.Gray, subgen. *Stenotheca* Fries (platné jméno: subgen. *Chionoracium* Dum.), a subgen. *Mandonia* (Schultz-Bip.) Zahn.

Samostatný podrod *Mandonia* již v dnešní době většina autorů nerozlišuje, je včlenen do podrodu *Chionoracium*. Jednotlivé podrody se navzájem liší morfologicky, způsoby rozmnožování, velikostí genomu, rozšířením i ekologickými nároky. I když hybridizace je (a nebo byla v minulosti) v rámci podrodů velice častá, neexistují žádné indicie, které by poukazovali na křížení mezi podrody. Podle některých taxonomických konceptů jsou podrody *Pilosella* (Bräutigam & Greuter 2007, Sell & West 1976) a *Chionoracium* (Sennikov & Illarionova 2002) povýšeny na úroveň samostatných druhů.

### ***Hieracium* s. str.**

Do rodu jestřábník v jeho užším pojetí (t. j. podrod *Hieracium* s. str.) jsou zařazeny víceleté byliny s jednou až několika bezlistými a nebo listnatými lodyhami. Listy tvoří na bázi listovou růžici a nebo úplně chybí. Okraje listů jsou celistvé až hrubě nepravidelně zubaté. Listy jsou na bázi obvykle řapíkaté. Květy jsou žluté nebo jasně žluté, zřídka nazelenalé. Nažky jsou 2.5–5 mm dlouhé, na hoře s nízkým límečkem. Chmýr je dvouřadý (Sell 1987). Podrod je rozšířen v mírném pásmu Evropy, Asii, severní Africe a Severní Americe. Byl zavlečen do několika dalších částí světa (např. na Nový Zéland). Podrod má širokou ekologickou amplitudu a vyskytuje se na řadě různorodých stanovišť od nížinných luk, přes lesní podrosty, okraje lesů až po horské oblasti ležící nad hranicí lesa (Zahn 1921– 923).

Počet druhů popsáných v rámci *Hieracium* s. str. se u jednotlivých autorů výrazně liší (Sell 1987). Zahn ve své klasifikaci (1921–1923) popsal 500 druhů. Jenom malá část z nich je diploidní, velká většina jsou tri- a tetraploidní (Chrtek et al. 2007, Schuwerk & Lippert 1998, Schuwerk 1996, Merxmüller 1975), pentaploidní taxony byly také popsány ale vyskytují se jen velice zřídka (Tennatn & Rich 2008, Chrtek et al. 2004). Diploidní druhy se vyskytují v oblastech glaciálních refugií, jejich výskyt byl zaznamenán v jihovýchodní Evropě, východních Karpatech a Balkánském poloostrově (např. Castro et al. 2007, Mráz 2003, Chrtek 1996, Merxmüller 1975). Na druhé straně polyploidie jsou hojněji rozšířeny (Merxmüller 1975). U některých taxonů byly popsány diploidní i polyploidní cytotypy (např. Chrtek et al. 2007, Schuwerk & Lippert 1998).

U jestřábníků byly zjištěny různé druhy rozmnožování. Diploidní druhy (a diploidní cytotypy druhů s více ploidními úrovněmi) jsou sexuální (Gustafsson 1947) a autoinkompatibilní (Rosenberg 1927, Bergman 1941). I když přítomnost cizorodého pylu (pylu jiného taxonu), může vyvolat samosprášení (proces byl popsán jako tzv. mentor efekt, viz Mráz & Paule 2006, Mráz 2003). Polyploidní taxony se rozmnožují apomikticky, byla u nich popsána diplosporická apomixie typu *Antennaria* (Noyes 2007, Bergman 1941). U těchto taxonů zatím nebyla prokázána reziduální sexualita, proto jsou považovány za obligátně apomiktické (Zahradníček 2008, Mráz & Tomčíková 2004).

Velké množství přechodných entit, často popsáných jako samostatné druhy jsou důkazem rozsáhlé hybridizace probíhající v minulosti. Většina diploidních, sexuálních taxonů patří mezi základní druhy (Mráz et al. 2005). Proto je hybridizace mezi nimi jednou z možných zdrojů popisované rozsáhlé variability. Hybridi vznikající touto cestou byly stabilizovány polyploidizací a apomiktickým způsobem rozmnožování. Na druhé straně recentní hybridizace je v rámci této skupiny velmi vzácná. I přes úspěšná experimentální křížení mezi diploidy (Mráz & Paule 2006) i diploidy a polyploidy (polyploidní taxony sloužili v těchto pokusech jako dárce pylu;



Mráz & Tomčíková 2004), bylo v přírodě pozorováno jen málo recentních hybridů (J. Chrtek, ústní sdělení) a jenom dva případy byly publikovány: *Hieracium krasanii* (Mráz et al. 2011, 2005) a *H. grofae* (Chrtek et al. 2006).

## Předchozí molekulární a cytologické studie

I přesto, že diverzitě jestřábníku byla věnována nemalá pozornost a taxonomie této skupiny je dobře propracovaná, fylogenetické vztahy v rámci rodu jsou téměř neznámé. Jsou známy jen dvě molekulárně systematické studie zaměřené na rod *Hieracium* v jeho širším ponětí (*Hieracium* s. l.; Fehrer et al. 2007 a Gaskin & Wilson 2007). I když do obou studií byly zahrnutí reprezentanti podrodu *Hieracium* s. str., ani jedna z nich nebyla primárně zaměřená na objasnění vztahů v rámci tohoto podrodu. Práce Fehrer et al. (2007) studovala vztahy v rámci podrodu *Pilosella* pomocí analýzy sekvencí dvou chloroplastových (*matK* a *trnT-trnL*) a jednoho jaderného úseku (nrDNA ITS). Kromě zástupců podrodu *Pilosella* bylo do této studie zahrnuto i několik jedinců z podrodu *Hieracium* s. str., což umožnilo zjištění několika faktů týkajících se i tohoto podrodu. Podrod *Hieracium* s. str. je podle výsledků této studie polyfyletický a jasně oddělný od podrodu *Pilosella*. Podle výsledků analýz ITS tvoří *Hieracium* s. str. monofyletickou skupinu společně s americkým podrodem *Chionoracium*. Tyto vztahy ale nebyly podpořeny výsledky analýzy chloroplastové DNA. Vztahy mezi taxony *Hieracium* s. str., které byly do analýzy zařazeny zůstali z velké míry nevyjasněné. Práce autorů Gaskin & Wilson (2007) byla zaměřená na objasnění vztahů mezi původními severoamerickými taxony z podrodů *Chionoracium* a *Hieracium* s. str. a introdukovanými taxony z podrodu *Pilosella* pomocí analýzy chloroplastové DNA (konkrétně úseků *trnT-trnF* a *petN-psbM*). V souladu s předchozí prací (Fehrer et al. 2007), zástupci podrodu *Hieracium* s. str. netvořili monofyletickou skupinu a vztahy mezi nimi nebyly vyřešené. Výsledky těchto studií naznačují, že podrobnější rekonstrukce fylogenetických vztahů v rámci podrodu *Hieracium* s. str. vyžaduje použití variabilnějších molekulárních markerů.

Průtoková cytometrie je na rozdíl od molekulárních metod hojně používána při studiích v rámci celého rodu *Hieracium* s. l. (Trávníček et al. 2011, Zahradníček 2008, Suda et al. 2007, Bräutigam & Bräutigam 1996). Výsledky několika studií potvrdily existenci rozdílů ve velikosti genomu jednak mezi podrody *Hieracium* s. str. a *Pilosella* (Suda et al. 2007), stejně tak v rámci nich (Zahradníček 2008, Suda et al. 2007, Bräutigam & Bräutigam 1996). Mezi zástupci *Hieracium* s. str. byli zjištěné rozdíly v obsahu celkové DNA na monoploidní úrovni dosahující 1.22 násobku (Zahradníček 2008). Příčiny těchto rozdílů zatím objasněny nebyly a nedostatečně objasněné vztahy mezi jednotlivými druhy znemožňují jejich zkoumání z fylogenetického hlediska.

## Cíle disertační práce

Předkládaná práce je prvním pokusem o detailnější vyřešení fylogenetických vztahů v rámci podrodu *Hieracium* s. str. za použití několika molekulárních markerů. Kvůli obrovskému množství popsáných taxonů, je tato studie založena na jejich reprezentativním výběru. Do analýz byly zahrnuty výlučně Zahnovy základní druhy (diploidní i polyploidní). Tímto přístupem by mělo být možné pokrýt celkovou genetickou variabilitu, identifikovat hlavní evoluční linie a objasnit základní procesy speciace v rámci podrodu. Konkrétní cíle práce jsou následovné:

- 1.) Identifikace základních fylogenetických vztahů v rámci podrodu *Hieracium* s. str. a jejich porovnání s taxonomií na úrovni sekcí.
- 2.) Objasnění příčin variability velikosti genomu zjištěné v rámci podrodu a její korelace k fylogenetickým vztahům.
- 3.) Vývoj nových low-copy jaderných markerů pro další fylogenetické studie v rodu *Hieracium* a příbuzných skupinách
- 4.) Zjištění rozsahu hybridizace mezi hlavními evolučními liniemi v rámci *Hieracium* s. str. a identifikace původu hybridních taxonů.

## **Materiál a metodika**

V rámci této studie bylo analyzováno 58 jedinců reprezentujících 46 základních diploidních i polyploidních druhů *Hieracium* s. str. Za účelem vývoje nových low-copy jaderných markerů byl získán materiál zástupců ze sedmi dalších tribů z čeledi Asteraceae. Živé rostliny z terénních sběrů byly pěstovány na pozemcích experimentální zahrady Botanického ústavu AV ČR v Průhonících. Na cytometrické analýzy a extrakci DNA byl použit čerstvý materiál z těchto rostlin.

Stanovení počtu chromozomů, způsobu rozmnožování a velikosti genomu byly zpracovávány v rámci diplomové práce J. Zahradníčka (2008), ve které jsou náležitě popsány.

Celková genomická DNA byla izolována podle protokolu popsaného v práci Štorchová et al. (2000). Byly analyzovány sekvence dvou chloroplastových úseků (*trnT-trnL* a *trnV-ndhC*), mezerníkových úseků jaderné ribozomální DNA (ITS a ETS) a jednoho nově vyvinutého low-copy jaderného markeru (genu kódujícího protein squalene syntetázu – *sqs*). Tyto úseky byly amplifikovány a sekvenovány pomocí již publikovaných (Noyes 2006, Shaw et al. 2007, 2005, Blattner 1999, Taberlet et al. 1991) a nebo nově navržených primerů.

Analýzy fylogenetických vztahů založené na metodách maximální parsimonie, maximální věrohodnosti a Bayesovské analýzy byly počítány za pomoci specializovaných počítačových programů PAUP\* (Swofford 2002), RAxML (Stamatakis 2006) and MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck 2003).

Vhodné kandidátské geny pro nové jaderné low-copy markery byly vybírány na základě porovnání knihoven transkriptomů rodu *Lactuca* (získaných z internetové stránky <http://compgenomics.ucdavis.edu>) se sekvencemi nukleotidů různých zástupců čeledi Asteraceae získaných z veřejně přístupných databází. U vybraných genů byli zjišťovány informace o počtu kopií u různých organismů na základě informací dostupných v literatuře a porovnáním jejich sekvencí získaných z databází. Pro tři z těchto genů byly navrženy primery. Následně byla stanovena jejich variabilita, fylogenetický signál a evoluční dynamika (identifikace duplikovaných lokusů a pseudogenů) na malém počtu diploidních zástupců ze subtribu Hieraciinae. Dále byly tyto úseky amplifikovány u zástupců dalších 7 tribů rámci čeledi Asteraceae.

## **Výsledky a diskuse**

V rámci první studie byly objasněny fylogenetické vztahy v podrodu *Hieracium* s. str. na základě analýzy sekvencí jaderné ribozomální DNA (konkrétně

mezerníkových úseků ITS a ETS) a jednoho chloroplastového úseku (*trnT-trnL*). V rámci úseku ITS byla zjištěna pouze nepatrná variabilita, proto nebylo možné na základě tohoto markeru rekonstruovat žádné fylogenetické vztahy. Na základě analýzy sekvencí ETS byly v podrodu *Hieracium* s. str. identifikovány dvě základní vývojové větve, složené z druhů s východoevropským a nebo západoevropským původem. V rámci východní větve bylo dále identifikováno několik dobře podpořených monofyletických podskupin. V rámci západní větve tvořili monofyletickou skupinu jenom zástupci pyrenejských taxonů. Fylogenetické vztahy u dalších západních taxonů zůstaly neobjasněné. Sekvence ETS u velké většiny analyzovaných jedinců se vyznačovaly vysokou mírou intraindividuální variability, která přesahovala variabilitu na mezidruhové úrovni, což naznačuje že v rámci této skupiny nedochází k procesu koncertované evoluce (concerted evolution). Překvapivě vysoká míra intraindividuální variability byla pozorována i u diploidních taxonů. Na druhé straně u několika polyploidních jedinců byly nalezeny úplně homogenizované sekvence. Na základě aditivity nukleotidových bazí na těchto polymorfních pozicích bylo možné identifikovat jedince hybridního původu. Další případy hybridizace byly identifikovány na základě protichůdných výsledků analýz jaderné a chloroplastové DNA. Hybridní původ byl prokázán téměř u poloviny analyzovaných jedinců, nezávisle na jejich ploidii. Celkově bylo identifikováno 17 různých kombinací rodičovských linií. Tento odhad je ale značně konzervativní, předpokládá se že hybridizace probíhala ve větší míře, ale identifikace dalších hybridů je znemožněna nízkou variabilitou analyzovaných molekulárních markerů. V genomech některých rostlin s prokázaným hybridním původem byly identifikované ribotypy, které nebyly nalezeny u žádné z nehybridních rostlin. Tyto neznámé sekvence mohou být známkou nereprezentativního (neúplného) výběru jedinců a nebo představují genetickou stopu již neexistujících taxonů, patřících k rodičovským liniím těchto hybridů.

V rámci *Hieracium* s. str. byla v minulosti popsána mezidruhová variabilita ve velikosti genomu. Cílem druhé studie bylo zjistit zda tato variabilita odráží zjištěné fylogenetické vztahy a nebo na ni mají vliv jiné, hlavně geografické (nadmořská výška a zeměpisná šířka) a nebo ekologické (intenzita světla a teplota) faktory. Fylogenetické vztahy byly identifikovány jako hlavní faktor ovlivňující variabilitu velikosti genomu ve studované skupině. Mezi velikostí genomu a zkoumanými geografickými a ekologickými faktory nebyly zjištěné signifikantní korelace.

Detailnější rekonstrukce fylogenetických vztahů vyžaduje použití dalších jaderných markerů. Cílem třetí studie bylo proto identifikovat nové jaderné low-copy geny s vyšší variabilitou než byla zjištěna u ETS. Vhodné kandidátské geny byly vybírány na základě porovnání knihoven transkriptomů rodu *Lactuca* se sekvencemi nukleotidů různých zástupců čeledi Asteraceae získaných z veřejně přístupných databází. Jako nejvhodnější byly vybrány následující tři geny s nízkým počtem kopií: *squalene syntetáza (sqs)*, *gamma-glutamylcysteine syntetáza (gsh1)* and *glycine hydroxymethyltransferáza (shmt)*. Jejich sekvence byly analyzovány u menšího počtu zástupců ze subtribu Hieraciinae za účelem zjištění mezidruhové variability, fylogenetického signálu a počtu kopií. U všech tří genů byla u studovaného vzorku rostlin zjištěna jen jedna kopie. Všechny tři vykazovaly vyšší variabilitu v porovnání s ITS. Dále byly úspěšně amplifikovány u zástupců dalších 7 tribů v rámci čeledi Asteraceae, což naznačuje jejich využitelnost pro fylogenetické studie i v jiných skupinách v rámci čeledi.

V rámci poslední studie byly analyzovány sekvence jednoho z nově vyvinutých

low-copy markerů, *sqs*, a dalšího chloroplastového úseku (*trnV-ndhC*) na souboru jedinců z první studie. Výsledky analýz obou nových souborů dat (tedy *sqs* i kombinovaný soubor dat z dvou cpDNA úseků *trnT-trnL* a *trnV-ndhC*) byly v rozporu z výsledky zjištěnými v první studii. Dvě hlavní vývojové linie zjištěné na základě analýzy ETS nebyly identifikovány pomocí cpDNA ani *sqs*. Na základě těchto markerů byla spíše nalezena shoda na úrovni podskupin vymezených v rámci dvou základních linií. V případě cpDNA tvořily některé haploskupiny charakteristické pro západní taxony monofyletické skupiny s haploskupinami identifikovanými u východních taxonů. Na základě analýzy *sqs* bylo v rámci *Hieracium* s. str. vymezeno 14 monofyletických skupin, ale vztahy mezi nimi zůstaly neobjasněné. U více než poloviny analyzovaných jedinců byly izolovány alely, patřící do různých monofyletických skupin. Částečně byly polyfyletické i rostliny u kterých nebyl na základě analýzy ETS identifikován hybridní původ. Tyto výsledky mohou být vysvětleny další hybridizací a nebo populačně genetickými procesy (incomplete lineage sorting), na základě dostupných dat však není možné žádnou z těchto hypotéz potvrdit ani vyvrátit. Na druhé straně několik jedinců s prokázaným hybridním původem bylo monofyletických a lze předpokládat že u nich došlo k eliminaci druhé rodičovské alely v důsledku genetického driftu a nebo selekce. Několik monofyletických skupin obsahovalo výlučně alely pocházející z rostlin hybridního původu. Z velké části tyto alely pocházejí ze stejných rostlin u kterých byly nalezeny i neznámé ribotypy. Obdobně byly u některých polyploidů a nebo hybridů objeveny jedinečné chloroplastové haplotypy.

## Závěry

Nízká variabilita u ETS a neobjasněné fylogenetické vztahy mezi terminálními skupinami u *sqs* a chloroplastové DNA naznačují, že *Hieracium* s. str. je relativně mladá skupina s recentní speciací. Rozsáhlá hybridizace byla pro tuto skupinu předpokládána hlavně na základě existence přechodných druhů. V této práci byly analyzovány pouze základní druhy jejichž morfologie nenaznačovala hybridní původ. Podle výchozích předpokladů bylo možné očekávat hybridní původ u některých polyploidů. Výsledky této práce výrazně přesahují tyto očekávání. Překvapivý je hlavně fakt, že hybridní původ byl odhalen i v případě diploidních taxonů. Na základě těchto výsledků lze považovat mezidruhovou hybridizaci za hlavní způsob speciace podrodu *Hieracium* s. str.

U některých rostlin u kterých byl potvrzen hybridní původ byl identifikován unikátní genetický materiál. S nejvyšší pravděpodobností se jedná o sekvenční již vyhynulých taxonů reprezentujících rodičovské linie těchto hybridů. Tato zjištění naznačují, že diverzita v rámci podrodu *Hieracium* s. str. byla v minulosti ještě větší než jakou nacházíme v současnosti. Z tohoto hlediska mohou taxony, které jsou považovány za základní evoluční linie podrodu představovat jenom další z přechodných forem.

## References

- Bergman B. (1941): Studies on the embryo sac mother cell and its development in *Hieracium* subgen *Archihieracium*. – Svensk Botanisk Tidskrift 35: 1–42.
- Blattner F.R. (1999): Direct amplification of the entire ITS region from poorly

- preserved plant material using recombinant PCR. – *Biotechniques* 27: 1180–1186.
- Bräutigam S. & Bräutigam E. (1996): Determination of the ploidy level in the genus *Hieracium* subgenus *Pilosella* (Hill) S.F. Gray by flow cytometric DNA analysis. – *Folia Geobotanica* 31: 315–321.
- Bräutigam S. & Schuhwerk F. (2002): *Hieracium* L. – In: Jäger E. J. & Werner K. (eds.), *Rothmaler, Exkursionsflora von Deutschland 4. Gefäßpflanzen, Kritischer Band*, 9. Auflage, p. 709–734, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg & Berlin.
- Bräutigam S. & Greuter W. (2007): A new treatment of *Pilosella* for the Euro-Mediterranean flora [Notulae ad floram euro-mediterraneam pertinentes No. 24]. – *Willdenowia* 37: 123–137.
- Bremer K. (1994): *Asteraceae: Cladistics and classification*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Castro M., Mateo G. & Rosseló J.A. (2007): Chromosome numbers in *Hieracium* and *Pilosella* species (Asteraceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. – *Botanical Journal of Linnean Society* 153: 311–320.
- Chrtek J. jun. (1996): Chromosome numbers in selected *Hieracium* species (Compositae) in the Sudeten Mts and West and Ukrainian East Carpathians. – *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 41(2): 783–790.
- Chrtek J. jun (2002): *Hieracium* L. – In: Kubát K. (ed.), *Klíč ke květeně České republiky*, p. 706–732, Academia, Praha.
- Chrtek J. jun (2004): *Hieracium* L. – In: Štěpánek J. & Štěpánková J. (eds.), *Květena České republiky* 7, p. 540–701, Academia, Praha.
- 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 grofae* – a rediscovered diploid hybrid from the Ukrainian Carpathians. – *Biologia*, Bratislava, 61(4): 365–373.
- Chrtek J., Mráz P., Zahradníček J., Mateo G. & Szelağ Z. (2007): Chromosome

- numbers and ploidy levels of selected species of *Hieracium* s. str. (Asteraceae). – *Folia Geobotanica* 42: 411–430.
- Elfstrand M. (1893): *Hieracia* alpina aus den Hochgebirgsgegenden des Mittleren Skandinaviens. – Uppsala.
- Fehrer J., Gemeinholzer B., Chrtek J. & Brautigam S. (2007): Incongruent plastid and nuclear DNA phylogenies reveal ancient intergeneric hybridization in *Pilosella* hawkweeds (*Hieracium*, Cichorieae, Asteraceae). – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 347–361.
- Gaskin J.F. & Wilson L.M. (2007): Phylogenetic relationships among native and naturalized *Hieracium* (Asteraceae) in Canada and United States based on plastid DNA sequences. – *Systematic Botany* 32: 478–485.
- Gustafsson Å. (1947): Apomixis in higher plants II. The causal aspect of apomixis. *Acta University Lund N. F. Adv.* 43: 69–179.
- Juxip A.J. (1960): Jastrebinka – *Hieracium* L. – In: Šiškin B.K. & Bobrov E.G. (eds), *Flora SSSR* 30: 1–698, Nauka, Moskva et Leningrad.
- Merxmüller H. (1975): Diploide Hieracien. – *Anales del Instituto Botánico A. J. Cavanilles* 32: 189–196.
- Mráz P. (2003): Mentor effects in the genus *Hieracium* s. str. (Compositae, Lactuceae). – *Folia Geobotanica* 38: 345–350.
- Mráz P. & Tomčíková D. (2004): Experimental hybridization in the genus *Hieracium* s. str. – crosses between diploid *H. umbellatum* and triploid *H. sabaudum*. – *Thaiszia – Journal of Botany* 14, Suppl. 1: 15–16.
- 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.
- Norrin J.P. (1912): *Nya nordiska Hieracia, II*. – *Acta Societas Pro Fauna Et Flora Fennica* 36(4): 1–127.
- Norrin J.P. (1888): *Bidrag till Hieracium-floran i Skandinaviska halföns mellersta delar*. – *Acta Societas Pro Fauna Et Flora Fennica* 3(4): 1–117.
- Noyes R.D. (2006): Intraspecific nuclear ribosomal DNA divergence and reticulation in sexual diploid *Erigeron strigosus* (Asteraceae). – *American Journal of Botany* 93: 470–479.
- Noyes R.D. (2007): Apomixis in the Asteraceae: diamonds in the rough. – *Functional Plant Science and Biotechnology* 1:207–222.
- Pugsley H.W. (1948): *A prodromus of the British Hieracia*. – *Journal of Linnaean Society (Botany)* 54: 1–356.
- 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 Entstehungverdoppelter Chromosomenzahlen – *Hereditas* 8: 305–338.
- Schuhwerk F. & Lippert W. (1998): Chromosomenzahlen von *Hieracium* (Compositae, Lactuceae) Teil 2. – *Sendtnera* 5: 269–286.
- Schuhwerk F. (1996): Published chromosome counts in *Hieracium*. <http://www.botanik.biologie.uni-muenchen.de/botsamml/projects/chrzlit.html>.
- Sell P.D. & West C. (1976): *Hieracium* L. – In: Tutin T.G. et al. (eds), *Flora Europaea* 4: 358–410, Cambridge University Press, Cambridge.
- Sell P.D. (1987): An introduction to the study of the British *Hieracia*, 1. History and classification. – *Watsonia* 16: 365–371.
- Sell P.D. & Murrell G. (2006): *Flora of Great Britain and Ireland: Campanulaceae-Asteraceae*. – Cambridge University Press, Cambridge.
- Sennikov A.N. & Illarionova I.D. (2002): *Carpological studies in Asteraceae* –

- Cichorieae, 1. subtribe Hieraciinae. – Komarovia 2: 97–125.
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W.S., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E. & Small R.L. (2005): The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. – *American Journal of Botany* 92: 142–166.
- 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.
- Shlyakov R.N. (1989): Jastrebinka – *Hieracium* L. – In: Tzvelev N.N. (ed), *Flora evropejskoj časti SSSR* 8: 140–300, Nauka, Leningrad.
- Stamatakis A. (2006): RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. – *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- 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.
- Swofford D.L. (2002): PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. – Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P., Rosenbaumová R., Peckert T. & Krahulec F. (2007): Genome size variation and species relationships in *Hieracium* subgen. *Pilosella* (Asteraceae) as inferred by flow cytometry. – *Annals of Botany* 100: 1323–1335.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. & Bouvet J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. – *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Tennant D. & Rich T. (2008): *British alpine hawkweeds*. – Botanical Society of the British Isles, London.
- Trávníček P., Dočkalová Z., Rosenbaumová R., Kubátová B., Szelağ Z. & Chrtek J. (2011): Bridging global and microregional scales: ploidy distribution in *Pilosella echioides* (Asteraceae) in central Europe. – *Annals of Botany* 107: 443–454.



- Tyler T. (2011): *Hieracium* sect. *Oreadea* (Asteraceae) in Sweden – from a complete mess to a preliminary taxonomic classification. – *Nordic Journal of Botany* 29(5): 538–589.
- Willis J.C. (1973): *A dictionary of flowering plants and ferns*, ed. 8. – Cambridge University Press, Cambridge.
- 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.
- Zahn K. H. (1922 – 1930): *Hieracium* L. – In: Ascherson P. & Graebner. (eds.), *Synopsis der Mitteleuropäischen Flora* 12(1): 1-492, Bornträger, Leipzig.
- Zahradníček J. (2008): *Velikost genomu a evoluční trendy rodu Hieracium L.* – Ms. Thesis (Dipl. práce, depon. in: Knihovna katedry botaniky PřF UK, Praha).

# Professional Curriculum Vitae

## Personal data

Karol Krak  
25.2.1981, Rožňava, Slovakia

## Education

since 2004                      Ph.D. study in Botany, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague

1999–2004                      MSc. study in Botany and Plant Physiology, Faculty of Science, P. J. Šafárik University, Košice, Slovakia

## Employment

since 3/2009                      Researcher, Department of Genetic ecology, Institute of Botany ASCR, Průhonice, Czech Republic

7/2008 – 2/2009                      Assistant for forensic DNA analyses, Forensic DNA Service s. r. o., Prague, Czech Republic

10/2004 – 9/2008                      PhD. student, Department of Taxonomy, Institute of Botany ASCR, Průhonice, Czech Republic

## Research interest

- Molecular marker development (qPCR assays, SSR markers, low-copy genes)
- Polyploid and hybrid speciation
- Quantitative dynamics of AM fungal communities

## SCI Publications

**Krak K**, Janoušková M, Caklová P., Vosátka M., Štorchová H. (2012): Intraradical dynamics of two coexisting isolates of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intradices* sensu lato as estimated by real-time PCR in mitochondrial DNA. *Appl Environ Microb* 78: 3630–3637.

**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 perspective for other tribes. *Am J Bot* e74–e77.

Chrtek J, Zahradníček J, **Krak K**, Fehrer J (2009): Genome size in *Hieracium* subgenus *Hieracium* (Asteraceae) is strongly correlated with major phylogenetic groups. *Ann Bot* 104: 161–178.

Fehrer J, **Krak K**, Chrtek J (2009): Intra-individual polymorphism in diploid and apomictic polyploid hawkweeds (*Hieracium*, Lactuceae, Asteraceae): disentangling phylogenetic signal, reticulation, and noise. *BMC Evol Biol* 9: 239.

**Krak K**, Mráz P (2009): Trichomes in the tribe Lactuceae (Asteraceae) - taxonomic implications. *Biologia* 63: 616–630.

## Non-SCI Publications

**Krak K** (2011): Využití sekvencí DNA při studiu evoluce rostlin. *Zprávy České Botanické Společnosti, Praha* 46, Mater. 25: 95–125.

## Conference reports

**Krak K**, Chrtek J, Caklová P, Fehrer J. (2012): Reconstruction of phylogenetic relationships in a highly reticulate group with deep coalescence and recent speciation (*Hieracium*, Asteraceae). International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity, 7–10 May 2012, Pruhonice, Czech Republic (oral presentation).

Khodlová Z, Trávníček P, **Krak K**, Krejčíková J (2012): Polyploid Speciation in *Anthoxanthum*: Far beyond a Simple Solution. International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity, 7–10 May 2012, Pruhonice, Czech Republic (poster).

Šmerda J, **Krak K**, Fehrer J, Bureš P, Zedek F, Zahradníček J, Chrtek J (2012): TY3-gypsy Copy Number is Correlated with Genome Size in the Subtribe Hieraciinae (Lactuceae, Asteraceae). International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity, 7–10 May 2012, Pruhonice, Czech Republic (poster).

Mandák B, Trávníček P, Paštová L, **Krak K** (2012): Is hybridization involved in the evolution of the *Chenopodium album* aggregate? Molecular Ecology, 4–7 February 2012, Vienna, Austria (poster).

Douda J, Doudová J, Drašnarová A, Hadincová V, Jahodová Š, **Krak K**, Zákravský P, Mandák B (2012): Analysis of DNA variation and fossil records in *Alnus glutinosa* and *A. incana*: changes in distribution ranges over time. Molecular Ecology, 4–7 February 2012, Vienna, Austria (poster).

Janoušková M, **Krak K**, Štorchová H, Caklová P, Vosátka M (2011): Discrimination and quantification of two *Glomus intraradices* isolates in plant roots by Real-Time PCR assays in mitochondrial DNA. Ecology of Soil Microorganisms. Microbes as Important Drivers of soil processes, 27 April – 1 May 2011, Prague, Czech Republic (poster)

Fehrer J, **Krak K**, Chrtek J (2011): When low copy nuclear genes are unable to produce species trees despite large genetic variation: Lessons from a highly reticulate plant group (*Hieracium*). XVIII International Botanical Congress, 23–30 July 2011, Melbourne, Australia (oral presentation J. Fehrer).

Paštová L, **Krak K**, Mandák B (2011): Evolution of the *Chenopodium album* group. XVIII International Botanical Congress, 23–30 July 2011, Melbourne, Australia (poster).

Dvořáková K, Urfus T, **Krak K**, Vít P (2010): Hybridization and microevolutionary relationships among Central European *Diphysastrum* species. 19th International Symposium Biodiversity and Evolutionary Biology of the German Botanical Society (DBG), 16–19 September 2010, Vienna, Austria (poster).

Janoušková M, **Krak K**, Štorchová H, Caklová P, Müller K, Vosátka M (2010): Application of Real-Time PCR to studying dynamics of AM fungal communities after inoculation. Sixth National Symposium and Third Iberoamerican Meeting on Mycorrhizal Symbiosis, 6–10 September 2010, Tlaxcala, Mexico (poster).

**Krak K**, Fehrer J, Caklová P, Chrtek J (2010): Three new low-copy nuclear markers for low level systematic studies in the Asteraceae – development and preliminary results of the phylogenetic analysis of *Hieracium* subgen. *Hieracium* and *Hieracium* subgen. *Chionoracium*. 11th International Hieracium workshop, 27–29 January 2010, Pruhonice, Czech Republic (oral presentation).

Fehrer J, **Krak K**, Chrtek J (2009): Extensive ancient hybridization in sexual and apomictic hawkweeds (*Hieracium*, Asteraceae) and evidence for extinct diversity. International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity, 17–21 May 2009, San Malo, France (oral presentation J. Fehrer)

**Krak K**, Fehrer J, Chrtek J (2008): Reticulation, speciation, and patterns of molecular evolution in *Hieracium* (Asteraceae). Systematics 2008, Goettingen Germany

## Grant projects

### **Project leader**

2006 Development of novel low-copy markers for asteraceae (EU SYNTHESYS ES-TAF-1365)

### **Researcher**

2010-2013 Phylogeny of subtribe Hieraciinae (Asteraceae) - a model example of contrasting evolutionary strategies in closely related lineages (GA CR GAP506/10/1363, project leader J. Chrtek)

2009-2012 Coexistence of native and inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in the roots of host plants (GA CR GA526/09/0838, project leader M. Vosátka)

2011-2014 Postglacial colonization of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana*: analysis of DNA variation and fossil records (GA CR P504/11/0402, project leader B. Mandák)

2009-2012 The role of hybridization in plant evolution – In situ hybridization technique (GA CR GA206/09/1126, project leader B. Mandák)

2005-2007 Molecular phylogeny and evolutionary trends in *Hieracium* (Asteraceae, Lactuceae) (GA CR GA206/05/0657, project leader J. Chrtek)