

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Zuzana Khodlová

Polyploidní speciace u rodu *Anthoxanthum* v Evropě

Polyploid speciation of the genus *Anthoxanthum* in Europe

Diplomová práce

Školitel: Mgr., Ing. Pavel Trávníček

Praha, 2011



Prohlášení:

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

V Praze dne 29. srpna 2011

Zuzana Khodlová

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala mému školiteli Pavlu Trávníčkovi za nadlidské úsilí při vzniku této práce. Bez jeho cenných rad a připomínek, trpělivosti a spousty času, který mi obětoval, by zřejmě nikdy nevznikla.

Veliké díky patří též Karolu Krakovi, nejen za uvedení do tajů fylogenetických analýz.

Janče Krejčíkové, Hance Chudáčkové, Petru Vítovi, Tomovi Urfusovi, Jardovi Zahradníčkovi, Filipu Kolářovi, Fredu Rooksovi, Páje Růžičkové, Jindrovi Chrtkovi, Aniče a Frantovi Krahulcovým, Rádě a Honzovi Sudovým, Zuzce Dočkalové, Milanu Štechovi a Manuelovi Pimentelovi děkuji za množství rostlinného materiálu, na kterém je celá práce založená. Děkuji i dalším, jejichž sběry do práce zahrnuté nebyly, ale oni si na nás v terénu vzpomněli a tomky přivezli či poslali.

Dále moc a moc děkuji Verče Kučabové, Elišce Záveské, Evče Rejzkové, Lence Flaškové, Soně Píšové a Gábině Fuxové za pomoc v DNA laborce, ať už přímo s prací, tak se zabavováním dítká.

Honzovi Prančlovi děkuji za to, že vždycky našel společnou řeč, či dokonce píseň, jež nás provázela studiem botaniky, nebo alespoň pobytem na katedře, a hlavně za to, že pořád věřil, že se naučím poznávat rostliny jinak, než pomocí sekvencí DNA.

Hance Chudáčkové děkuji ještě jednou, a to za její znalost angličtiny, stejně jako mému bratrovi. Z rodiny patří dík i všem babičkám, prababičkám a dědečkům, kteří venčili naše mládě v době bádání i psaní. Tomovi děkuji, že neztratil trpělivost za celou dobu, co jsem se věnovala víc diplomové práci, než jemu, a za pomoc zejména při závěrečných formátovacích úpravách. A hlavně děkuji Kubíčkovi, že nás udržoval neustále v realitě, ať už smíchem, tak pláčem, vyndáváním kláves z počítače, prepisováním textu diplomových prací či strkáním chleba do tiskárny.

Ostatním členům rodiny a kamarádům děkuji za podporu a důvěru, že to „dotáhneme do konce“.

Práce byla financována z prostředků GAUK 145/2006 a GAUK 9661/2009.

Abstrakt

Z celkového počtu patnácti druhů rodu *Anthoxanthum* (Poaceae) se na území Evropy odlišuje 8 taxonů. Pět z nich je vytrvalých a tvoří komplex *A. odoratum* s. l., tři jsou jednoleté, víceméně mediteránní taxony (*A. aristatum*, *A. ovatum* a *A. gracile*). V rámci komplexu *A. odoratum* s. l. jsou vylišovány tyto taxony: široce rozšířené *A. odoratum* s. str. ($4x$; $2n = 20$), arкто-alpinské *A. alpinum* ($2x$ a $4x$; $2n = 10$ a 20), endemit Madeiry *A. maderense* ($2x$; $2n = 10$), endemit balkánských hor *A. pauciflorum* ($2x$; $2n = 10$) a endemit Pyrenejského poloostrova *A. amarum* ($?x$; $2n \sim 90$). Předmětem této studie je objasnění dosud neznámých vzájemných evolučních vztahů mezi taxony, mezi jednoletými a vytrvalými zástupci a mezi diploidy a polyploidy.

Konkrétními otázkami jsou: 1) Jaký je původ a rozšíření znovuobjeveného diploidního vytrvalého taxonu a jaká je jeho vazba k ostatním zástupcům skupiny; 2) Jaké distribuční *pattern* zaujímají vytrvalí zástupci rodu *Anthoxanthum* v Evropě a jaká je jejich haplotypová diferenciace (celkové rozšíření taxonů a haplotypů a existence jejich sympatrického výskytu); 3) Jaké jsou evoluční vazby mezi jednotlivými zástupci rodu v Evropě a jakým způsobem vznikl allotetraploidní druh *A. odoratum* s. str.

Stanovení ploidních úrovní a velikostí genomu studovaných taxonů bylo prováděno pomocí průtokové cytometrie. K odhalení evolučních vztahů mezi taxony a jejich haplotypové diferenciace bylo použito sekvenování nekódujících úseků chloroplastové (*trnL-trnF*, *rpl32-trnL*) a jaderné (single-copy gen GBSSI) DNA.

Průtoková cytometrie odhalila druhově specifickou velikost genomu u většiny evropských taxonů, což umožňuje jejich nezávislé a objektivní určení. Navíc byl pomocí průtokové cytometrie objeven v literárních pramenech zmiňovaný, ale dosud pravděpodobně platně nepopsaný, diploidní mediteránní taxon, který by mohl být jedním z rodičovských druhů allotetraploidního druhu *A. odoratum* s. str. Jeho blízký vztah k ostatním diploidním druhům Mediteránu (jednoletým i vytrvalým) nicméně nedovoluje určit pravý původ genetické diverzity *A. odoratum* s. str. Druhým rodičovským taxonem je s největší pravděpodobností diploidní *A. alpinum* nebo jeho přímý předek. Tento poznatek je dobře doložen i molekulárními daty jak z chloroplastové, tak jaderné DNA. Analýzou genu GBSSI byla zjištěna velká míra diferenciace ve složení genomu jednotlivých jedinců téhož taxonu (zejména allotetraploidního *A. odoratum*), což nasvědčuje mnohonásobnému a polytopnímu vzniku.

Klíčová slova: *Anthoxanthum*, polyploidizace, velikost genomu, cytogeografie, GBSSI, chloroplastová DNA

Abstract

Eight of fifteen species in genus *Anthoxanthum* (Poaceae) can be found in Europe. Five of them are perennials forming *A. odoratum* complex, the remaining three are annual, more or less mediterranean taxa (*A. aristatum*, *A. ovatum* and *A. gracile*). Within the *A. odoratum* s. l. complex the following taxa are distinguished: widely spread *A. odoratum* s. str. ($4x$; $2n = 20$), arcto-alpine *A. alpinum* ($2x$ a $4x$; $2n = 10$ and 20), Madeiran endemic species *A. maderense* ($2x$; $2n = 10$), endemic species of Balkan mountains *A. pauciflorum* ($2x$; $2n = 10$) and the Iberian peninsula endemic *A. amarum* ($?x$; $2n \sim 90$). The aim of this thesis is to clarify the unknown evolutionary relationships between the taxa, between the annuals and perennials, diploids and polyploids.

The following questions should be answered in this study: 1) What is the origin and distribution of the rediscovered diploid perennial taxon and what is its relationship to the other members of the group; 2) What is the distribution pattern of the perennial taxa of the genus *Anthoxanthum* in Europe and what is their haplotype differentiation (overall distribution of the taxa and haplotypes and the existence of their sympatric occurrence); 3) What evolutionary ties exist among the species and what is the origin of allotetraploid taxon *A. odoratum* s.str.

The assessment of ploidy levels and absolute genome sizes of the studied taxa was carried out using flow cytometry. To reveal evolutionary ties among the taxa and their haplotype differentiation a sequencing of non-coding segments of chloroplast (*trnL-trnF*, *rpl32-trnL*) and nuclear (single-copy gen GBSSI) DNA was used.

Flow cytometry revealed species-specific genome size in most of the European taxa, which enables their independent and objective determination. Moreover, using flow cytometry, a known (mentioned in literature), but probably not validly described diploid mediterranean taxon was found, a possible parental species of the allotetraploid *A. odoratum* s. str. But its close relationship to other mediterranean diploid taxa (both perennial and annual) doesn't allow to distinguish real source of genetic diversity of *A. odoratum*. On the other hand, the second parent is more clear and most probably is composed of *A. alpinum* or its direct ancestor. This hypothesis is supported by molecular data from both chloroplast and nuclear DNA. Analysis of the gene GBSSI revealed high rate of differentiation in genome structure of individual plants of one taxon (especially in the case of *A. odoratum*), which supports the hypothesis of multiple and polytopic origin.

Keywords: *Anthoxanthum*, polyploidization, genome size, cytogeography, cpDNA, GBSSI

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární rešerše	4
2.1. Rod <i>Anthoxanthum</i>	4
2.1.1. Rozšíření 4 cytotypů <i>Anthoxanthum odoratum</i>	4
2.1.2. Polyploidizace u druhu <i>Anthoxanthum odoratum</i> L. s. lat.	5
2.1.3. Použití molekulárních markerů v rodě <i>Anthoxanthum</i>	6
2.2. Metody použité v diplomové práci	7
2.2.1. Průtoková cytometrie	7
2.2.2. Molekulární analýzy	9
2.2.2.1. Sekvenování chloroplastové DNA (<i>cpDNA</i>)	9
2.2.2.2. Sekvenování GBSSI – Granule-Bound Starch Synthase I (Waxy)	11
3. Materiál a metody	12
3.1. Rostlinný materiál	12
3.2. Stanovení velikosti genomu	20
3.2.1. Průtoková cytometrie	20
3.2.2. Statistické zpracování dat	20
3.3. Molekulární metody	21
3.3.1. Izolace DNA a PCR reakce	21
3.3.2. Klonování a sekvenování DNA	23
3.3.3. Analýza dat	23
3.3.3.1. Analýza sekvencí DNA a tvorba alignmentů	23
3.3.3.2. Fylogenetické analýzy	24
4. Výsledky	26
4.1. Velikost genomu	26
4.1.1. Autopolyploidní vznik <i>A. alpinum</i> 4x a allopolyploidní vznik <i>A. odoratum</i>	27
4.1.2. Variabilita velikosti genomu	28
4.1.3. Korelace velikosti genomu s geografickou polohou	29
4.2. Molekulární analýzy	30
5. Diskuze	41
6. Závěr	48
7. Použitá literatura	50
8. Přílohy	Chyba! Záložka není definována.

1. Úvod

Polyploidizace, proces zvyšující počet kompletních chromozómových sádek v jádře buňky, je v současnosti mnohými autory uznávána jako jeden z klíčových adaptačních a speciálních mechanismů evoluce rostlin (Ramsey & Schemske 1998, Wendel 2000; Soltis *et al.* 2003, Wood *et al.* 2009).

Soltis (2008) si myslí, že v dnešní době není otázkou, jaké je zastoupení polyploidů u krytosemenných rostlin, ale kolika polyploidizačními událostmi je daná evoluční linie charakterizována. Tvrdí, že alespoň jedním kolem genomové duplikace prošly v minulosti všechny krytosemenné rostliny. Bez důkazů o paleopolyploidizaci je zatím jen jejich sesterská skupina s posledním žijícím zástupcem - rodem *Amborella* (Soltis *et al.* 2009).

Rod *Anthoxanthum* L. (Poaceae: Pooideae: Aveneae) se pro zkoumání polyploidní speciace jeví jako velmi zajímavý. Zahrnuje v sobě ancestrální diploidní typy i odvozené typy polyploidní (tab. 1), které vznikly pravděpodobně odlišnými polyploidizačními událostmi (Hedberg 1986).

Z celkem asi patnácti druhů rodu *Anthoxanthum* (tomka) se na území Evropy odlišuje osm taxonů. Pět z nich je vytrvalých a tvoří komplex *A. odoratum* s. lat., tři jsou jednoleté, víceméně mediteránní taxony (*A. aristatum* BOIS., *A. ovatum* LAG., *A. gracile* BIV.).

V rámci komplexu *A. odoratum* s. lat. jsou rozlišovány tyto taxony: široce rozšířené *A. odoratum* L. s. str. (4x; 2n = 20), arкто-alpinské *A. alpinum* Á. LÖVE & D. LÖVE (2x a 4x; 2n = 10 a 20), endemit Madeiry *A. maderense* TEPPNER (2x; 2n = 10), endemit balkánských hor *A. pauciflorum* ADAMOVIC (2x; 2n = 10) a endemit Pyrenejského poloostrova *A. amarum* BROT. (?x; 2n ~ 90).

U druhu *A. alpinum* je otázka původu tetraploidů uspokojivě dokázána. Jak studium karyologie (Teppner 1970, Hedberg 1970 a 1986), tak enzymatických systémů (Zeroual-Humbert-Droz & Felber 1999) potvrzuje autopolyploidní původ tetraploidních rostlin.

Na vznik tetraploidů druhu *A. odoratum* existuje několik názorů, které způsobují rozpory v postavení tohoto taxonu i v dnešní době (Pimentel & Sahuquillo 2008). Felber (1986) přišel s názorem autopolyploidního vzniku z hypotetického jihoevropského ancestrálního taxonu. Allopolyploidní původ hybridizací mezi *A. alpinum* a jiným diploidním taxonem z jižní Evropy udává Teppner (1970) a Hedberg (1986, 1990). I my jsme se na základě průběžných výsledků přiklonili k této hypotéze (Khodlová 2008).

Postupný průzkum evropského terénu a následná analýza sebraných vzorků rodu *Anthoxanthum* ukázal rozmístění několika odlišných haplotypů (Khodlová 2008). Objevily se tak další dva okruhy otázek, které jsou předmětem mé diplomové práce:

- 1) Jaký je distribuční *pattern* vytrvalých zástupců rodu *Anthoxanthum* v Evropě a jaká je jejich haplotypová diferenciace?
 - Jaké je rozšíření vytrvalých druhů rodu *Anthoxanthum* a jejich haplotypů v Evropě?
 - Vyskytují se diploidní druhy v sympatrii? Jak často se vyskytují smíšené populace (různé ploidie) a populace se smíšenými haplotypy?
 - Sdílejí vytrvalé druhy haplotypy s druhy jednoletými, nebo jde o zcela oddělené haplotypové linie?

- 2) Polyploidní původ a fylogeneze evropských druhů rodu *Anthoxanthum*.
 - Jaký je původ všech zahrnutých polyploidů?
 - Kolikrát v průběhu evoluce došlo k polyploidizačním událostem?
 - Můžeme v současné době najít původní rodičovské diploidní taxony? Mohou být jednoleté druhy vyloučeny z polyploidizačních událostí?
 - Jaký je vztah mezi všemi evropskými taxony?
 - Je možné pokládat vytrvalé a jednoleté druhy za zcela oddělené vývojové větve?

Pro řešení výše uvedených otázek byly použity v současné době hojně využívané metody rostlinné biologie – průtoková cytometrie, sekvenování nekódujících úseků chloroplastové DNA a sekvenování genu pro syntetázu katalyzující tvorbu malto-oligosacharidu v škrobových zrnech (GBSSI – Granule-bound starch synthase I gene) jaderné DNA.

Tabulka 1. Rozšíření, stanoviště, životní cyklus, plošná úroveň a synonyma evropských druhů rodu *Anthoxanthum*. Převzato a upraveno z Pimentel *et al.* (2007a).

Taxon	Rozšíření	Stanoviště	Životní cyklus	Synonyma	2n	Literární zdroje
<i>A. odoratum</i> L. (1753)	Celá Evropa	Široké rozmezí	Výtrvalý		20	Katterman 1931 Parthasarathy 1939 Hedberg 1970
<i>A. alpinum</i> Löve & Löve (1948)	S Eurasie, vysoké hory C a V Evropy	Arktiko-alpínské louky	Výtrvalý	<i>A. odoratum</i> var. <i>alpinum</i> Gray 1821 <i>A. odoratum</i> var. <i>montanum</i> Panc. 1856 <i>A. odoratum</i> subsp. <i>alpinum</i> (A. & D. Löve) Hultén 1958 <i>A. odoratum</i> fo. <i>montanum</i> (Asch. & Graebn) A. Nyár 1972 <i>A. odoratum</i> subsp. <i>nipponicum</i> (Honda) Tzelev 1967	10	Oestergren 1942 Knaben 1950 Tutin 1950 Rozmus 1958 Böcher 1961
<i>A. amarum</i> Brot. (1800)	SZ Pyrenejského poloostrova	Vlhká a stinná místa	Výtrvalý	<i>A. odoratum</i> var. <i>amarum</i> (Brot.) Trin. 1826 <i>A. odoratum</i> m var. <i>majus</i> Hack. 1880 <i>A. odoratum</i> var. <i>majus</i> Lange 1886 <i>A. odoratum</i> var. <i>majus</i> Hack. Ex Paunero 1953	80 86 88 90	Oestergren 1942 Femandes & Queiros 1969 Teppner 2002
<i>A. maderense</i> Teppner (1998)	Madeira	Skalni útesy ve vnitrozemí	Výtrvalý		10	Teppner 1998
<i>A. gracile</i> Bivona (1813)	Ostrov Středozemního moře a S Afriky	Suchá a otevřená stanoviště	Jednoletý		10	De Leonardis <i>et al.</i> 1981
<i>A. aristatum</i> Boiss. (1842)	Středomořské pobřeží, atlantská zóna J Evropy a S Afriky	Suchá a otevřená stanoviště	Jednoletý	<i>A. odoratum</i> var. <i>aristatum</i> (Boiss.) Coss. & Durieu 1854 <i>A. odoratum</i> var. <i>laxiflorum</i> Chaub. <i>A. odoratum</i> var. <i>puellii</i> (Lecoq & Lamotte) Coss. & Durieu 1854 <i>A. odoratum</i> subsp. <i>aristatum</i> Trabut in Batt. & Trabut <i>A. odoratum</i> subsp. <i>aristatum</i> (Boiss.) Litard., 1937 <i>A. odoratum</i> subsp. <i>aristatum</i> (Boiss.) Lerez Lara, 1937	10	Oestergren 1942 Jones 1964 Borrill 1963 Valdés 1973
<i>A. ovatum</i> Lag. (1816)	J Pyrenejského poloostrova, Maroko, Alžírsko	Suchá a otevřená stanoviště	Jednoletý	<i>A. odoratum</i> subsp. <i>ovatum</i> (Lag.) Trabut <i>A. odoratum</i> var. <i>ovatum</i> (Lag.) Cosson & Dur 1854 <i>A. odoratum</i> var. <i>eu-ovatum</i> Maire et Weiller <i>A. odoratum</i> var. <i>eu-ovatum</i> subvar. <i>ciliatum</i> (Emb.) Emb. Et Maire 1841 <i>A. odoratum</i> var. <i>exertum</i> subvar. <i>villiglume</i> Maire et Weiller <i>A. odoratum</i> var. <i>exertum</i> subvar. <i>marmorae</i> (Lindberg) Maire <i>A. odoratum</i> subsp. <i>ovatum</i> var. <i>exertum</i> (Lindberg) Emb. & Maire 1941 <i>A. odoratum</i> subvar. <i>scabrum</i> (Emb.) Emb. & Maire 1941	10	Oestergren 1942 Böcher 1961 Valdés 1973
<i>A. pauciflorum</i> Adamovic (1904)	J Jugoslávie	?	Výtrvalý		?	?

2. Literární rešerše

2.1. Rod *Anthoxanthum*

Podrobnými morfologickými a karyologickými znaky rodu *Anthoxanthum* jsem se zabývala ve své bakalářské práci (Khodlová 2008). Tyto poznatky nejsou pro diplomovou práci stěžejní, nebudu je zde proto zmiňovat.

Rozšíření, stanoviště, životní cyklus, ploidní úroveň a synonyma osmi evropských druhů rodu *Anthoxanthum* jsou popsány v tabulce 1. Nejsou zde ovšem uvedeny všechny cytotypy patřící do komplexu *Anthoxanthum odoratum* s. l. Tradičně byl rozlišován na tetraploidní druh *A. odoratum* L. ($2n = 20$) a diploidní *A. alpinum* LÖVE & LÖVE. Upřednostnění morfologických znaků (přítomnost háčkovitých chlupů na pluchách fertálních květů u *A. alpinum*; Mayová 1982, Bogenrieder & von Stietencron 1985) nad znaky karyologickými vedlo k závěrům, že oba druhy představují komplexy diploidních i tetraploidních rostlin. Ve švýcarském předalpi byly nalezeny tetraploidní rostliny s háčkovitými chlupy přiřazeny k *A. alpinum* (Felber 1986), v jižní Evropě naopak diploidní rostliny bez háčkovitých chlupů přiřazeny k *A. odoratum* (Hedberg 1986, Felber 1987).

2.1.1. Rozšíření 4 cytotypů *Anthoxanthum odoratum*

Pro úplnost údajů uvádím podrobnější rozšíření všech čtyř cytotypů *A. odoratum*:

Anthoxanthum alpinum LÖVE & LÖVE ($2n = 10$) se vyskytuje v oblasti hlavních eurasijských masivů od Japonska po Alpy. Je přítomný též ve Skandinávii, na Islandu a v Grónsku. Felber (1993) uvádí poprvé jeho přítomnost na Korsice. Chybí na Sicílii, Krétě a v severní Africe, přestože se vyskytuje ve stejné zeměpisné šířce či o něco severněji v Apeninách, na Balkáně a v Turecku. Jako glaciální relikvium přetrval na rakouských hadcích (Melzer 1986). Seznam podrobnější literatury s výskytem tohoto cytotypu má ve své dizertační práci F. Felber (1987), převzatý je též v mé bakalářské práci (Khodlová 2008).

Mediterránní diploid ($2n = 10$) byl zřejmě poprvé pozorován Jonesem (1964), který se o něm zmiňuje jako o „nepojmenovaném druhu z Kréty“. Dále je tento cytotyp uváděn ze Sicílie (Böcher 1961), Itálie (Teppner 1970), bývalé Jugoslávie (Teppner 1970), Řecka (Hedberg 1986), Bulharska (Pundeva 1974), jihu Francie (Felber 1988a) a Korsiky

(např. de Litardière 1949, Felber 1993). Autoři ho pojmenovávají jako diploidní formu *A. odoratum*.

Anthoxanthum odoratum L. ($2n = 20$) je široce rozšířeno po celé Evropě, chybí pouze ve vyšších horských polohách, kde ho nahrazuje *A. alpinum* (Hedberg 1967, 1969, 1970a, 1986, 1990, Rozmus 1958). Seznam studií s rozšířením z jednotlivých států ve Felber (1987) či Khodlová (2008). Přestože nejde s určitostí říci, že typový materiál, který měl Linné k dispozici při popisování druhu (Linné 1753), pochází z tetraploidních rostlin, je to velmi pravděpodobné. Jeho popis se omezuje na lakonické „*Habitat in Europe pratis*“, což si lze přeložit tak, že měl Linné k dispozici nejrozšířenější typ rostlin, což jsou právě tetraploidní zástupci.

Anthoxanthum alpinum ($2n = 20$) se podle dosavadních výzkumů vyskytuje pouze na malém území v Polsku (Rozmus 1958), Francii (Teppner 1970, Felber 1988) a Švýcarsku (Hedberg 1970a).

2.1.2. Polyploidizace u druhu *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat.

Názory na vznik tetraploidního *A. odoratum* se dají shrnout do dvou skupin. První zastánci autoploidizace, tedy zdvojení sady chromozomů jednoho diploida, vyslovili svůj názor na základě pozorování průběhu meiózy (Katterman 1931, Parthasarathy 1939, Oestergen 1942). U autotetraploidů je, kvůli výskytu čtveřice homologních chromozomů, typickým jevem tvorba tetravalentů, které při pokusech spatřili.

Během experimentu I. Hedberg (1967) i F. Bretagnolla (2001) vznikli v čistě diploidní populaci *A. alpinum* triploidní jedinci. Podpořili autotetraploidní hypotézu na základě možnosti vzniku tetraploida splynutím neredukované triploidní gamety s gametou haploidní.

V roce 1970 publikovala Hedberg hypotézu autotetraploidního vzniku v té době objeveného tetraploidního *A. alpinum* z diploidního cytotypu téhož druhu (Hedberg 1970a). Tvrdila, že karyotyp *A. odoratum* je možno odvodit přestavbami chromozomů *A. alpinum*. Ve stejném roce uveřejnila pozměněnou variantu, a to, že druh *A. odoratum* vznikl hybridizací dvou odlišných ekotypů téhož diploida (Hedberg 1970b). Po zveřejnění objevu dvou odlišných diploidních karyotypů publikoval F. Felber v roce 1986 další možnost vzniku obou tetraploidů - z diploidního *A. alpinum* vznikl tetraploidní druh *A. alpinum*, z mediteránního diploida vznikl druh *A. odoratum*. Přitom oba diploidní karyotypy vznikly z jednoho společného předka a postupnou speciací se diferenciovaly.

S myšlenkou allopolyploidizace, tedy zkřížení dvou různých diploidů, přišel poprvé Borrill v roce 1963. Na základě morfologických výzkumů se domníval, že došlo ke zkřížení *A. alpinum* (2x) s rostlinou patřící do komplexu *A. aristatum-ovatum*.

Pro ověření jeho závěrů provedl Jones v roce 1964 morfologickou studii chromozomů a dospěl ke stejnému názoru. Ve zkoumaném materiálu nenašel žádného jedince, který měl čtyři stejné sady chromozomů. Uveřejnil několik možností vzniku tetraploidního *A. odoratum*: *A. alpinum* (2x) × *A. ovatum*, *A. alpinum* (2x) × „krétský diploid“, *A. ovatum* × „krétský diploid“.

[Jones při svých karyologických pokusech zaznamenal existenci diploida odlišného karyotypu a jako první připustil, že by tento diploid mohl hrát roli při vzniku tetraploida; nějakou dobu však trvalo, než byla existence dalšího diploida vzata na vědomí. Později se ukázalo, že je Jonesův krétský diploid zřejmě totožný s mediteránním diploidem (Hedberg 1986)].

Teppner v roce 1970 uveřejnil další názor na vznik tetraploida. Došlo podle něj ke zkřížení mediteránního diploida (o tomto druhu věděl ze svých studií jihoevropského materiálu) a hypotetického diploida podobného *A. alpinum*.

S další hypotézou přišla I. Hedberg v roce 1986, kdy už byla existence dvou diploidních i tetraploidních karyotypů plně prokázána. Na základě studia morfologie chromozomů obou diploidů i tetraploidů došla k názoru, že *A. odoratum* (4x) mohlo vzniknout zkřížením *A. alpinum* (2x) a mediteránního diploida. Potvrdila tak Jonesovu (1964) hypotézu. Zároveň ale Hedberg nevyloučila možnost vzniku *A. odoratum* autotetraploidizací, kterou jsme se pokusili, na základě měření velikosti genomu zmiňovaných taxonů, vyvrátit my v naší pilotní studii (Khodlová 2008).

2.1.3. Použití molekulárních markerů v rodě *Anthoxanthum*

Většina dosud publikovaných studií se zabývá rodem *Anthoxanthum* z morfologického či karyologického hlediska.

První, kdo použil molekulární markery u tohoto rodu, byli v roce 1999 Corine Zeroual-Humbert-Droz & François Felber. Elektroforeticky analyzovali isoenzymy a potvrdili autopolyploidní vznik tetraploidního druhu *A. alpinum*.

Další, na molekulární biologii založené, články vyšly v roce 2007. Pimentel *et al.* (2007b) studovali fylogeografii rodu *Anthoxanthum* pomocí metody AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Srovnávali rostliny z Madeiry, Pyrenejského poloostrova, Alp, Sudet, Skandinávie a Malty.

Pimentel & Sahuquillo (2007) se zabývali různými varietami endemického druhu Pyrenejského poloostrova *A. amarum* pomocí morfologických měření a Random Amplified Polymorphic DNA markerů (RAPD).

V roce 2008 totiž autoři vydali článek zabývající se vztahem mezi *A. odoratum* a *A. alpinum*. Na základě výsledků molekulárních (RAPD) a morfologických analýz populací pouze z Pyrenejského poloostrova a Skandinávie navrhli sjednocení těchto dvou druhů do jednoho.

V poslední publikaci Pimentel *et al.* (2010) řeší morfologickými metodami a metodou AFLP otázku dvou blízce příbuzných jednoletých druhů *A. aristatum* a *A. ovatum*. Myslí si, že je neoprávněné vyčleňovat je jako samostatné druhy.

2.2. Metody použité v diplomové práci

2.2.1. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FCM, Flow cytometry) je v současnosti metodou používanou v širokém spektru biologických oborů. Byla vyvinuta v 60. - 70. letech 20. století pro biomedicínské účely, zejména pak pro rychlé počítání a analýzu krevních buněk. Pevná buněčná stěna u rostlinných buněk způsobila pozdější nástup cytometrie v botanických oborech, kde se používá od počátku 80. let 20. století (Doležel 1997) zejména ke stanovení velikosti genomu, určení ploidie, reprodukčních způsobů, detekci endopolyploidie, aneuploidie aj. (Doležel *et al.* 2007).

Kvůli problematické morfologické odlišitelnosti druhů rodu *Anthoxanthum* byla tato metoda zvolena jako nejspolehlivější kritérium rozlišení diploidních a polyploidních jedinců.

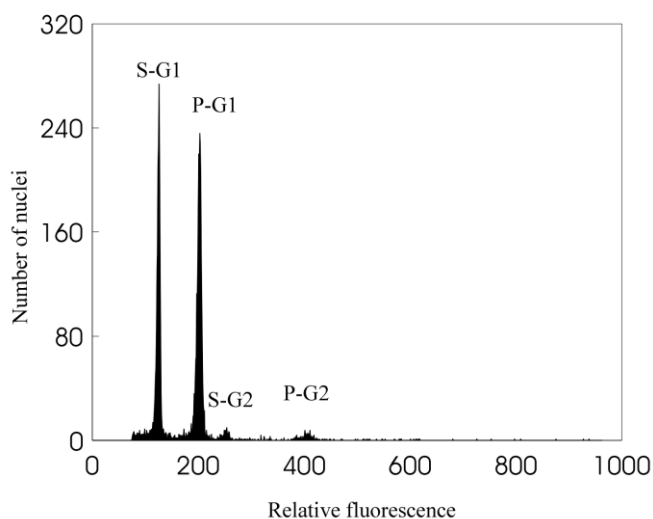
Je založena na snímání a vyhodnocení optických vlastností částic (buněk, jader apod.), které jsou nejdříve usměrněny do tenkého paprsku. Vzájemně oddělené procházejí jedna za druhou místem, kde jsou následně ozářeny specifickým zdrojem světla. To umožní stanovit jejich požadované vlastnosti. Pro botanické účely se používá zejména princip hydrodynamické fokusace dvou rozdílně proudících kapalin - vzorku (zpravidla suspenze jader) a unášecí kapaliny (zpravidla destilovaná voda). Fluorescenčně označený vzorek je tak v laminárním proudu unášen kapilárou průtokové komůrky, kde je ozářen paprskem excitačního zdroje světla. Fluorescenční pulsy částic jsou sbírány optickou soustavou a převáděny počítačem do digitální podoby (Doležel *et al.* 2007).

Výsledkem analýz jsou histogramy (obr. 1), které zobrazují relativní intenzitu fluorescence izolovaných jader.

Jedním z parametrů cytometrických analýz je variační koeficient (CV). Charakterizuje přesnost analýzy, rovná se podílu směrodatné odchylky a průměrné pozice píku. Obvyklá tolerance se pohybuje v rozmezí od 1 do 5 %. U kritických analýz, jako je například analýza velikosti genomu, jsou považovány za přesné hodnoty do 3 %. U druhů s vysokým obsahem sekundárních metabolitů či taxonů s malým množstvím DNA jsou akceptovány analýzy s vyšším CV (Suda 2004).

Hlavní přednosti průtokové cytometrie zahrnují jednoduchou přípravu vzorků, velkou rychlost analýz a nedestruktivnost. Pro analýzu stačí velikost pletiva kolem 0,5 cm², což umožňuje rostlinu analyzovat několikrát. Je možné studovat i vzácné, ohrožené či mizející druhy (Suda 2004). Mezi další přednosti této metody patří možnost analyzovat širokou škálu pletiv a nezávislost na dělicích se buňkách (Doležel *et al.* 2007).

K nevýhodám patří ve většině případů nutnost použití čerstvého rostlinného materiálu. Dalším negativním faktorem je vysoký obsah sekundárních metabolitů některých čeledí (Geraniaceae, Rosaceae) či organických kyselin (Crassulaceae). Sekundární metabolity, zejména taniny, negativně ovlivňují vazbu fluorescenčního barviva na dvoušroubovici DNA, organické kyseliny silně snižují pH vzniklé jaderné suspenze. Všechna výše uvedená fakta se nepříznivě odráží v kvalitě histogramů (Suda 2004).



Obrázek 1. Ukázka výsledného histogramu z průtokového cytometru - analýza mladého listového pletiva *Anthoxanthum alpinum* 2x. Velký pík S-G1 odpovídá jádrům vzorku se základním množstvím jaderné DNA (G1 fáze cyklu), P-G1 je pík standardu – *Pisum sativum*. Ve dvounásobné vzdálenosti se nachází jádra s duplikovaným množstvím genetického materiálu (G2 fáze), mezi nimi leží jádra syntetizující DNA (S fáze) a signály v levé části označují nespecifickou fluorescenci („šum“ daný existencí poškozených organel, autofluorescencí, apod.)

2.2.2. Molekulární analýzy

Prakticky všechny práce z oblasti molekulární fylogenetiky v současné době používají jako molekulární markery pořadí nukleotidů v sekvenci DNA. Tato data se získávají pomocí různých molekulárních metod, mezi které patří i sekvenování genů, jejich částí či nekódujících oblastí.

2.2.2.1. Sekvenování chloroplastové DNA (*cpDNA*)

Chloroplastový genom obsahuje několik desítek molekul *cpDNA*, skládajících se z kódujících (funkčních) úseků představujících geny pro proteiny a RNA a úseků nekódujících (bez funkce), které jsou tvořeny introny a mezerníkovými úseky mezi geny (Shaw *et al.* 2007).

V 80. letech 20. století se začala studovat příbuznost taxonů na základě analýz restričních míst *cpDNA*. Technologický pokrok a s ním související snížení nákladů na sekvenování DNA v 90. letech 20. století přispěly k širokému uplatnění této metody a způsobily zvrat v molekulární fylogenetice (Soltis *et al.* 1998). U rostlin převládly analýzy sekvencí *cpDNA*, zejména genů jako *rbcL*, *matK* či *ndhF* (Olmstead & Palmer 1994). Jedním z limitujících faktorů při použití těchto kódujících úseků pro odhalování evolučních vztahů mezi blízkými příbuznými rody nebo na vnitorodové úrovni je jejich nedostatečná mutační rychlost, a tedy nízká variabilita porovnávaných sekvencí (Palmer *et al.* 1988).

Pro fylogenetické analýzy na nejrůznějších taxonomických úrovních se začaly proto v 90. letech 20. století používat nekódující oblasti *cpDNA* (např. Taberlet *et al.* 1991, Clegg *et al.* 1994, Morton & Clegg 1993, Gielly & Teberlet 1994). Sekvence těchto oblastí umožňují detekovat polymorfismy na úrovni populací až jedinců, identifikovat jednotlivé haplotypy a postulovat příbuzenské vztahy mezi nimi. Využívají se k řešení celé řady systematických i evolučních otázek jako zjišťování původu domestikovaných druhů (Wills & Burke 2006), sledování biogeografických pohybů (Ickert-Bond & Wen 2006, Schönswetter *et al.* 2006a, b), osvětlení mezidruhových vztahů v rámci rodu (Shaw & Small 2005).

Zejména díky uniparentální (u krytosemenných rostlin nejčastěji maternální) dědičnosti (Corriveau & Coleman 1988, Harris & Ingram 1991) a také absenci rekombinací (Schaal *et al.* 1998) se analýzy *cpDNA* využívá při fylogeografických studiích (Demesure *et al.* 1996, Dumolin-Lapègue *et al.* 1997, Stehlik 2002).

Převážně matroklinní dědičnost, haploidní a nerekombinantní charakter, mají za následek nepřítomnost alelické variability v rámci jednoho jedince. To umožňuje přímé sekvenování bez potřeby klonování (Krač 2011).

Omezení použití *cpDNA* se v systematice týká především hybridizace a polyploidizace, které jsou u rostlin častými způsoby speciace. Je fakt, že haploidní a uniparentálně děděná *cpDNA* vypovídá vždy jen o jedné z rodičovských linií. Analýzou samotné *cpDNA* v případě hybridního taxonu budou nalezeny pouze vazby k jednomu z rodičů. Druhá linie i samotný fakt, že k hybridizaci došlo, zůstanou neodhaleny (Krač 2011).

Pro studium evoluce na mezidruhové (a často ani mezirodové) úrovni nejsou kódující úseky *cpDNA* dostatečně variabilní. Proto je při studiu těchto vztahů nutné zaměřit pozornost na nekódující úseky – introny a mezerníky. Díky existenci univerzálních primerů (Taberlet *et al.* 1991, Shaw *et al.* 2005, 2007) je možné bez větších problémů amplifikovat kterýkoli z nich.

V této studii bylo použito sekvenování úseku *trnL-trnF* (Taberlet *et al.* 1991), který byl v letech 1992-2005 použit spolu se sekvenováním genu *trnK/matK* v 342 studiích vydaných v periodikách *American Journal of Botany*, *Systematic Botany*, *Molecular Phylogenetics and Evolution* či *Plant Systematics and Evolution* (Shaw *et al.* 2005). Druhým sekvenovaným nekódujícím *cpDNA* úsekem je, podle studií Shaw *et al.* (2007) a Timme *et al.* (2007) nejvariabilnější *cpDNA* úsek *rpl32-trnL^(UAG)*.

2.2.2.2. Sekvenování GBSSI – Granule-Bound Starch Synthase I (Waxy)

Kromě *cpDNA* se ve fylogenetice rostlin používá také jaderná ribosomální DNA (*nrDNA*). Vyskytuje se v genomu v mnohatisícových tandemových repetících, tvoří zhruba 10 % celkové DNA. Jako všechny jaderné geny je děděná biparentálně. Substituční rychlost se u jednotlivých oblastí *nrDNA* podstatně liší. Lze u něj rozlišit úseky konzervované a úseky variabilní. Vyšší míru proměnlivosti vykazují interní a externí přepisované mezerníky (*ITS* a *ETS*). Nejrychleji mutuje mezerník *IGS* (Krač 2011).

Výhodami použití *nrDNA* je zejména její velké množství v rostlinném genomu a výskyt extrémně konzervativních úseků. S tím je spojená snadná izolace a amplifikace, zejména možnost použití univerzálních primerů (White *et al.* 1990, Blattner & Kadereit 1999).

Nejpoužívanějším molekulárním markerem v molekulární systematice rostlin je *ITS* (*Internal Transcribed Spacer*). Relativně vysoká substituční rychlost z něj tvoří vhodný marker pro biosystematické studie hlavně na mezidruhové úrovni (Alvarez & Wendel 2003), řada studií však odhalila jeho nedostatečnou variabilitu (Baldwin *et al.* 1995, Sang 2002), což byl v roce 2006 i náš případ (Trávníček, nepublikováno).

Alternativou k *nrDNA* jsou geny nacházející se v jaderném genomu pouze v několika málo kopiích, tzv. low-copy či single-copy geny. Obecně se věří, že tyto geny mohou být, a často i bývají, variabilnější než *ITS* úsek *nrDNA* i nekódující sekvence *cpDNA*.

Navíc jsou low-copy markery méně často subjektem tzv. *concerted evolution*, která zaručuje intragenomickou uniformitu opakujících se jednotek (Cronn *et al.* 1999, Senchina *et al.* 2003). Jsou tudíž vhodným nástrojem pro rekonstrukci allopolyploidizace (Small *et al.* 1998, Sang & Zhang 1999). V čeledi Poaceae, například v rodě *Elymus* (Mason-Gamer 2008) či *Bromus* (Fortune *et al.* 2008), byly úspěšně použity pro identifikaci rodičovských kombinací předpokládaných hybridů či polyploidů sekvence genu *waxy* (GBSSI). Proto jsme se rozhodli použít tento gen i pro rod *Anthoxanthum*.

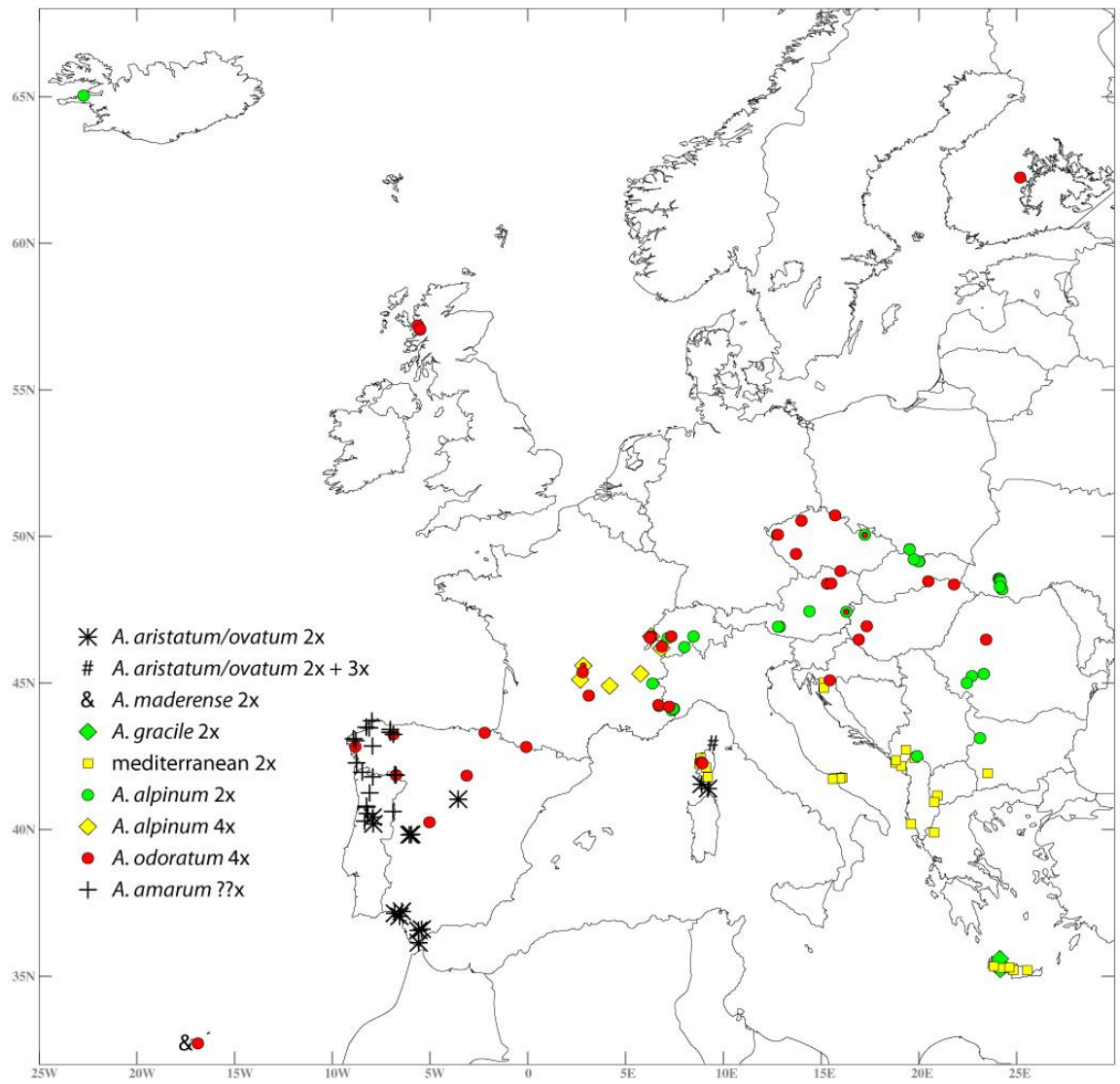
3. Materiál a metody

3.1. Rostlinný materiál

Během let 2006 až 2011 byl pořízen rostlinný materiál ze 142 populací rodu *Anthoxanthum* z co nejširšího území Evropy, zejména pak z Evropy jižní, kde je centrum diverzity rodu. Souřadnice všech lokalit byly zaměřeny pomocí GPS (obr. 2, tab. 2). Materiál obsahuje vzorky ze 37 lokalit *A. odoratum* (4x), 30 lokalit *A. alpinum* (2x), 28 lokalit mediteránního diploida, 19 lokalit *A. amarum*, 13 lokalit komplexu *A. aristatum / ovatum*, 4 lokalit *A. alpinum* (4x), 3 lokalit *A. gracile*, 1 lokality *A. maderense*, 2 smíšených populací *A. alpinum* (2x) + *A. odoratum*, 2 smíšených populací *A. alpinum* (4x) + *A. odoratum*, 2 smíšených populací *A. odoratum* + *A. amarum* a 1 populace s komplexem *A. aristatum / ovatum* 2x a 3x.

V terénu byly sbírány buď: 1) nepoškozené vitální listy, které byly uschovávány v uzavíratelných plastových sáčcích, a po návratu z terénu neprodleně zpracovány (zejména pro účely cytometrických analýz); 2) mladší nepoškozené listy, které byly uchovávány v uzavíratelných plastových sáčcích se silikagelem (DNA metody); 3) živé rostliny, které byly přesazeny do experimentální zahrady Botanického ústavu v Průhonicích; nebo 4) obilky pro vyklíčení v následující sezóně a pěstování tamtéž. V obou případech s využitím zázemí experimentální zahrady bylo k analýzám velikosti genomu a odběrům pro DNA analýzy přistoupeno až poté, co rostliny utvořily nové listy. Na lokalitách též byly sebrány herbářové položky z 1-3 rostlin, případně k těmto účelům byly využity pěstované rostliny.

Jako outgroup pro molekulární analýzy byla použita *Hierochloë australis* z Holubovských hadců u Křemže (Jižní Čechy, Česká Republika).



Obrázek 2. Mapa sběrů. Podrobnosti v tabulce 2.

Tabulka 2. Seznam lokalit sběrů a některé výsledky. Řazeno abecedně podle států.

Taxony: alp 2x - *A. alpinum* 2x, alp 4x - *A. alpinum* 4x, odo 4x - *A. odoratum*, amarum - *A. amarum*, annu 2x - *A. aristatum / ovatum*, mad 2x - mediteránní diploid, gra 2x - *A. gracile*; N-FCM – počet analyzovaných rostlin z dané populace průtokovou cytometrií. s. o. - směrodatná odchylka. (Haplo)skupiny – haploskupiny cpDNA a skupiny alel genu GBSSI nrDNA vyskytující se u populace.; Sběratelé: AK - A. Krahulcová, FK - Filip Kolář, FKr F. Krahulec, FR - F. Rooks, HC - H. Chudáčková, JC - J. Chrtek, JK - J. Krejčíková, JS - J. Suda, JZ - J. Zahradníček, KK - K. Krak, MPP - M. Pimentel Pereira, MS - M. Štech, PR - P. Růžičková, PS - P. Silveira, PT - P. Trávníček, PV - P. Vít, RS - R. Sudová, TU - T. Urfus, ZD - Z. Dočkalová, ZK - Z. Khodlová.

Název populace	Lokalita	Souřadnice	Nadmožská výška (m.n.m.)	Sběratel	Taxon	N FCM	Průměrná velikost genomu ± s. o.	Variance [%]	trnL-trnF	Číslo vzorků rpl32-trnL	GBSSI/ počet klonů	(Haplo)skupiny chloroplast trnL-F oba
Albánie (Albania, AL)												
AL01	Qaň e Pejes	N42 26 58.5, E19 46 11.2	1680	FR	alp 2x	6	7,396 ± 0,058	2,2	194	194	M	M1
AL02	Llogara	N40 12 01.9, E19 36 06.3	1281	FR	alp 2x	5	7,586 ± 0,170	6,0	195	195	M	M1
Bulharsko (Bulgaria, BG)												
BG01	Berkovitsa, Petrochan	N43 07 06.4, E23 07 36.4	1394	AK, FKr	alp 2x	4	5,567 ± 0,023	1,0				
BG02	Stara Planina, Trojanski prochod (Beklemeto)	N42 46 47.4, E24 36 22.7	1538	AK, FKr	alp 2x	1	5,692	-				
BG03	Prin, Dolno Draglište	N41 55 01.2, E23 31 16.8	819	AK, FKr	alp 2x	1	7,328 ± 0,039	-	196	196	M	M1
Černá Hora (Montenegro, MNE)												
MNE01	Šćepica	N42 30 26.9, E19 54 33.4	2006	FR	alp 2x	2	5,611 ± 0,054	1,4	176	177	176/4	A A A
MNE02	Butva	N42 17 04.4, E18 48 11.2	1	PT	alp 2x	3	7,499 ± 0,059	1,6				
MNE03	Sutomore	N42 09 56.5, E19 05 57.7	631	PT	alp 2x	3	7,497 ± 0,047	1,2	124	124		M
MNE04	Veje Duboko	N42 43 40.0, E19 20 42.8	255	PT	alp 2x	5	7,451 ± 0,045	1,4	126	126		M
MNE05	Majstori	N42 22 44.9, E18 50 21.7	1242	PT	alp 2x	2	7,335 ± 0,052	1,0	127	127	127/8	M M1 M
MNE06	Dumitor, Žabljak	N43 06 40.2, E19 01 08.9	1886	JC	alp 2x	1	7,258 ± 0,034	-	191	191		M
Česká republika (Czech republic, CZ)												
CZ01	Jeseníky, Velká Kotlina	N50 03 36.0, E17 14 13.7	1420	MS	alp 2x	1	5,518 ± 0,045	-	11	11		A
CZ02	Slavkovský les, Křížky	N50 03 57.2, E12 45 06.3	804	PT	odo 4x	1	12,645 ± 0,093	-	192	192	192/4	M
CZ03	Slavkovský les, Dominova skalka	N50 04 17.2, E12 47 10.6	759	PT	odo 4x	4	12,509 ± 0,160	3,1	131	131		M
CZ04	České středohoří, Opámo	N50 32 21.0, E13 59 18.8	271	PT	odo 4x	1	12,404 ± 0,049	-	45	45		M
CZ05	Havraníky	N48 48 44.20, E15 59 43.52	328	PT	odo 4x	4	12,743 ± 0,114	1,9	129	129	129/14	A A A
CZ06	Chanovice	N49 24 39.91, E13 43 52.07	530	JS, RS	odo 4x	2	12,900 ± 0,178	2,0	47	47		M
CZ07	Křikonoše, Modrý díl	N50 42 50.6, E15 42 36.1	1037	PT	odo 4x	1	12,356 ± 0,018	-				
Finsko (Finland, FIN)												
FIN01	Petäjävesi	N62 15 00.1, E25 11 04.6	169	HC	odo 4x	1	12,326 ± 0,025	-	200	200		A A

Název populace	Lokalita	Souřadnice	Nadmořská výška (m. n. m.)	Sběratel	Taxon	N FCM	Průměrná velikost genomu ± s. o.	Variance [%]	<i>trnL-trnF</i>	Číslo vzorku <i>trp132-trnL</i>	GBSSI/ počet klonů	(Haplo)skupiny chloroplast <i>trnL-F</i> oba	GBSSI
Francie (France, F)													
F01	Provence-Alpes-Côte d'Azur, Lac D'Allos	N44 13 44.58, E6 42 40.43	2241	PT	alp 2x	2	5,570 ± 0,101	2,6					
F02	Provence-Alpes-Côte d'Azur, Vallée des Merveilles	N44 4 35.652, E7 22 3.576	2098	PT	alp 2x	2	5,660 ± 0,021	0,5					
F03	Provence-Alpes-Côte d'Azur, Vallon de la Valmasque	N44 6 57.348, E7 28 17.94	1936	PT	alp 2x	1	5,652	-					
F04	Provence-Alpes-Côte d'Azur, Lac de L'Agnel	N44 7 24.12, E7 26 32.52	2430	PT	alp 2x	3	5,576 ± 0,006	0,2	67	67		A A	
F05	Auvergne, Mont Dore	N45 35 46.8, E2 50 03.5	1280	PT, ZK	alp 4x odo 4x	1 2	11,069 ± 0,056 12,508 ± 0,316	- 7,1	161	161		A A	
F06	Auvergne, Puy Mary	N45 06 45.7, E2 40 22.0	1612	PT, ZK	alp 4x	4	11,081 ± 0,091	1,8					
F07	Auvergne, Les Estables	N44 54 42.1, E4 11 13.2	1649	PT, ZK	alp 4x	3	10,981 ± 0,088	1,5	182,183	162		A A A	A
F08	Rhône-Alpes, Charmant som	N45 19 15.1, E5 45 39.7	1771	PT, ZK	alp 4x	1	11,125	-					
F09	Corse, Giuncheto	N41 33 16.0, E8 53 07.2	52	PT	annu 2x	12	8,096 ± 0,345	13,2					
F10	Corse, Macinaggio	N42 58 13.6, E9 27 10.6	12	PT	annu 2x annu 3x	17 1	7,632 ± 0,241 11,143 ± 0,049	9,6 -	87	87	87/6	M M1 M	M
F11	Corse, Bonifacio	N41 24 25.5, E9 12 47.1	4	PT	annu 2x	5	8,562 ± 0,487	16,6					
F12	Corse, Zonza	N41 47 28.6, E9 12 41.1	1037	PT	med 2x	2	7,370 ± 0,133	2,6	80	80		M M1	M
F13	Corse, Calenzana	N42 26 14.5, E8 50 33.1	761	PT	med 2x	1	7,399 ± 0,034	-	94	94		M M1	M
F14	Corse, Manso	N42 25 39.8, E8 49 23.2	929	PT	med 2x	3	7,381 ± 0,074	1,8	97	97	97/7	M	M
F15	Corse, Calenzana	N42 26 29.5, E8 50 35.8	549	PT	med 2x	3	7,534 ± 0,030	0,7					
F16	Corse, Evisa	N42 15 01.6, E8 46 31.8	291	PT	med 2x	1	7,528 ± 0,055	-	73	73		M M1	M
F17	Corse, Tattone	N42 07 05.2, E9 06 32.4	1147	PT	med 2x	3	7,273 ± 0,123	3,4	91	91		M M1	M
F18	Provence-Alpes-Côte d'Azur, Allos	N44 15 11.1, E6 40 59.3	1886	PT	odo 4x	2	12,686 ± 0,037	0,4	68	68		M M1	A, M
F19	Corse, Nueve	N42 17 26.8, E8 52 28.8	1456	PT	odo 4x	1	13,356 ± 0,043	-	101,104	101/20, 104/16		M M1	A, M
F20	Corse, Cristinauce	N42 15 20.4, E8 55 06.5	1830	PT	odo 4x	1	13,149 ± 0,093	-	107	107		M	
F21	Corse, Cristinauce	N42 15 45.8, E8 55 56.1	1589	PT	odo 4x	1	13,105 ± 0,127	-					
F22	Bretagne, Plévenon	N62 15 00.1, E25 11 04.6	56	PT	odo 4x	1	13,346 ± 0,117	-					
F23	Auvergne	N45 22 21.2, E2 48 27.9	1413	PT, ZK	odo 4x	2	13,022 ± 0,117	1,3					
F24	Auvergne, Les Salces	N44 34 19.3, E3 06 57.2	1604	PT, ZK	odo 4x	8	12,844 ± 0,152	3,3	181	181		M M1	M
F25	Pyrenées, Vallée du Lutour	N42 49 15.2, W0 05 23.8	2023	JK	odo 4x	3	12,577 ± 0,119	1,8	189	189		A A	A
F26	Francouzské alpy	N44 59 36.2, E6 22 54.9	1998	AK, FKr	alp 2x	1	5,741	-	10,63	10,63		A	
Chorvatsko (Croatia, HR)													
HR01	Lika-Senj, Brinje	N45 00 27.5, E15 07 43.2	486	PT	med 2x	3	7,490 ± 0,051	1,2	53	53		M M1	M
HR02	Lika-Senj, Gorici	N44 50 44.4, E15 08 48.8	525	PT	med 2x	4	7,384 ± 0,051	1,4	48	48		M M1	M
HR03	Karlovac, Janja Gora	N45 05 48.5, E15 26 04.2	364	PT	odo 4x	3	13,291 ± 0,086	1,3				M M1	M

Název populace	Lokalita	Souradnice	Nadmořská výška (m.n.m.)	Sběratel	Taxon	N FCM	Průměrná velikost genumu ± s.o.	Variance [%]	<i>trnL-trnF</i>	Číslo vzorku <i>mp32-trnL</i>	GBSSI/ počet klonů	(Haplo)skupiny chloroplast <i>trnL-F</i> oba	GBSSI
Island (Iceland, IS)													
IS01	Halgetellssveit	N65 02 33.3, W22 43 40.6	75	JS, RS	alp 2x	1	5,433 ± 0,012	-	204	204	204/4	A A A A	A
Itálie (Italy, I)													
I01	Apulia, Foggia, Valico del Lupo	N41 46 47.0, E16 05 35.0	689	PT	med 2x	2	7,450 ± 0,037	0,7					
I02	Apulia, Foggia, Monte Sant Angelo	N41 45 20.4, E15 59 17.0	607	PT	med 2x	4	7,519 ± 0,046	1,3	31			M	
I03	Apulia, Foggia, San Marco In Lamis	N41 43 59.3, E15 36 04.1	710	PT	med 2x	4	7,490 ± 0,103	3,3	133	133		M M1	
I04	Piedmont, Cuneo, Valle di Valasco	N44 12 09.36, E7 14 13.2	1758	PT	odo 4x	4	13,046 ± 0,245	4,7					
Maďarsko (Hungary, H)													
H01	Veszprem, Sümeg	N46 56 15.39, E17 19 45.05	160	JC, ZD	odo 4x	1	13,236	-					
H02	Nagykanizsa, Homokkőmáram	N46 29 2.53, E16 55 34.19	150	JC, ZD	odo 4x	1	13,473	-					
H03	Aggtelek	N48 28 20.16, E20 29 29.11	329	AK, FKr	odo 4x	1	13,096	-					
Makedonie (Macedonia, MK)													
MK01	Pelagonia, Gorno Knushje	N41 10 09.4, E20 56 43.2	1192	TU, PV, KK	med 2x	8	7,266 ± 0,081	3,0	205	205	205/2	M M1	M
MK02	Pelagonia, Tipejca	N40 56 41.0, E20 47 23.2	900	TU, PV, KK	med 2x	1	7,443 ± 0,027	-	206		206/2	M	M
Polsko (Poland, PL)													
PL01	Babia Gora	N49 34 25.5, E19 31 58.8	1725	FK, MS	alp 2x	3	5,465 ± 0,048	1,7					
Portugalsko (Portugal, P)													
P01	Fiais de Beira	N40 25 30.9, W7 56 13.4	153	PT, JK, JZ	annu 2x	4	7,099 ± 0,087	3,0	158	158		M M2	
P02	Madeira, Pico do Arieiro	N32 44 31.5, W16 56 19.6	1602	PV, KK	mad 2x	3	7,028 ± 0,029	0,8	213,214	214	213/11, 214/15	M M1	M
P03	Madeira, Col da Poiso	N32 42 44.9, W16 53 07.5	1390	PV, KK	odo 4x	5	13,272 ± 0,187	3,3	212	212	212/14	A A	A, M
P04	Bragança, Rabal	N41 51 57.4, W6 45 09	679	MPP	odo 4x	1	13,044 ± 0,062	-					
P05	Cabeço da Neve, Caramulo	N40 33 12.5, W8 10 46	712	MPP	amarum	1	46,574	-					
P06	Bragança, Road from Alimonte to Vila Boa de Ousilhão	N41 48 09, W7 56 13	879	MPP	amarum	1	46,716 ± 0,387	-					
P07	Sao Joao da Serra	N40 46 49, W8 14 25	373	MPP	amarum	1	44,846 ± 0,481	-					
P08	Almeida, Castelo Bom	N40 37 12, W6 53 44	696	MPP	amarum	1	43,848 ± 1,899	-					
P09	Caramulo, Caramulinho	N40 32 52, W8 12 06	961	MPP	amarum	1	42,185	-					
P10	Bragança, road from Carregosa to Cova da Lua	N41 52 48, W6 48 46	825	MPP	amarum	1	46,202	-					
P11	Extremo, near Monção	N41 57 53, W8 28 25	406	MPP	amarum	1	39,513	-					
P12	Sao Joaoe	N40 47 45.7, W8 15 22.5	150	PT, JK, JZ	amarum	1	44,713 ± 0,653	-					M
P13	Cepelos	N41 15 04.9, W8 05 37.2	163	PT, JK, JZ	amarum	2	47,479	-	159			M	
P14	Beira Litoral, Coimbra, Penicova, Agrêlo	N40 17 00.0, W8 21 00.0	258	PS	amarum	2	44,939 ± 0,470	1,5	188	142		M M2	
P15	Beira Litoral, Coimbra, Parozelos	N40 12 30.8, W7 53 58.5	864	PS	annu 2x	3	45,573 ± 0,087	0,3	145	145	145/11	M M1	A, M

Název populace	Lokalita	Souřadnice	Nadmořská výška (m.n.m.)	Sběratel	Taxon	N FCM	Průměrná velikost genomu ± s.o.	Variance [%]	<i>trnL-trnF</i>	Číslo vzorku <i>rpl32-trnL</i>	GBSSI/ počet klonů	Haplo skupiny chloroplast <i>trnL-F</i> oba	GBSSI
Rakousko (Austria, A)													
A01	Gefroner see	N47 27 07.9, E14 23 54.7	2200	JK	alp 2x	2	5,473 ± 0,023	0,6	193			A	
A02	Hohle Tauern, Almhütte Laderalm	N46 55 16.62, E12 52 38.04	1870	HC	alp 2x	1	5,523 ± 0,032	-	66	66	208/2	A	A
A03	Burgenland, Redlschlag	N47 26 12.1, E16 17 18.0	687	PT, ZK	alp 2x	10	5,542 ± 0,049	2,8	34	34	210/12	A	A
A04	Hohle Tauern, Wangenitzsee	N46 55 46.14, E12 48 0.96	2472	HC	odo 4x	2	12,669 ± 0,019	0,2	40	40	207/4	M	M1
A05	Lower Austria, Ötzbach	N48 23 20.1, E15 18 10.8	700	PT, ZK	alp 2x	-	-	-	17			A	
A06	Lower Austria, Dürnstein	N48 23 51.4, E15 31 16.0	327	PT, ZK	odo 4x	2	12,803 ± 0,027	0,3	33	33	207/4	M	M
									24			A	
Rumunsko (Romania, RO)													
RO01	Lupeni	N45 18 39.5, E23 19 47.4	1610	JK	alp 2x	1	5,491 ± 0,002	-	208		208/2	A	A
RO02	Lacul Iovannu	N45 14 17.6, E22 43 16.8	1560	JK	alp 2x	1	5,472 ± 0,029	-	209			A	A
RO03	Prisacina	N45 00 57.5, E22 27 07.0	1513	JK	alp 2x	1	5,493 ± 0,049	-	210	210	210/12	A	A
RO04	Runc, Cheile Pociovalistei	N46 29 50.0, E23 25 59.0	570	JK	odo 4x	1	12,764 ± 0,074	-	207	207	207/4	M	M1
												M	A, M
Řecko (Greece, GR)													
GR01	Crete, Koumas	N35 19 05.0, E24 18 26.9	299	PT, JK	gra 2x	1	18,633 ± 0,106	-	167	167	167/6	G	G
GR02	Crete, Imbros gorge	N35 14 40.6, E24 10 01.0	741	PT, JK	gra 2x	1	18,860 ± 0,307	-	168	168		G	G
GR03	Crete, Akrotiri	N35 35 25.6, E24 08 46.9	72	PT, JK	gra 2x	-	-	-	166	166		G	G
GR04	Crete, Ano Mialaki	N35 17 14.8, E24 25 06.5	292	PT, JK	med 2x	1	7,728 ± 0,096	-					
GR05	Crete, Ammoudari	N35 17 29.6, E24 11 43.8	683	PT, JK	med 2x	1	7,515 ± 0,078	-					
GR06	Crete, Lassithi - Exo Potamoi	N35 12 39.1, E25 32 27.0	847	PT, JK	med 2x	1	7,481 ± 0,065	-	169	169		M	M1
GR07	Crete, Psiloritis - Nida	N35 12 24.2, E24 50 06.0	1375	PT, JK	med 2x	1	7,504 ± 0,049	-	170			M	
GR08	Crete, Aikadi	N35 18 34.7, E24 37 53.7	491	PT, JK	med 2x	1	7,526 ± 0,040	-				M	
GR09	Epirus, Vraketo	N39 54 17.7, E20 46 57.7	1465	TU, PV, KK	med 2x	7	7,390 ± 0,049	1,7	201	201		M	M1
GR10	Crete, Agia Efimi	N35 20 46.3, E23 49 35.3	337	PT, JK	med 2x	-	-	-					
Slovensko (Slovakia, SK)													
SK01	Vysoké Tatry, Furkotská dolina	N49 09 15.0, E20 01 45.0	1830	PV	alp 2x	1	5,455 ± 0,029	-	118			A	
SK02	Vysoké Tatry, Kivvň	N49 09 29.0, E19 59 37.2	1992	PV	alp 2x	2	5,499 ± 0,044	1,1	62,120			A	
SK03	Roháčce, Zábnať	N49 13 05.5, E19 45 18.9	1792	PV	alp 2x	1	5,414 ± 0,040	-	121	121		A	A
SK04	Babia Gora	N49 34 08.6, E19 31 38.8	1605	PV	alp 2x	1	5,465 ± 0,028	-	122			A	
SK05	Tatucka	N48 21 46.0, E21 47 22.4	254	JS	odo 4x	3	13,104 ± 0,164	2,3	46	46		M	M1
Španělsko (Spain, E)													
E01	Cuenca Alta del Lozoya, Madarros	N41 02 12.1, W3 34 06.8	1067	PT, JK, JZ	annu 2x	3	7,127 ± 0,251	6,7					
E02	Sierra de Gratalena, Ubrique	N36 36 41.0, W5 25 37.8	749	PT, JK, JZ	annu 2x	2	7,663 ± 0,188	3,5	149	149		M	M1
E03	NP Los Alcornocales	N36 33 35.4, W5 36 04.1	449	PT, JK, JZ	annu 2x	5	7,529 ± 0,189	5,3					
E04	Algeciras, NP Los Alcornocales	N36 08 42.1, W5 35 28.8	222	PT, JK, JZ	annu 2x	1	7,474 ± 0,141	-					
E05	Dohana, Matalascas	N37 02 52.6, W6 34 09.3	25	PT, JK, JZ	annu 2x	2	7,544 ± 0,085	1,6	150				M

Název populace	Lokalita	Souřadnice	Nadmořská výška (m.n.m.)	Shrnutí	Taxon	N FCM	Průměrná velikost genomu ± s. o.	Variance [%]	<i>trnL-trnF</i>	Číslo vzorků <i>mp32-trnL</i>	GBSSI / počet klonů	Haplo skupiny chloroplast <i>trnL-F</i> oba
Španělsko (Spain, E)												
E06	Doñana, Mazagon	N37 08 40.8, W6 48 39.1	35	PT, JK, JZ	annu 2x	3	7,448 ± 0,107	2,9	151,197	197	151/4	M M1 M
E07	Doñana, Almonte	N37 12 47.6 W6 26 33.3	35	PT, JK, JZ	annu 2x	4	7,509 ± 0,135	4,0	152,198			M
E08	Montfauie, Rio Tajo	N39 49 41.6, W6 03 01.6	450	PT, JK, JZ	annu 2x	4	7,265 ± 0,515	14,9	153			M
E09	Montfauie, Rio Tietar	N39 50 28.2, W5 57 57.3	258	PT, JK, JZ	annu 2x	8	7,582 ± 0,685	31,4	154,199	199		M M2
E10	Sierra de Gredos, Mombeltrán	N40 16 01.6, W5 01 32.5	745	PT, JK, JZ	odo 4x	3	13,400 ± 0,200	2,6	155	155		A A
E11	Cañon del Rio Lobos, Hontoria de Pinar	N41 50 40.5, W3 07 32.2	1058	PT, JK, JZ	odo 4x	3	13,286 ± 0,254	3,9	157			M
E12	Basque, Gétaria	N43 18 35.0, W2 12 06.6	22	PT, JK, JZ	odo 4x	3	13,210 ± 0,246	3,3	178,179,180	178	178/12,179/13, 180/11	M M1 A
E13	Galicia, Noia, Nimo	N42 50 02, W8 49 58	256	MPP	odo 4x	1	13,158 ± 0,050	-				
E14	Galicia, Foga de Nimo, Noia	N42 49 58, W8 49 53	291	MPP	odo 4x	1	13,315 ± 0,013	-				
E15	Asturias, Pesoz	N43 15 25, W6 52 37	263	MPP	odo 4x	1	13,561 ± 0,025	-				
E16	Galicia, Faiide, Santa Comba	N43 02 14, W8 48 26	377	MPP	amarum	2	42,717 ± 1,504	5,1				
E17	Galicia, Pena do Coiro, Bueu	N42 17 14.8, W8 45 42.6	270	MPP	amarum	1	43,391 ± 1,272	-				
E18	Asturia, Road from taranundi to Oscos	N43 19, W7 03	869	MPP	amarum	1	45,351	-				
E19	Galicia, Pambre, Palas de Rei, Lugo	N42 51 22, W7 57 02	467	MPP	amarum	1	44,447 ± 1,241	4,0				
E20	Galicia, Zas	N43 06 09, W8 55	204	MPP	amarum	1	46,202 ± 0,489	-				
E21	Cedeira, San Andrés de Teixido	N43 42 31, W7 58 57	159	MPP	amarum	1	49,74	-				
E22	A Cabana, Bellelle	N43 27 54, W8 06 26	287	MPP	amarum	1	43,542	-				
E23	Ferrol, Valón	N43 29 39, W8 15 59	105	MPP	amarum	1	47,08	-				
E24	Asturia, La Coba, Grandas de Salime	N43 25 33.2, W7 02 04.6	345	MPP	amarum	1	41,547 ± 0,301	-				
Švýcarsko (Switzerland, CH)												
CH01	Valais, Simplan Kulm	N46 13 40.8, E8 00 47.7	1850	PT	alp 2x	3	5,599 ± 0,010	0,3				
CH02	Fribourg, La Gruyere, Vantil Noir	N46 32 13.3, E7 09 44.6	1881	PT, ZK	alp 2x	3	5,580 ± 0,014	0,4				
CH03	Ticino, Bellinzona, Chât Herbrig	N46 35 25.3, E8 28 20.8	2053	PT	alp 2x	3	5,625 ± 0,031	1,1				
CH04	Vaud, Morges, Mont Tendre	N46 35 38.7, E6 18 31.7	1650	PT, ZK	alp 4x	3	10,994 ± 0,079	1,4	203	203		A A
CH05	Valais, Les Crosets	N46 11 27.4, E6 50 09.6	1828	PT, ZK	alp 4x	3	10,731 ± 0,214	4,1	202	202		A A
CH06	Valais, Chatel	N46 15 33.2, E6 51 16.1	1797	PT, ZK	odo 4x	3	12,542 ± 0,095	1,5				M
CH07	Bern, Oberimmmental-Saanen, Jaunpass	N46 35 33.5, E7 20 55.4	1455	PT, ZK	odo 4x	2	12,862 ± 0,313	3,5	185	185	185/5	A A,*
CH08	Vaud, Morges, Mont Tendre	N46 35 35.1, E6 18 13.5	1618	PT, ZK	odo 4x	1	13,232 ± 0,167	-	187	187		M M2
CH09	Vaud, Jura-Nord vaudois, Le Brassus	N46 33 59.0, E6 14 03.1	1368	PT, ZK	odo 4x	3	12,660 ± 0,103	1,5				

Název populace	Lokalita	Souřadnice	Nadmořská výška (m.n.m.)	Sběratel	Taxon	N FCM	Průměrná velikost genomu ± s.o.	Variance [%]	<i>trnL-trnF</i>	Číslo vzorku <i>rp32-trnL</i>	GBSSI/ počet klonů	(Haploskupiny chloroplast <i>trnL-F</i> oba
Ukrajina (Ukraine, UA)												
UA01	Svidovec, Bliznica	N48 12 22.9, E24 15 00.5	1674	PR	alp 2x	2	5,477 ± 0,015	0,4	110			A
UA02	Svidovec, Kvasy	N48 11 28.0 E24 15 27.2	1323	PR	alp 2x	1	5,466 ± 0,051	-				
UA03	Gorgany, Pogar	N48 34 11.3, E24 05 30.5	1602	PR	alp 2x	2	5,475 ± 0,020	0,525	111			A
UA04	Gorgany, Sivulya	N48 32 57.1, E24 07 10.1	1831	PR	alp 2x	2	5,503 ± 0,028	0,71125	113			A
UA05	Gorgany, Mala Sivulya	N48 32 22.9, E24 07 42.2	1597	PR	alp 2x	2	5,481 ± 0,067	1,74847	114			A
UA06	Gorgany, Taupisz	N48 29 21.1, E24 07 40.3	1454	PR	alp 2x	1	5,401 ± 0,023	-	116	116		A
UA07	Gorgany, Bystrica	N48 27 49.2, E24 11 03.7	1257	PR	alp 2x	2	5,504 ± 0,011	0,29114	117		117/8	A
Velká Británie (Great Britain, GB)												
GB01	Scotland, Luine Bheilim	N57 3 1.59, W5 30 50.79	936	HC	odo 4x	5	12,455 ± 0,141	2,9	141	141	141/16	A
GB02	Scotland, Glenelg, Belvraid	N57 11 50.2, W5 36 39.8	140	HC	odo 4x	4	12,634 ± 0,069	1,3	134,138			A
GB03	Scotland, Knoydart, Bamisdale	N57 4 22.90, W5 30 45.22	512	HC	odo 4x	2	12,740 ± 0,037	0,4	139			A

3.2. Stanovení velikosti genomu

3.2.1. Průtoková cytometrie

Pro měření velikosti genomu všech druhů rodu *Anthoxanthum* byl používán průtokový cytometr Partec CyFlow (laser s excitační vlnovou délkou 532 nm jako světelný zdroj).

Izolace jader byla prováděna pomocí dvoustupňové metodiky dle Otto (Otto 1990, Doležel *et al.* 2007b), která byla pro účely stanovení velikosti genomu tohoto rodu úspěšně aplikována (Filipová & Krahulec 2006).

V plastové petriho misce obsahující 0,5 ml chlazeného pufru Otto I (0,1 M monohydrát kyseliny citrónové, 0,5% Tween 20) bylo žiletkou rozsekáno přibližně 0,5 cm² listu *Anthoxanthum* společně s odpovídajícím množstvím interního standardu (*Pisum sativum* cv. Ctirad; 2C = 8,76 pg; Greilhuber *et al.* 2007). Suspenze byla přefiltrována přes nylonovou síť s velikostí oka 42 μm do kyvety. Následně byl přidán 1 ml barvicího roztoku obsahujícího pufr Otto II (0,4 M Na₂HPO₄·12H₂O), propidium jodid jako fluorescenční barvivo (50 μg/μl; Sigma), RNázu IIA (50 μg/μl; Sigma) a β-mercaptoethanol (2 μl/ml; Sigma). Po ca 5 minutách barvení při pokojové teplotě byl vzorek analyzován na průtokovém cytometru CyFlow, kde byla zaznamenána fluorescence 5 000 jader.

U většiny vzorků byl stejný postup zopakován ještě 2x, aby byla eliminována případná denní fluktuace v přesnosti měření. Hodnoty všech měření byly zprůměrovány a tato hodnota byla použita pro výpočet průměrné velikosti genomu populace (viz tab. 7).

3.2.2. Statistické zpracování dat

Histogramy byly analyzovány v programu Partec FloMax 2.4b. Statistické zpracování dat bylo provedeno v programu PAST (grafické znázornění pomocí box-plotů) a SAS 9.1 (procedura CORR - korelace velikosti genomu s geografickou polohou, procedura GLM – porovnání 1Cx hodnot všech zahrnutých taxonů pomocí modelu LMEANS a Tukey-Kramer metody párového srovnání).

3.3. Molekulární metody

3.3.1. Izolace DNA a PCR reakce

Vzorky byly zpracovávány v laboratoři DNA Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Přibližně 0,5 g vysušeného rostlinného materiálu ze silikagelu bylo použito k extrakci DNA metodou CTAB – Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (Doyle & Doyle 1987) či pomocí DNeasy Plant Mini Kitu (Quiagen Inc., Valencia, CA, USA).

Následně byla změřena koncentrace DNA na spektrofotometru BiOPhotometer (Eppendorf) či na Nanodropu (program ND 1000) a naředěna deionizovanou vodou na koncentraci 5 ng/μl.

Takto naředěná DNA byla následně použita k PCR amplifikaci studovaných úseků. Všechny reakce byly prováděny v objemu 20 μl v cyklerech Mastercycler ep gradient S thermal (Eppendorf, Hamburg, Německo) či Touchgene gradientový cykler (Techne, Cambridge, Velká Británie). Podmínky PCR jsou uvedeny v tabulce 3.

V roce 2006 bylo vyzkoušeno 6 v laboratoři dostupných primerů na amplifikaci 3 nekódujících *cpDNA* úseků: *trnL^(UAA)-trnF^(GAA)* (primery *trnL-c* a *trnF-f*; Taberlet *et al.* 1991), *trnG-trnG* (primery *trnG2G* a *TrnG*; Shaw *et al.* 2005) a *trnH-psbA* (primery *trnH* a *psbA*; Sang *et al.* 2007, Tate & Simpson 2003). Kvůli nejvyšší variabilitě z výše zmíněných úseků byl pro další studium zvolen úsek *trnL-trnF*, pomocí něhož byly analyzovány všechny rostliny určené pro molekulární analýzy (tab. 2).

V roce 2009 bylo vyzkoušeno dalších 8 párů standardizovaných chloroplastových primerů sloužících k amplifikaci nekódujících *cpDNA* úseků (*atpI-atpH*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA*, *rpl32-trnL*, *trnQ-5'rps16*, *ndhF-rpl32*, *3'trnV-ndhC*, *3'rps16-5'trnK*) (Shaw *et al.* 2005, 2007), z nichž byl pro další analýzy zvolen nejvariabilnější úsek *rpl32-trnL^(UAG)*. Byl použit na analýzy 50 (podle druhu rostlin a polohy lokality) vybraných vzorků. Teplotní profily PCR studovaných úseků jsou v tabulkách 4 a 5.

Jaderný gen GBSSI byl amplifikován pomocí primerů *F-for* a *M-bac* (Mason-Gamer *et al.* 1998) za teplotních profilů uvedených v tomtéž článku.

Pro PCR reakce byly používány polymerázy *Jump Star Red Taq DNA Polymerase* (Sigma), *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* (Applied Biosystems), *Immolase DNA Polymerase* (Bioline), *Sahara DNA Polymerase* (Bioline), *MyTaq HS DNA Polymerase* (Bioline) a k nim příslušné PCR pufrы. Sekvence primerů používaných pro PCR jsou v tabulce 6.

Tabulka 3. Reakční podmínky PCR. Pro všechny studované úseky byly použity všechny uvedené polymerázy.

Složka směsi pro PCR	Objem [μl] na 1 reakci pro uvedené polymerázy				
	Jump Star Red Taq	Gold	MyTaq	Sahara	Immolase
ddH ₂ O	15,6	13,9	13,8	13,6	15,8
10 × pufr	2	2	4	2	2,1
MgCl ₂ (1,5mM)	-	2	-	2	1,2
dNTP (10 mM)	0,4	0,4	-	0,4	0,4
Forward primer (25 pmol/μl)	0,25	0,25	0,5	0,25	0,2
Reverse primer (25 pmol/μl)	0,25	0,25	0,5	0,25	0,2
Taq Polymeráza (1U/μl)	0,5	0,2	0,2	0,5	0,1
DNA (5 ng/μl)	1	1	1	1	1
celkem do reakce	19 μl směsi + 1 μl DNA				20 μl + 1 μl

Pozn. Jsou uvedeny pracovní koncentrace jednotlivých složek. Pokud koncentrace není uvedena, daná složka byla obsahem příslušného pufru.

Tabulka 4. Teplotní profil PCR pro amplifikaci úseku *trnL-trnF* cpDNA.

Krok číslo	Teplota v °C	Čas
1	94	1 minuta
2	94	50 sekund
3	52,5	50 sekund
4	72	90 sekund
5	opakuj 34 × krok 2-4	
6	72	10 minut
7	10	∞

Tabulka 5. Teplotní profil PCR pro amplifikaci úseku *rpl32-trnL* cpDNA.

Krok číslo	Teplota v °C	Čas
1	80	5 minut
2	94	30 sekund
3	55	1 minuta
4	72	2 minuty
5	opakuj 35 × krok 2-4	
6	72	10 minut
7	4	∞

Tabulka 6. Seznam primerů používaných pro PCR amplifikaci i sekvenaci uvedených cpDNA úseků a genu GBSSI nrDNA.

Úsek DNA	Jméno	Sekvence primeru (5'-3')	Citace
<i>trnL</i> ^(UAA) - <i>trnF</i> ^(GAA)	<i>trnL-c</i>	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet <i>et al.</i> 1991
	<i>trnF-f</i>	ATTTGAACTGGTGACACGAG	
<i>rpl32-trnL</i> ^(UAG)	<i>trnL</i> ^(UAG)	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	Shaw <i>et al.</i> 2007
	<i>rpl32-F</i>	CAGTTCCAAAAAACGTACTTC	
GBSSI	<i>GBSSI F-for</i>	TGCGAGCTCGACAACATCATGCG	Mason-Gamer <i>et al.</i> 1998
	<i>GBSSI M-bac</i>	GGCGAGCGGCGGATCCCTCGCC	

Po skončené PCR byly 2-4 μl amplifikovaného produktu naneseny na 1% agarosový gel v TAE (Tris-Acetate-EDTA) pufru (Sambrook *et al.* 1989). Do první jamky na gelu bylo naneseno 1,5 μl velikostního standardu O'GeneRulerTM 100 bp Ladder Plus (Fermentas, Maryland, USA) pro porovnání délky naamplifikovaného fragmentu. DNA obarvená ethidium bromidem byla vizualizovaná UV světlem a snímána kamerou Kodak Gel Logic 100. Viditelnost proužků byla kontrolována pomocí Kodak 1D Image Analysis Software.

PCR produkt byl přečištěn pomocí Jetquick PCR Purification Spin Kit (Genomed, Löhne, Německo) či Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen, Valencie, USA).

3.3.2. Klonování a sekvenování DNA

Přečištěné PCR produkty chloroplastových úseků bylo možno rovnou sekvenovat, u genu GBSSI byl zjištěn u přímých sekvencí značný intraindividuální polymorfismus, proto byly produkty klonovány pomocí pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, USA). Ligace, transformace i kultivace na pevném agarovém médiu byly prováděny podle instrukcí dodavatele, s výjimkou toho, že u ligace a transformace byl použit poloviční objem reakce.

Inzerty byly z bakterií reamplifikovány PCR se stejnými primery (*F-for* a *M-bac*) a za stejných podmínek, jako při původní amplifikaci (Mason-Gamer 1998). Jako templát byly použity pozitivní (bílé) kolonie, které byly přeneseny do zkumavek s reakční směsí pomocí párátka (tab. 3). Pro diploidní rostliny bylo sekvenováno 8-16 klonů, pro tetraploidní 16 klonů. Pokud bylo z důvodu špatných sekvencí nutné opakování, byl počet individuální.

PCR produkty byly přečištěny pomocí výše zmíněných kitů, případně byly purifikovány sekvenační společností Macrogen (Soul, Jižní Korea).

Chloroplastové úseky i naklonovaný GBSSI gen byly posílány na sekvenování do Macrogenu, nebo do sekvenační laboratoře biologické sekce PŘF UK. Sekvenační primery byly totožné, jako při amplifikaci (tab. 6), úseky byly vždy sekvenovány z obou stran.

3.3.3. Analýza dat

3.3.3.1. Analýza sekvencí DNA a tvorba alignmentů

Chromatogramy sekvencí byly kontrolovány a editovány v programu Chromas Lite (Technelysium, Ltd., Australia). Editované dvojice sekvencí získané sekvenací téhož PCR produktu s použitím obou PCR primerů byli spojeny ručně v textovém editoru. Tyto sekvence byly alignovány v programu Clustal X (Larkin *et al.* 2007), s použitím výchozích parametrů a editovány ručně v programu BioEdit (Hall 1991).

U obou chloroplastových úseků byly přímo alignovány sekvence všech studovaných jedinců. Pro gen GBSSI byly konstruovány nejprve alignmenty klonů získaných ze stejného jedince. Jedinečné bodové mutace charakteristické pro jednotlivé klony, které sdílely zbytek svého polymorfismu alespoň se sekvencí jednoho dalšího klonu, byly považovány za chyby polymerázy a upraveny nahrazením za většinovou bázi. Unikátní sekvence identifikované pouze pro jediný z klonů byly ponechány bez změn. Soubory identických klonů byly redukovány tak, že byl každý typ sekvence zastoupen pouze jedním klonem. Dále byly identifikovány klony s jedinečnými kombinacemi mutací.

Ty klony, které ve své sekvenci kombinovaly mutace těchto jedinečných sekvencí, byly z alignemtu odstraněny jako možné rekombinantní typy. Z takto zjednodušených alignmentů jedinců byl vytvořen výsledný alignment se zastoupením všech vzorků.

3.3.3.2. Fylogenetické analýzy

Gen GBSSI byl analyzován pro dva samostatné soubory dat. Cílem první analýzy bylo zjistit fylogenetické vztahy na úrovni diploidních taxonů, tudíž do ní byli zahrnuti pouze všichni diploidní jedinci. Druhá analýza, do které byli zahrnuti kromě diploidů i tetraploidi, byla zaměřená na ověření hypotéz o hybridním původu tetraploidů a identifikaci jejich rodičovských linií. Po sérii předběžných analýz bylo zjištěno, že dva tetraploidní vzorky z Korsiky (konkrétně rostliny 68 a 101) měly výrazně negativní vliv na topologii a podporu hlavních skupin identifikovaných na základě analýz diploidů (viz výsledky). Proto byla provedena ještě třetí série analýz, z kterých byly tyto vzorky vyloučeny.

Do analýzy chloroplastového úseku *trnL-trnF* bylo zahrnuto 100 jedinců. Kombinovaná analýza úseků *trnL-trnF* a *rpl32-trnL* byla provedena jenom pro redukovaný soubor čítající 50 jedinců.

Protože všechny soubory dat obsahovaly větší počet insercí / delecí delších než 1 bp, byly tyto indely kódovány v programu SeqState (Müller 2005) s použitím algoritmu pro jednoduché kódování insercí (simple gap coding method; Simmons & Ochoterena 2000) a zahrnuty do analýzy jako dodatečné znaky.

Fylogenetické stromy byly pro všechny soubory dat konstruovány metodou maximální parsimonie a bayesovskou analýzou.

K parsimonické analýze byl použit program PAUP* (Swofford 2002). Fylogenetické stromy byly porovnávány pomocí heuristického hledání s využitím branch swapping algoritmu TBR (Tree Bisection Reconnection). Jednotlivé sekvence byly do analýzy přidávány náhodně v deseti opakováních. Pro ověření robustnosti výsledků analýz byla vypočtena podpora jednotlivých větví pomocí metody bootstrap s 1000 opakováními.

Pro účely bayesovské analýzy byl nejprve pro každý soubor dat určen vhodný model nukleotidových substitucí v programu Mr.Modeltest (Nylander 2004). Jako nejvhodnější modely byly vybrány GTR+I+G pro všechny tři analyzované GBSSI soubory dat, pro analýzu *trnL-trnF* úseku *cpDNA* model F81, pro kombinovanou analýzu obou *cpDNA* úseků pak model GTR. Bayesovské analýzy byly provedeny v programu Mr.Bayes

(Ronquist & Huelsenbeck 2003). Parametry analýz a apriorní pravděpodobnosti byly nastaveny tak, aby odpovídaly základním parametrům vybraných modelů. Pro mcmc algoritmus porovnávání stromů byla použita výchozí nastavení, s výjimkou počtu generací (délky trvání běhu analýzy). Tato nastavení se u jednotlivých souborů dat lišila: u GBSSI analýzy diploidů, analýzy úseku *trnL-trnF cpDNA* i kombinované analýzy obou *cpDNA* úseků bylo použito 3 000 000 generací; u GBSSI analýz di- a tetraploidů byl počet generací 6 000 000. Po skončení analýz byly sumarizovány jejich výsledky, data z prvních 25 % generací byla ze sumarizace vyloučena. Na základě zbylých údajů byl konstruován konsenzuální fylogenetický strom a vyčísleny posteriorní pravděpodobnosti jeho jednotlivých větví.

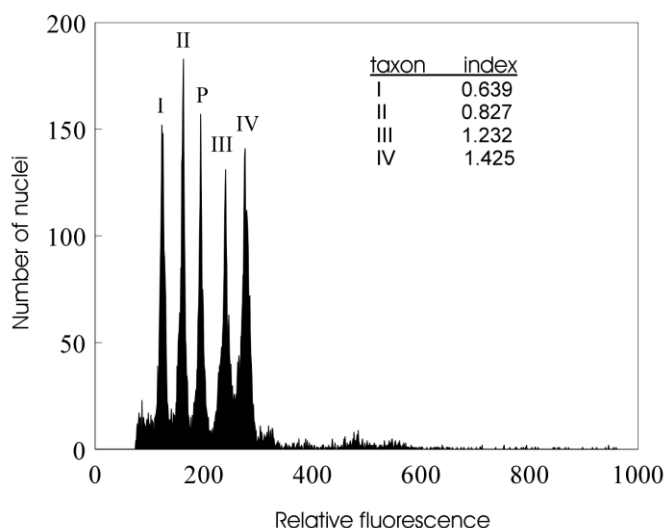
Mapky byly vytvořeny v programu DMAP 7.2e, jehož výstupy byly dále graficky upraveny.

4. Výsledky

4.1. Velikost genomu

Cytometrické analýze bylo podrobena 359 jedinců ze 138 evropských populací (tab. 2).

Ukázalo se, že velikost genomu těžko rozpoznatelné druhy po morfologické stránce (*A. odoratum*, *A. alpinum* 2x a 4x, mediteránní diploid) dobře odlišuje (obr. 3 a 4, tab. 7).

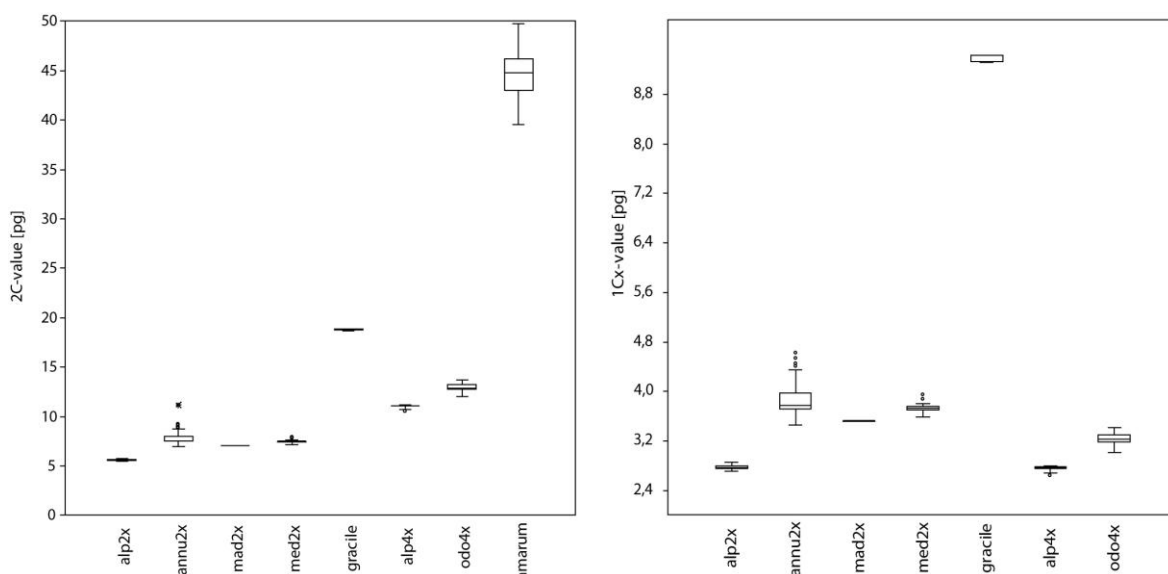


Obrázek 3. Výstup z průtokového cytometru při simultánní analýze *A. alpinum* 2x (I), mediteránního diploida (II), *Pisum sativum* jako interního standardu (P), *A. alpinum* 4x (III) a *A. odoratum* 4x (IV). Hodnota indexu udává poměry relativní fluorescence mezi taxony a standardem. Vzorky byly sekány, barveny a analyzovány najednou, s využitím dvoukrokové metodiky dle Otto, fluorescenční barvy DAPI a pomocí cytometru PA II (Partec).

Tabulka 7. Absolutní velikosti genomu pro jednotlivé druhy (Průměr - průměrná velikost genomu (2C hodnota), s. d. - směrodatná odchylka, N - počet analyzovaných jedinců.)

taxon	průměr [pg]	s. d.	min	max	variance [%]	N	ploidie	1Cx-hodnota
<i>A. alpinum</i> (2x)	5.528	0.072	5.401	5.692	5.4	68	2	2.764
<i>A. alpinum</i> (4x)	10.976	0.169	10.524	11.151	6.0	15	4	2.744
<i>A. aristatum</i> / <i>ovatum</i> (2x)	7.667	0.498	6.893	9.217	33.7	71	2	3.834
<i>A. gracile</i> (2x)	18.747	0.161	18.633	18.860	1.2	2	2	9.373
<i>A. maderense</i> (2x)	7.028	0.029	7.002	7.059	0.8	3	2	3.514
mediteránní diploid (2x)	7.431	0.119	7.161	7.871	9.9	76	2	3.715
<i>A. odoratum</i> (4x)	12.902	0.349	12.010	13.631	13.5	99	4	3.225
<i>A. amarum</i> (?x)	44.487	2.153	39.513	49.740	25.9	25	?	?
						359		

Pozn. U druhu *A. amarum* není známa přesná ploidie, nedá se tedy spočítat 1 Cx hodnota.



Obrázek 4. Porovnání 2C-hodnot (vlevo) a 1C-hodnot (vpravo) jednotlivých druhů. Kvůli neznámé ploidii není uvedena 1C-hodnota *A. amarum*. (alp2x – *A. alpinum* 2x, annu2x – *A. aristatum* / *A. ovatum* 2x, mad2x – *A. maderense*, med2x – mediteránní diploid, alp4x – *A. alpinum* 4x, odo4x – *A. odoratum*.)

4.1.1. Autopolyploidní vznik *A. alpinum* 4x a allopolyploidní vznik *A. odoratum*

Rozdíly ve velikosti genomu (1Cx hodnoty) jednotlivých taxonů byly otestovány metodou obecného lineárního modelu (General linear model, GLM) v programu SAS. Tato statistická metoda je robustní k nestejným velikostem jednotlivých skupin. Jako hranice rozdílnosti byla zvolena hladina $\alpha = 5\%$ (tab. 8).

Tabulka 8. Porovnání 1Cx hodnot všech zahrnutých taxonů GLM procedurou v SAS 9.1 pomocí modelu LMEANS a Tukey-Kramer metody párového srovnání. Tučně jsou zvýrazněny nesignifikantní hodnoty. (alp2x – *A. alpinum* 2x, alp4x – *A. alpinum* 4x, annu2x – *A. aristatum* / *A. ovatum* 2x, mad2x – *A. maderense*, med2x – mediteránní diploid, odo4x – *A. odoratum*.)

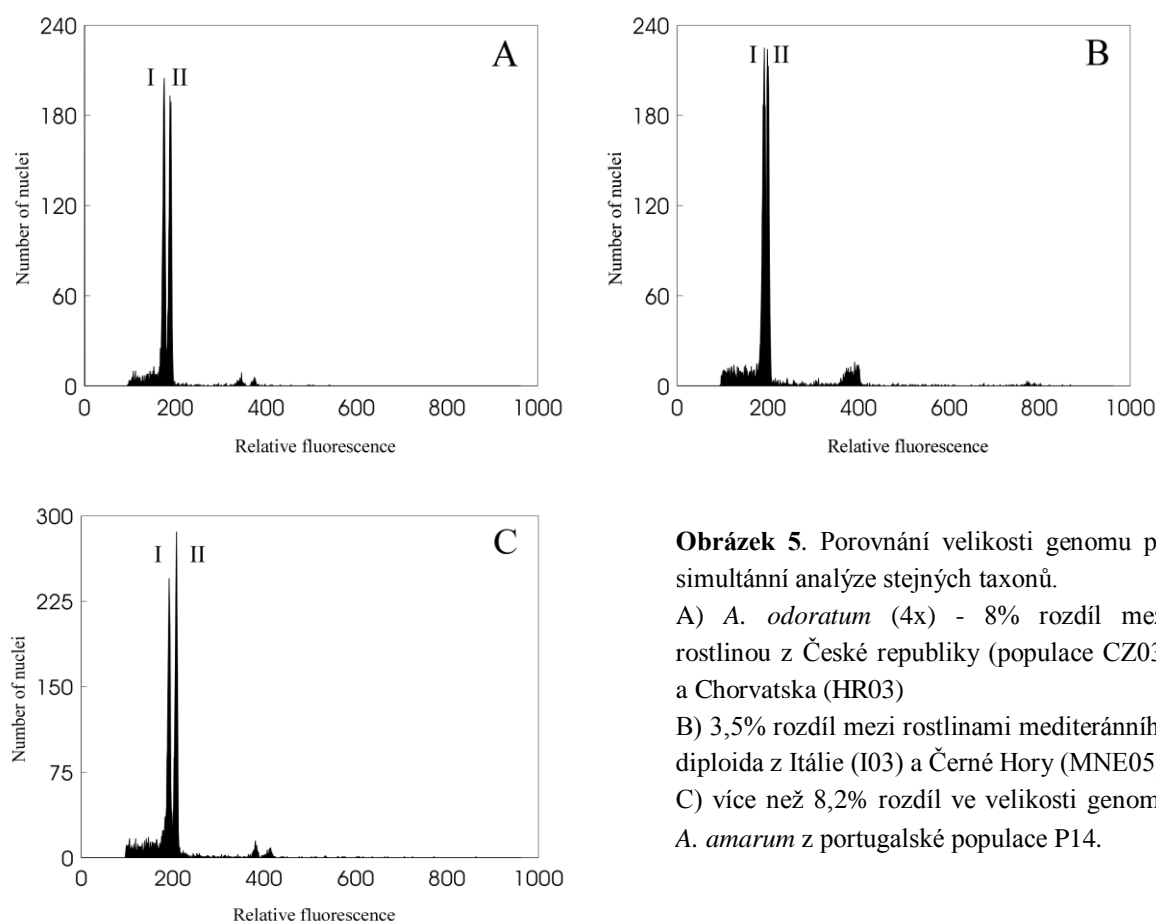
druh	odo4x	med2x	mad2x	gracile	annu2x	alp4x
alp2x	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.998
alp4x	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
annu2x	<0.001	<0.001	0.001	<0.001		
gracile	<0.001	<0.001	<0.001			
mad2x	0.003	0.115				
med2x	<0.001					

Nesignifikantní vyšly hodnoty u druhů *A. alpinum* 2x a *A. alpinum* 4x, kde se 1C hodnota téměř neliší. Tato skutečnost naznačuje pravděpodobný autopolyploidní způsob vzniku tetraploidního *A. alpinum*, neboť 2C-hodnota tohoto taxonu je téměř přesný dvojnásobek taxonu diploidního (tab. 7, obr. 4).

Druhá nesignifikantní hodnota vyšla při porovnání druhů *A. maderense* a mediteránního diploida. Tyto druhy společně s komplexem *A. aristatum / ovatum* se též na základě cytometrických analýz a v souladu s literárními údaji dají považovat za jednoho z rodičovských taxonů *A. odoratum*, budeme-li uvažovat vysoce pravděpodobný allopolyploidní vznik z dosud žijících rodičů. 2C hodnota mediteránního diploida ($7,431 \pm 0,119$ pg), *A. maderense* ($7,028 \pm 0,029$ pg), ale i komplexu *A. aristatum / ovatum* ($7,667 \pm 0,498$ pg) v součtu s 2C hodnotou *A. alpinum* (druhý uvažovaný rodič, $2C = 5,528 \pm 0,072$ pg), dává výsledek 12,959 pg, resp. 12,556 pg, resp. 13,195 pg. Tato čísla dobře korespondují s naměřenými 2C hodnotami *A. odoratum*, které činí rozmezí 12,010 pg a 13,631 pg.

4.1.2. Variabilita velikosti genomu

U většiny taxonů byla zjištěná poměrně velká vnitrodruhová (vnitrocytotypová) variabilita ve velikosti genomu, která byla opakovaně dokázána simultánní analýzou (obr. 5). Extrémních hodnot dosahuje vnitrodruhová variabilita komplexu *A. aristatum / ovatum* (34%) a *A. amarum* (26%) (obr. 5, tab. 7).



Obrázek 5. Porovnání velikosti genomu při simultánní analýze stejných taxonů.

A) *A. odoratum* (4x) - 8% rozdíl mezi rostlinou z České republiky (populace CZ03) a Chorvatska (HR03)

B) 3,5% rozdíl mezi rostlinami mediteránního diploida z Itálie (I03) a Černé Hory (MNE05)

C) více než 8,2% rozdíl ve velikosti genomu *A. amarum* z portugalské populace P14.

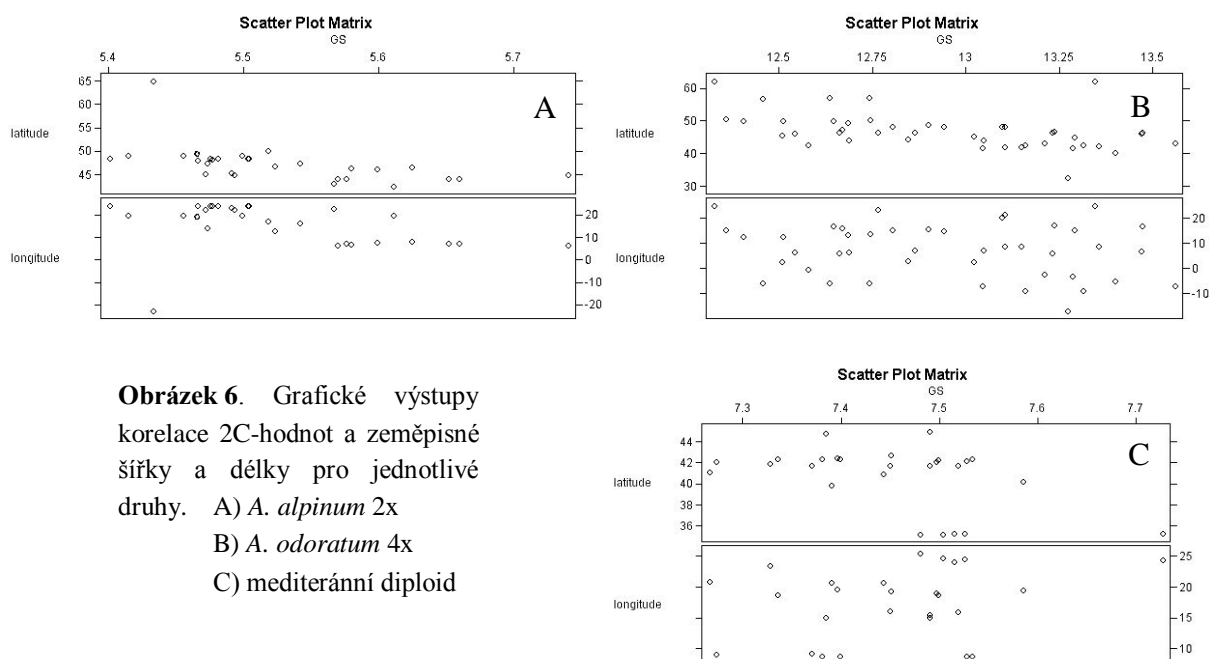
4.1.3. Korelace velikosti genomu s geografickou polohou

Pro druhy *A. alpinum* (2x), *A. odoratum* a mediteránního diploida byla v programu SAS 9.1 provedena procedura CORR - korelace velikosti genomu se zeměpisnou šířkou a délkou. U ostatních druhů by byly výsledné hodnoty korelačních koeficientů zatíženy omezeným areálem výskytu druhu (*A. alpinum* 4x, *A. maderense*, *A. amarum*) či omezeným sběrem dat (*A. aristatum* / *ovatum*, *A. gracile*).

Signifikantně vyšly korelační koeficienty u *A. alpinum* (2x) pro zeměpisnou šířku i délku a u *A. odoratum* pro zeměpisnou šířku, u jiných parametrů jsou hodnoty nesignifikantní (tab. 9, obr. 6).

Tabulka 9. Korelace 2C-hodnot jednotlivých druhů se zeměpisnou šířkou a délkou. Uvedeny Spearmanovy koeficienty a jejich *p* hodnoty v závorkách. Tučně jsou zvýrazněny signifikantní hodnoty. N – počet analyzovaných jedinců.

taxon	N	zeměpisná šířka	zeměpisná délka
<i>A. alpinum</i> 2x	30	-0.718 (<0.0001)	-0.496 (0.0053)
<i>A. odoratum</i> 4x	43	-0.549 (0.0001)	-0.140 (0.3703)
Mediteránní diploid 2x	26	-0.286 (0.1564)	0.139 (0.4977)



4.2. Molekulární analýzy

Finální soubor pro sekvenování úseku *trnL-trnF* cpDNA zahrnuje 100 rostlin z 88 populací, pro úsek *rpl32-trnL* bylo použito 50 jedinců (1 z každé populace) a pro část genu GBSSI 76 klonů 31 rostlin z 26 populací (reprezentujících 284 klonů s finálním počtem 1-3 vzájemně diferencovaných klonů na jedince)(tab. 2). Charakteristiky alignmentů, vstupních parametrů parsimonických analýz i některé výsledky jsou uvedeny v tabulce 10, finální alignmenty v příloze 2.

Tabulka 10. Charakteristika použitých alignmentů a parsimonických analýz.
(CI – konzistenční index, RI – retenční index)

Soubor dat	Délka alignmentu	Počet indelů	Variabilní místa	Parsimonicky informativní místa	Počet nejvíce parsimonických stromů	Délka nejvíce parsimonických stromů	CI	RI
<i>trnL-trnF</i>	971 bp	8	56	48	6	59	0,966	0,995
<i>trnL-trnF</i> <i>+rpl32-trnL</i>	1817 bp	21	114	100	8	123	0,919	0,98
GBSSI 2x	1428 bp	71	259	210	72	417	0,681	0,861
GBSSI 2x+4x	1295 bp	62	339	265	300	598	0,645	0,872

Pro sekvenaci nekódujících úseků cpDNA byly použity vzorky z populací všech evropských druhů (*A. odoratum*, *A. alpinum* 2x a 4x, *A. gracile*, komplex *A. aristatum/ovatum*, *A. maderense*, *A. amarum* a mediteránní diploid) kromě *A. pauciflorum*, které se nepodařilo v terénu získat. Pro sekvenaci genu GBSSI nebyly zařazeny kvůli vysoké ploidii ani rostliny *A. amarum*.

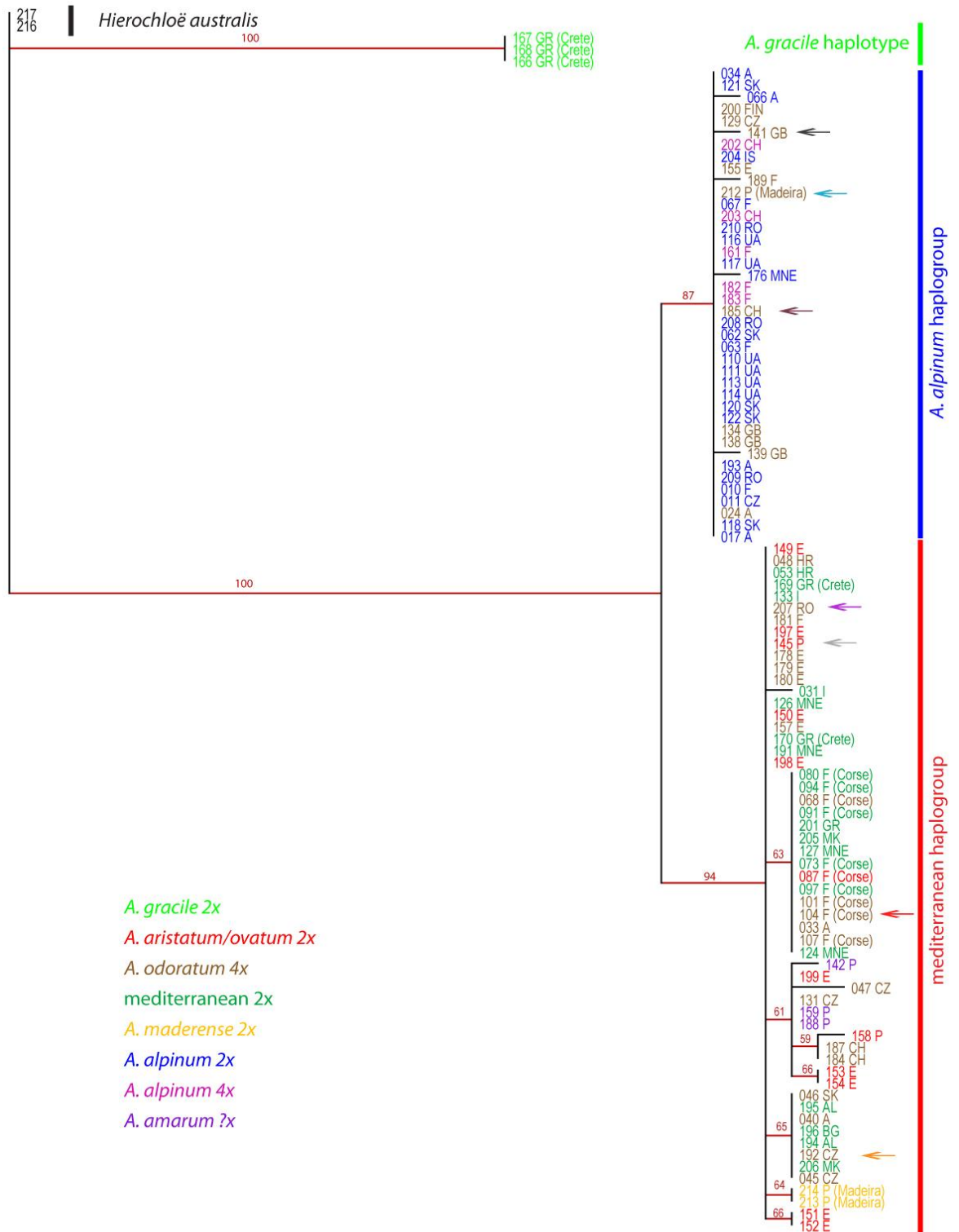
Jako outgroup byla použita *Hierochloë australis* z Holubovských hadců u Křemže (vzorky 216 a 217).

Analýzou *trnL-trnF* úseku *cpDNA* u všech zahrnutých vzorků byly zjištěny tři odlišné haploskupiny (obr. 7, tab. 2).

Zcela samostatnou větev („*clade*“) podpořenou 100% shodou (100/1.0 – hodnota bootstrapu parsimonické analýzy / hodnota posteriorní pravděpodobnosti bayesovské analýzy) tvoří rostliny druhu *A. gracile* z Kréty. Další dvě větve v parsimonickém stromě tvoří rostliny s haplotypem od *A. alpinum* („*A*“ haploskupina; 87/0.97) a od mediteránního diploida („*M*“ haploskupina; 94/1.0).

Do větve s „*A*“ haploskupinou spadají všechny rostliny *A. alpinum* 2x a *A. alpinum* 4x. Mimo to též rostliny *A. odoratum* z České republiky (CZ04), Finska (FIN01), Francie (F25), Madeiry (P03), Rakouska (A06), Španělska (E10), Švýcarska (CH07) a Velké Británie (GB01, GB02, GB03).

Ve druhé větvi (haploskupina „*M*“) se vyskytují všechny rostliny mediteránního diploida, *A. amarum*, *A. maderense* a komplexu *A. aristatum* / *ovatum*. *A. odoratum* zde zastupují rostliny z České republiky (CZ01, CZ02, CZ03, CZ06), Francie (F24), Korsiky (F19, F20, F21), Chorvatska (HR03), Rakouska (A03, A05), Rumunska (RO04), Slovenska (SK05), Španělka (E11, E12) a Švýcarska (CH06, CH08).



1

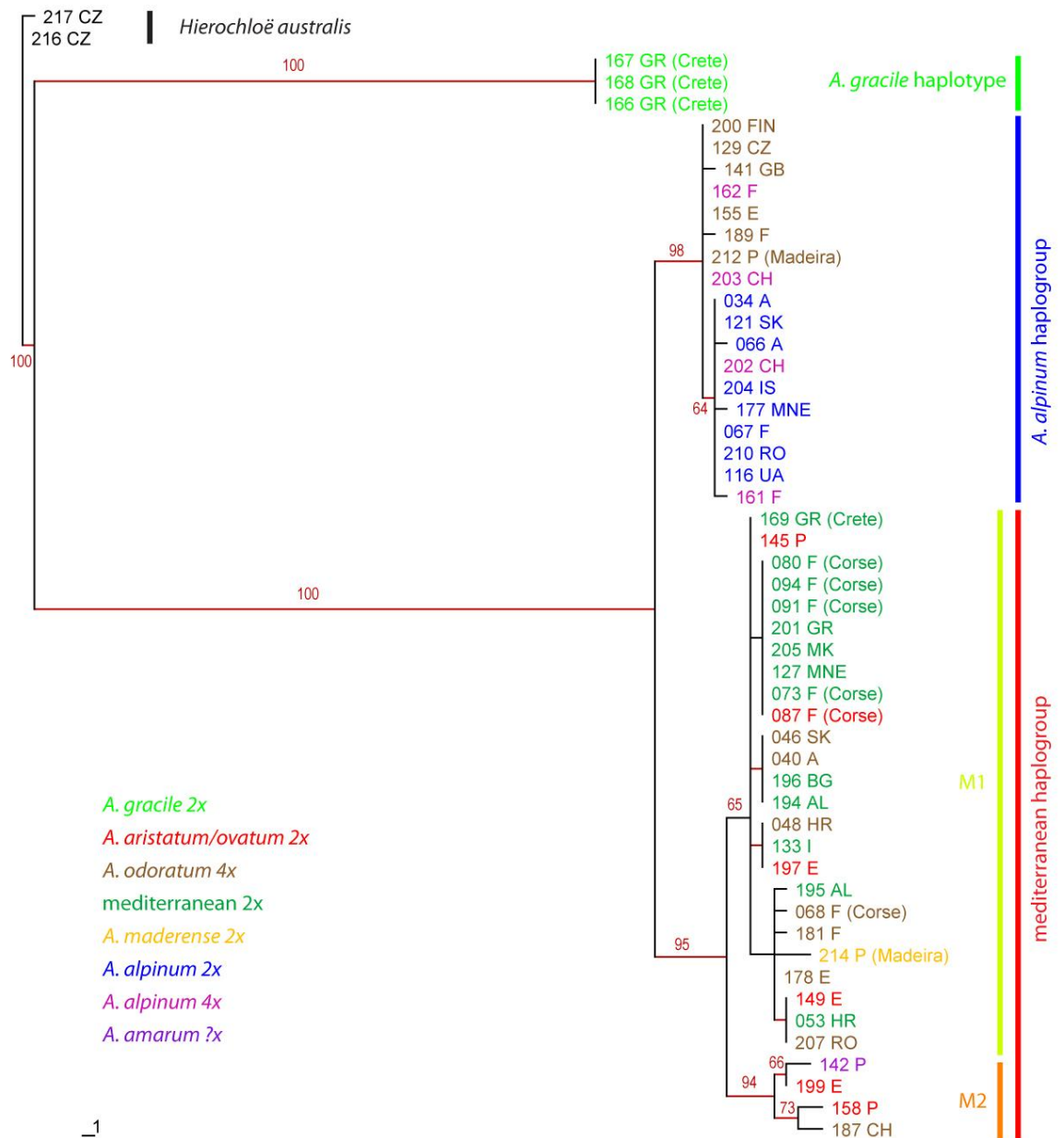
Obrázek 7. Parsimonický strom založený na sekvenování úseku *trnL-trnF* cpDNA.

Zobrazeny jsou bootstrapové hodnoty nad 50 %. Větve stromu, které jsou zvýrazněny červeně, mají bayesovskou podporu vyšší než 0.9. Čísla vzorků a zkratky států odpovídají údajům v tabulce 2. Různobarevné šipky poukazují na haplotypy těch rostlin, které jsou komentovány v textu u GBSSI stromu. *A. alpinum* haplogroup – haploskupina „A“, mediteranean haplogroup – haploskupina „M“.

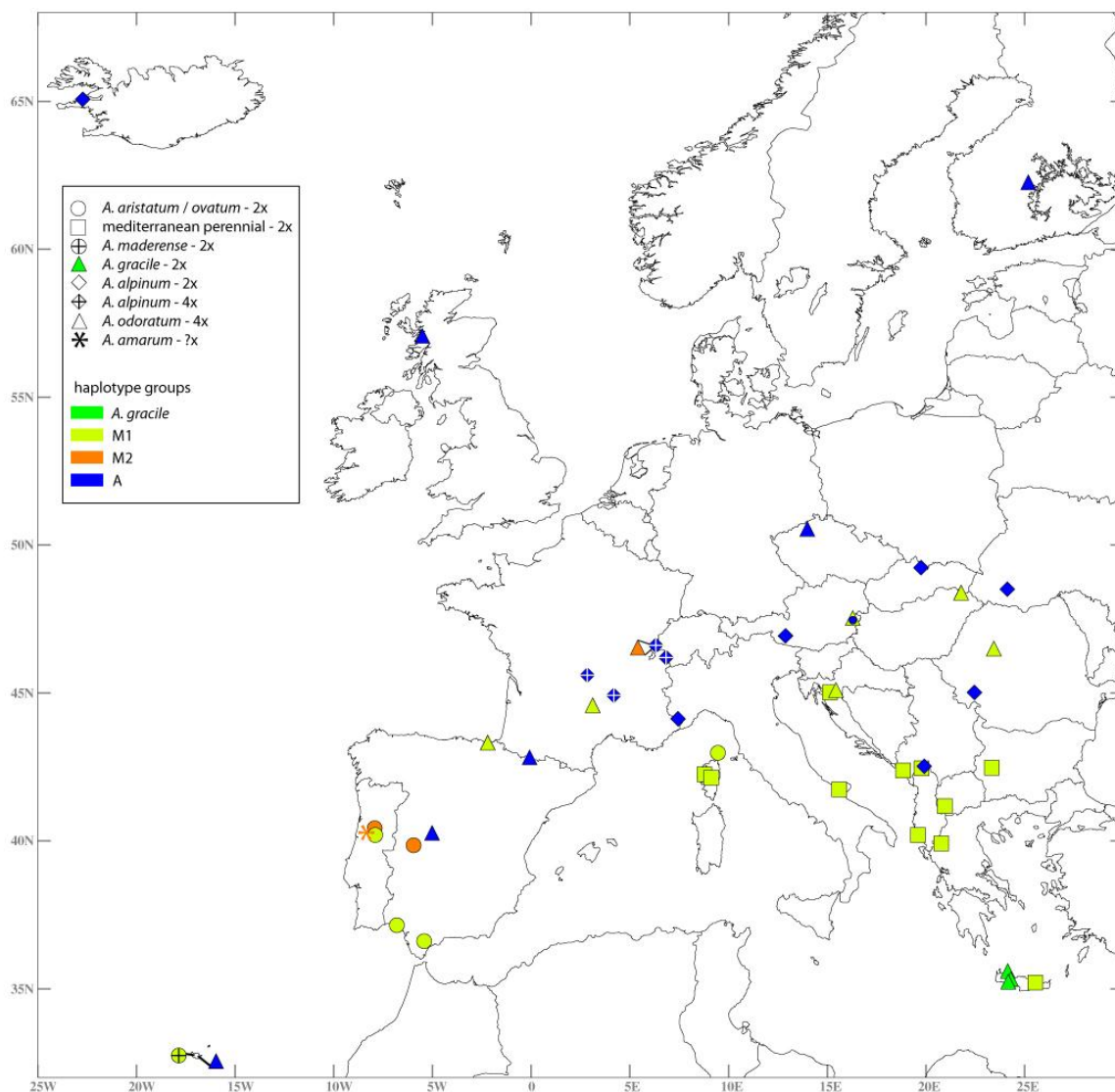
Po společné analýze sekvencí úseků *trnL-trnF* a *rpl32-trnL cpDNA* (obr. 8) pro výběr 50 rostlin se ukázalo, že je v rámci haploskupiny „M“ (95/1.0) vnitřní struktura dělicí haploskupinu na 2 subtypy. Zatímco většinový subtyp „M1“ má pouze slabou podporu (65/0.58), druhý subtyp („M2“) má naopak velmi silnou podporu (94/1.0), a proto nemůže být opominut. V této „M2“ skupině jsou zahrnuty některé rostliny komplexu *A. aristatum / ovatum* z Portugalska (P01) a Španělka (E09), portugalské *A. amarum* (P14) a překvapivě *A. odoratum* ze Švýcarska (CH08). Ostatní uspořádání stromu zůstalo stejné, jako při analýze samotného úseku *trnL-trnF*. Podpora větve *A. gracile* je absolutní (100/1.0), rovněž větev haploskupiny „A“ má velmi silnou podporu (98/1.0).

Zajímavosti z této analýzy (obr. 9):

- na Madeiře se vyskytuje *A. maderense* (P02) v haploskupině „M“ a *A. odoratum* (P03) v haploskupině „A“ (pravděpodobně z *A. alpinum*)
- ve Švýcarsku jsou velmi blízko od sebe lokality s *A. alpinum* 4x (CH04, CH05), které spadá do haploskupiny „A“ a *A. odoratum* (CH08), které spadá do haploskupiny „M2“
- ze smíšené populace *A. alpinum* 2x a *A. odoratum* v Rakousku (A03) patří *A. alpinum* do haploskupiny „A“, ale *A. odoratum* do haploskupiny „M1“.

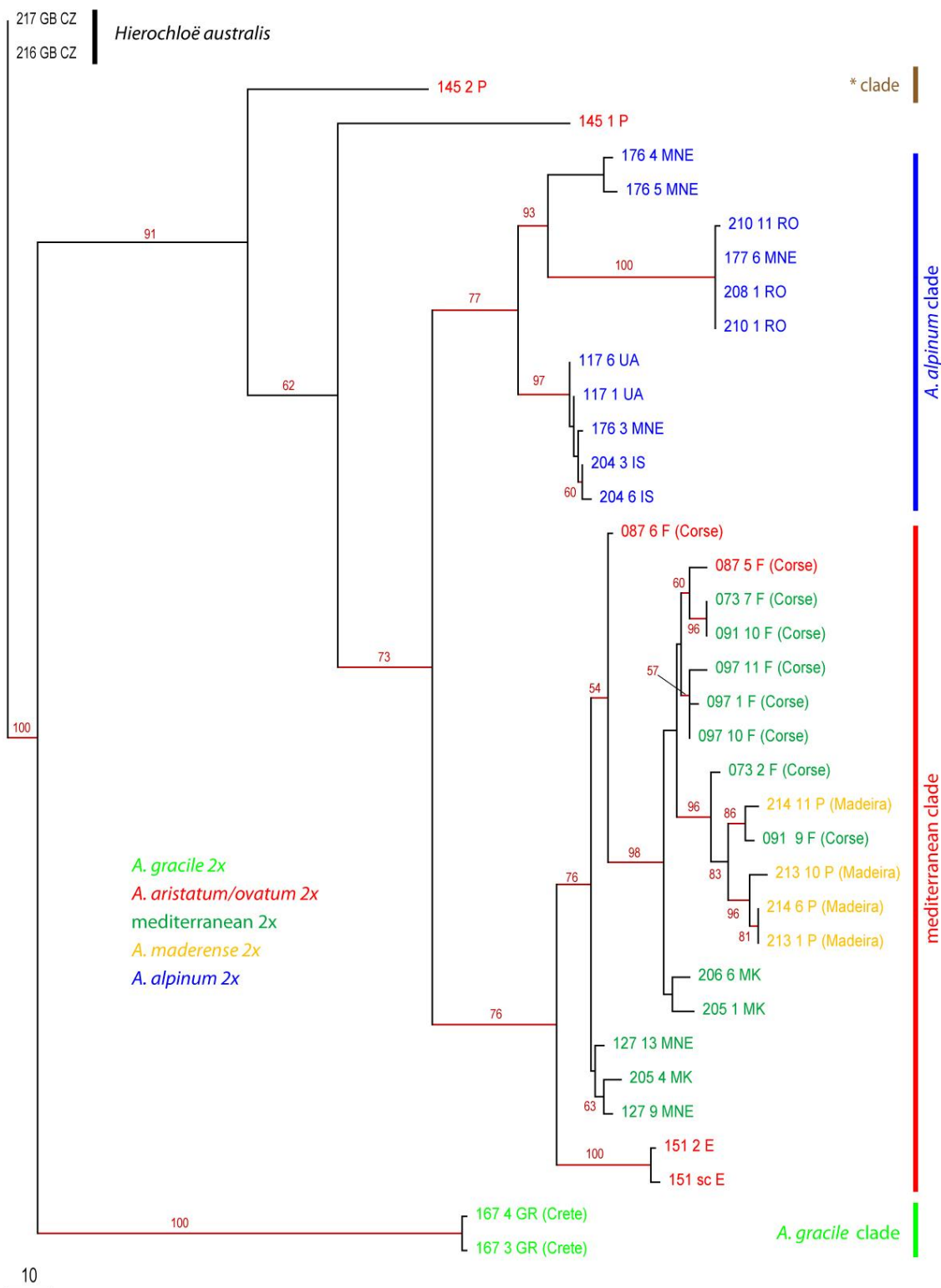


Obrázek 8. Parsimonický strom založen na sekvenování úseků *trnL-trnF* a *rpl32F-trnL* úseků *cpDNA*. Zobrazeny jsou bootstrapové hodnoty nad 50 % a posteriorní pravděpodobnosti bayesovské analýzy nad 0.9 jsou vyznačeny červenou větví daného uzlu. Čísla vzorků a zkratky států odpovídají údajům v tab. 2. *A. alpinum* haplogroup – haploskupina „A“, mediteranean haplogroup – haploskupina „M“, M1 – subtyp „M1“, M2 – subtyp „M2“. Viz též obr. 9.



Obrázek 9. Mapa haploskupin založená na sekvenování úseků *trnL-trnF* a *rpl32-trnL* cpDNA.

Fylogenetické vztahy diploidních taxonů byly zkoumány na základě analýzy GBSSI genu u těchto taxonů: *A. gracile*, *A. alpinum* 2x, *A. aristatum / ovatum*, *A. maderense*, mediteránní diploid. Z parsimonického stromu (obr. 10) je zřejmé jasné oddělení větve s *A. gracile* a vysoká podpora pro oddělení zbytku zahrnutých taxonů. Vnitřní struktura stromu je poněkud složitější, je ale zjevné vysoce podpořené odlišení 2 hlavních větví. Jedna zahrnuje všechny zástupce *A. alpinum* („A“; 77/0.99), druhá všechny zástupce mediteránního diploida, *A. maderense* a některých jedinců komplexu *A. aristatum / ovatum* („M“; 76/1.00). U této „M“ větve je patrná jasná diference oblasti stromu zahrnující všechny klony madeirských rostlin (včetně 2 klonů korsických mediteránních diploidů; 96/1.00).



Obrázek 10. Parsimonický strom pro diploidní druhy rodu *Anthoxanthum* založen na sekvenování části genu GBSSI. Zobrazeny jsou bootstrapové hodnoty nad 50 %, podpory bayesovské analýzy nad 0.9 jsou zvýrazněny červenými větvemi před daným uzlem. Čísla vzorků a zkratky států odpovídají údajům v tab. 2. „*“ větev je blíže vysvětlena u GBSSI analýzy s tetraploidy. *A. alpinum* clade = „A“ větev, mediterranean clade = „M“ větev.

Pro ověření hypotéz vzniku tetraploidů a určení jejich rodičovských linií byly konstruovány fylogenetické stromy z výchozího diploidního stromu založeného na sekvencích úseku části GBSSI genu, ke kterému byly přidáni i tetraploidní zástupci rodu (obr. 11, příloha 1).

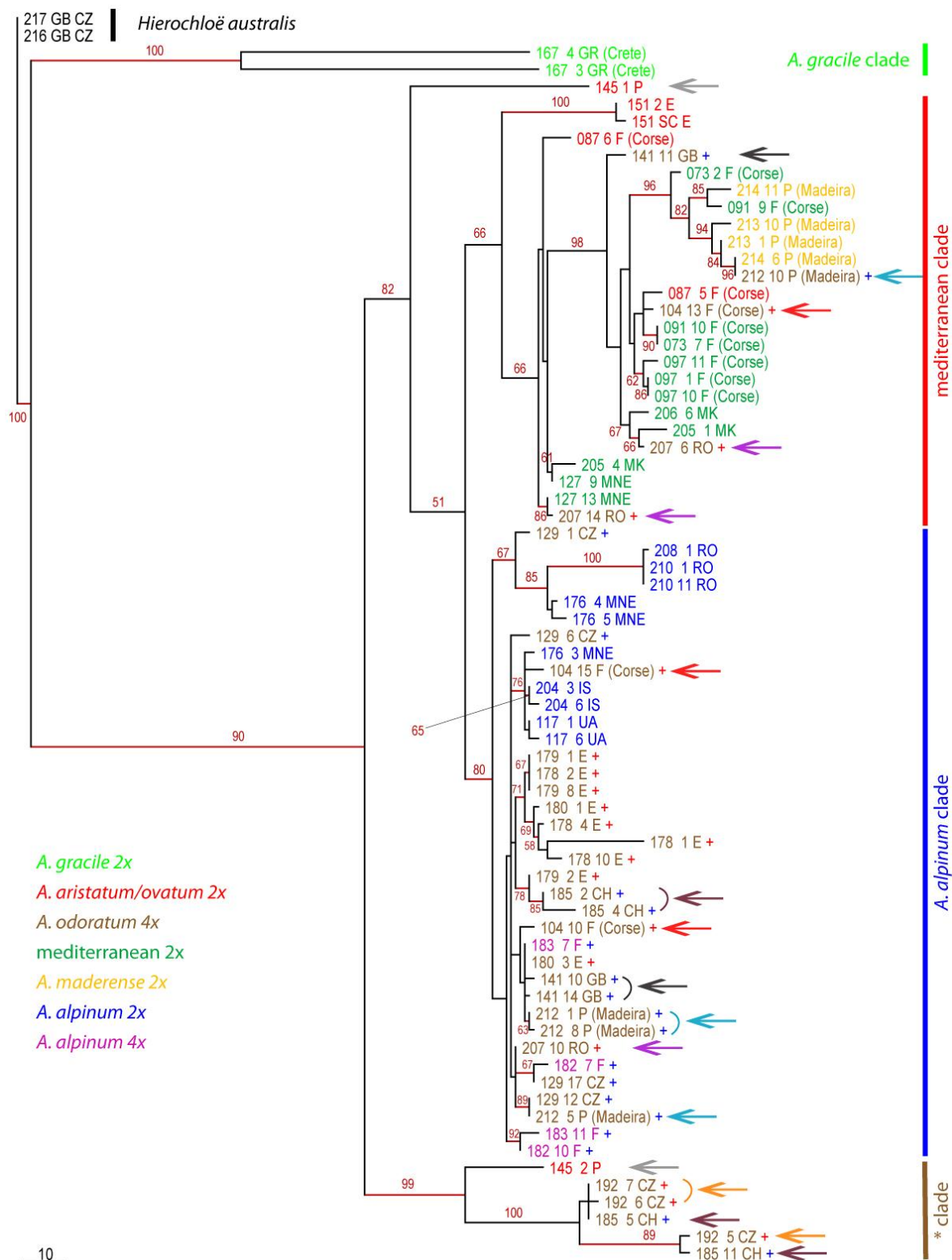
S absolutní podporou se opět oddělila větev *A. gracile* (100/1.0), jejíž GBSSI alely nebyly nalezeny v žádném tetraploidovi. Základní topologie stromu je ve srovnání s výše uvedeným stromem diploidním víceméně totožná, přesto došlo k některým změnám. Velmi vysokou podporu (99/1.0) získala větev provizorně označena jako „*“, která se ve stromech sestavených na základě úseků *cpDNA* vůbec neoddělila, v diploidním GBSSI stromu též není patrná. Spadá sem *A. odoratum* z České republiky (CZ01), Švýcarska (CH07) a jediný klon diploidního zástupce *A. aristatum / ovatum* z Portugalska (P15).

Obě základní skupiny „A“ a „M“, které se vylišily v diploidním stromu (obr. 10), jsou zde též zachovány, nicméně s poněkud nižší podporou (51/0.92). O trochu jednoznačnější podporu mají vnitřní uzly vedoucí k těmto skupinám (pro „A“ 80/1.0 a pro „M“ 66/0.54). Naopak některé vnitřní skupiny obou hlavních větví zůstaly prakticky beze změn. Sem lze zařadit madeirskou odnož „M“ větve, kam se přidal pouze jeden klon z jedince *A. odoratum* (taktéž z Madeiry, P03), který ale zároveň obsahuje další kopie GBSSI genu, které náleží do „A“ větve (viz rostlina č. 212 v obr. 11).

Z dalších tetraploidních zástupců rodu lze vysledovat následující zvláštnosti (na obr. 7 i 11 zvýrazněny různobarevnými šipkami):

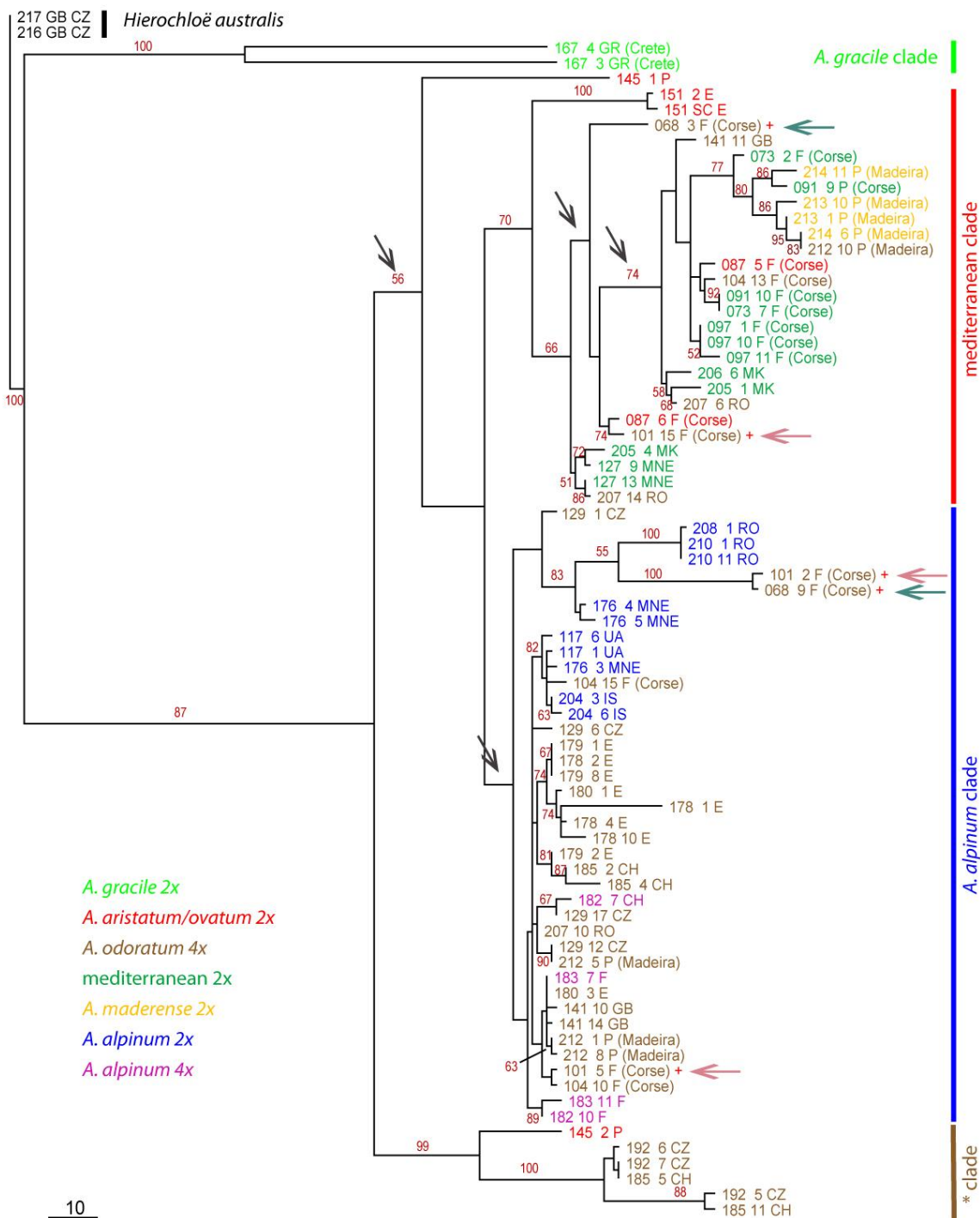
- rostliny obsahující GBSSI alely obou hlavních skupin („A“ i „M“) a zároveň sdílící „A“ *cpDNA* haploskupinu - 141 (Velká Británie, GB01) a 212 (Madeira, P03)
- rostliny obsahující GBSSI alely obou hlavních skupin („A“ i „M“) a zároveň sdílící „M“ *cpDNA* haploskupinu - 104 (Korsika, F20) a 207 (Rumunsko, RO04)
- rostliny obsahující GBSSI alely „A“ a „*“ skupiny - vzorek 185 (Švýcarsko, CH07)
- vzorek 192 (ČR, CZ01) se v rámci tohoto stromu vyskytuje ve skupině „*“, u *cpDNA* patří k haploskupině „M“
- vzorky 178, 179, 180 (Španělsko, E12) sdílící pouze GBSSI alely „A“ skupiny patří do „M“ *cpDNA* haploskupiny.

Zcela dle předpokladů tetraploidní jedinci *A. alpinum* (F07) sdílí pouze GBSSI alely „A“ skupiny a zároveň se vyskytují v „A“ *cpDNA* haploskupině.



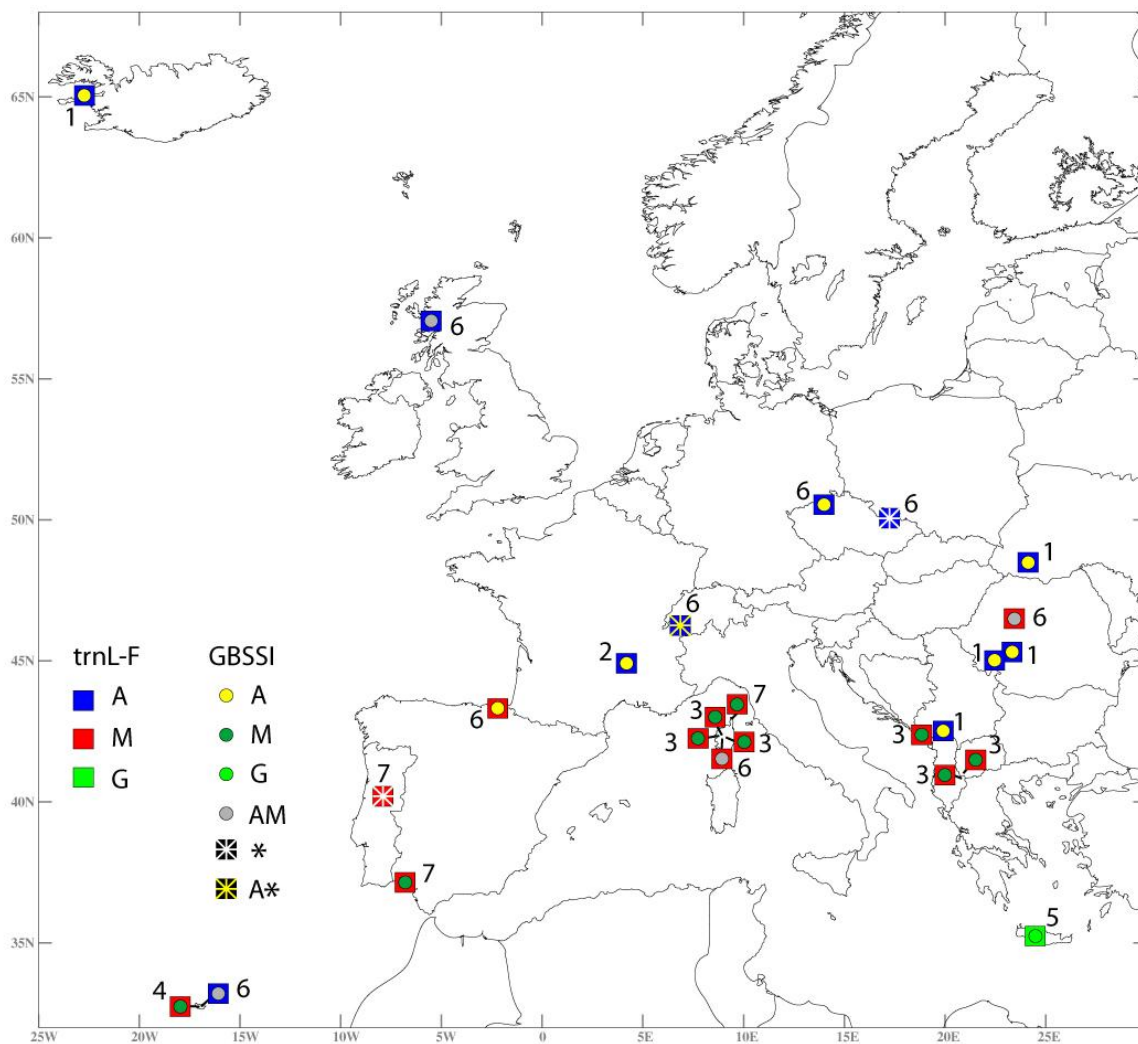
Obrázek 11. Parsimonický strom založen na sekvenování části genu GBSSI (bez vzorků 68 a 101). Zobrazeny jsou bootstrapové hodnoty na 50 %. Větve stromu, které jsou zvýrazněny červeně, mají bayesovskou podporu vyšší než 0.9. Čísla vzorků a zkratky států odpovídají údajům v tab. 2. Různobarevné šipky poukazují na rostliny, které jsou komentovány v textu u GBSSI stromu. Znaménko + označuje haploskupiny z analýz *cpDNA* (obr. 7 a 8), + haploskupina „M“, + haploskupina „A“. *A. alpinum* clade - „A“ větve, mediterranean clade - „M“ větve, * clade - „*“ větve. Alternativní parsimonický strom k tomuto je v příloze 1.

U fylogenetického stromu na základě sekvencí GBSSI, kde jsou zahrnuty i vzorky 68 a 101 (*A. odoratum* z Korsiky), je značně snižená podpora jednotlivých větví (obr. 12). Klony z obou vzorků se vyskytují v obou hlavních skupinách „A“ a „M“, ve stromech na základě úseků *cpDNA* patří k haploskupině „M“.



Obrázek 12. Parsimonický strom založen na sekvencování části genu GBSSI. Zobrazeny jsou bootstrapové hodnoty na 50 %. Čísla vzorků a zkratky států odpovídají údajům v tab. 2. Různobarevné šipky poukazují na umístění klonů vzorků 68 a 101, zatímco černé šipky ukazují na snížené hodnoty podpor daných větví ve srovnání s Obr. 11. Znaménko + u vzorků 68 a 101 označuje haploskupiny z analýz *cpDNA* (obr. 7 a 8), + haploskupina „M“, + haploskupina „A“. *A. alpinum* clade - „A“ větev, mediterranean clade - „M“ větev, * clade - „*“ větev.

Grafické znázornění prostorového uspořádání kombinovaného výskytu *cpDNA* haploskupin (odvozeno z *trnL-trnF* stromu) a alel GBSSI stromu je na obr. 13. Z tohoto výstupu je patrné, že převládá vazba dané *cpDNA* haploskupiny ke stejnému typu GBSSI alel (tj. „A“ haploskupina *trnL-trnF* se většinou váže k „A“ skupině GBSSI alel a „M“ *cpDNA* haploskupina k „M“ skupině GBSSI). Na druhou stranu většina zástupců *A. odoratum* (č. 6) vykazuje vysoký podíl zastoupení různých typů sekvencí, a to v různých kombinacích.



Obrázek 13. Mapka s haploskupinami (*trnL-trnF* úsek *cpDNA*) a jednotlivými alelami (část genu GBSSI) pro soubor rostlin, u nichž jsou k dispozici oba údaje. (1 *A. alpinum* 2x, 2 *A. alpinum* 4x, 3 mediteránní diploid, 4 *A. maderense*, 5 *A. gracile*, 6 *A. odoratum*, 7 *A. aristatum* / *ovatum*.)

5. Diskuze

Cílem této práce bylo objasnění dosud neznámých vzájemných evolučních vztahů mezi taxony rodu *Anthoxanthum*, mezi jednoletými a vytrvalými zástupci a mezi diploidy a polyploidy.

Konkrétní otázky se vztahovaly k původu a rozšíření znovuobjeveného diploidního vytrvalého taxonu a jeho vazbě k ostatním zástupcům skupiny. Další pak k rozšíření vytrvalých zástupců rodu *Anthoxanthum* v Evropě, jejich haplotypové diferenciaci a evolučním vazbám mezi jednotlivými zástupci rodu, zejména způsobu vzniku allotetraploidního druhu *A. odoratum* s. str.

Vyřešení, nebo alespoň částečné odpovědi na otázky, byly závislé na sebrání dostatečného množství rostlin z co největšího areálu výskytu. V rámci možností se nám podařilo sehnat reprezentativní vzorek. Navíc na základě výsledků této práce bude možnost se zaměřit na sbírání v oblastech, kde se vyskytují zajímavé kombinace chloroplastových haplotypů / GBSSI alel jednotlivých druhů, a pokusit se tak zjistit podrobnější fylogeografické vztahy mezi taxony v různých oblastech výskytu.

K odpovědi na výše položené otázky byl zvolen metodický aparát kombinující průtokovou cytometrii s molekulárními analýzami, což se ukázalo být velmi vhodným přístupem ve studiu evolučních vztahů u mnoha polyploidních komplexů (např. Bendixby *et al.* 2011; Burnier *et al.* 2009; Slotte *et al.* 2006).

Z molekulárních metod byla zvolena varianta sekvenování nekódujících úseků *cpDNA*, později i jaderného genu GBSSI. Zde nutno uvést, že zatímco úsek *trnL-trnF* byl analyzován u všech rostlin, úsek *rpl32-trnL* a gen GBSSI jen u vybrané části populací. Bohužel se zatím nepodařilo kvůli časové i finanční náročnosti získat tyto sekvence u stejného souboru jedinců, čímž mohou být analýzy (jejich porovnání) mírně ovlivněny. Například v analýzách GBSSI genu není podchyceno příliš mnoho tetraploidních rostlin. Navíc byly, po předběžných zkušebních analýzách, vyloučeny rostliny *A. amarum*, s kterými si zatím neumíme poradit. Pro srovnání s Pimentelem a Sahuquille (2007) ale bude stát za to zkusit se v budoucnu vypořádat i s tak vysokými polyploidy. Do některých analýz bylo zahrnuto větší množství rostlin z jedné populace, zejména pokud byl soubor rostlin daného druhu malý (*A. maderense*, *A. alpinum* 4x). Přesto si myslím, že jsou výsledky relevantní.

Vztahy mezi diploidními taxony

Vztahy mezi diploidními taxony rodu *Anthoxanthum* se ukázaly jako velice zajímavé, zejména pak v oblasti Mediteránu, kde se vyskytují vytrvalé i jednoleté typy. Ve všech molekulárních analýzách se oddělil druh *A. gracile*, vyskytující se na ostrovech Středozemního moře, a přestože roste často v těsné blízkosti jiných zástupců (např. naše sběry z Kréty), nesdílí chloroplastovou haploskupinu s žádným jiným druhem (obr. 7-13). Jeho velikost genomu (2C i 1Cx hodnota) je rovněž zcela odlišná od ostatních zástupců rodu (tab. 7). Toto zjištění je zcela v souladu s Pimentelem *et al.* (2007b), v jejichž práci se *A. gracile* z Malty na základě AFLP metody též se 100% podporou oddělilo od zbytku druhů.

Druhou dobře vyhraněnou skupinu tvoří zástupci druhu *A. alpinum* (jeho diploidní varianty). Nejen že mají specifickou velikost genomu (jejich 2C i 1Cx hodnota je nejnižší ze všech zkoumaných zástupců (tab. 7, obr. 4), ale zároveň sdílí totožnou chloroplastovou haploskupinu a jejich GBSSI alely tvoří dobře vyhraněnou větev (obr. 10). Jakkoliv se zdá, že je uvnitř tohoto taxonu určitá variabilita (signifikantní vazba velikosti genomu na geografickou polohu – tab. 9, obr. 6; vnitřní struktura GBSSI „A“ větve – obr. 10) nelze ji v tuto chvíli interpretovat. Jisté ale je, že tento taxon tvoří specifickou skupinu jak z pohledu cytometrického, tak molekulárního, a je tedy nepřijatelný návrh Pimentela a Sahuquilla (2008) na spojení tohoto druhu s *A. odoratum* (viz též dále).

Mnohem složitější situace je u diploidních taxonů v oblasti Mediteránu, které podle analýz *cpDNA* sdílejí stejnou haploskupinu „M“ (obr. 9), což znesnadňuje otázku zjištění jejich původu, neboť tato skupina má jen velmi nejasnou vnitřní strukturu (obr. 7 a 8). Ještě nápadnější nejednota systematických jednotek (taxonů) s molekulárními daty je patrná u stromu GBSSI (obr. 10). Zde se viditelně vyprofilovala pouze větev s *A. maderense*, která má ovšem vazby k alelám korsických rostlin (viz dále). Mediteránní diploid a komplex *A. aristatum* / *ovatum* však jasné postavení nezaujímají. Klony portugalské rostliny (145 z pop. P15) z komplexu *A. aristatum* / *ovatum* se vyskytují zcela samostatně na samé bázi diploidního GBSSI stromu, španělské (151 - E06) se 100% oddělují od uzlu vedoucího ke skupině „M“ a korsické (087 - F10) se vyskytují na nejodvozenějším místě této větve. S tímto nejasným postavením možná úzce souvisí i velká variabilita ve velikosti genomu (tab. 7), která jednoznačně ukazuje na vnitřní nejednotnost komplexu. Tato skutečnost odpovídá i zjištění Pimentela *et al.* (2010), kteří poukazují na genetickou i morfológickou nejednotnost související s introgresí mezi dvěma domnělými původními rodinami *A. aristatum* a *A. ovatum*. Klony mediteránního

diploidního taxonu jsou bez výraznějších vazeb např. ke své geografické provenienci rozesety po celé „M“ větvi GBSSI stromu.

Zajímavostí u diploidních rostlin je též naprostá druhová vyhraněnost populací. Částečně to může být náhoda, ale na žádné lokalitě nebyly nalezeny rostliny více druhů, mimo korsickou populaci (F10) s *A. aristatum* / *ovatum* 2x a 3x. Zároveň je zcela zjevné, že vytrvalý mediteránní diploidní druh (který nebyl nikdy řádně popsán, viz např. Jones 1964, Hedberg 1986) je vázán na V Mediterán, zatímco jednoleté druhy komplexu *A. aristatum* / *ovatum* jsou vázány čistě na Z Mediterán (obr. 2). Jediným nalezeným styčným místem obou skupin je ostrov Korsika, kde jsou oba typy výškově vikariantní (viz dále).

Autopolyploidní vznik *A. alpinum* 4x

Získaná data z měření velikosti genomu nasvědčují už několikrát publikované autotetraploidní teorii vzniku *A. alpinum* 4x z *A. alpinum* 2x (Zeroual-Humbert-Droz & Felber 1999). Naměřené 1Cx-hodnoty pro diploidní (2.764 pg) a tetraploidní cytotyp (2.744 pg) jsou téměř totožné, což bylo statisticky ověřeno (tab. 8, obr. 4). Tuto teorii potvrzují i molekulární analýzy, neboť se obě ploidie *A. alpinum* vyskytují vždy ve společné haploskupině „A“ cpDNA stromů i „A“ větvi GBSSI stromu a nikde jinde. Je mírně zarážející, že zatímco ve stromech založených na sekvencích úseků cpDNA *A. alpinum* 4x sdílí s rostlinami *A. alpinum* 2x totožný nebo jen nepatrně odlišný haplotyp (obr. 7 a 8), v GBSSI stromu (obr. 11) se vyskytuje mimo dobře podpořené větve diploidních taxonů. Ba naopak, klony tetraploidů padají na bázi „A“ větve, a nebo vytvářejí klastry společně s klony izolovanými z tetraploidních rostlin *A. odoratum*. Toto oddělení by mohlo být teoreticky možné díky společnému, dnes již vyhynulému, předku, který stál na počátku diploidní linie rodu. Mohlo z něj vzniknout *A. alpinum* 2x, 4x a při hybridizaci s jinými diploidy i *A. odoratum*.

Další možností tohoto zvláštního postavení by mohl být tzv. „lineage sorting“ (např. Lyons-Weiler & Milinkovitch 1997), kdy dojde v raných stádiích evoluce daného taxonu náhodnými procesy k vyselektování některých alel z původně velkého množství. Pokud by si diploidní i tetraploidní linie zachovaly jen některé vzájemně nepodobné alely téhož genu, mohly by se nám zdát druhy nyní vskutku vzdálené. (K tomuto jevu pravděpodobně dochází u druhu *A. odoratum*, kdy mají někteří jedinci chloroplastovou haploskupinu „A“, přestože v GBSSI genu žádnou alelu haplotypu skupiny „A“ nemají.) V neposlední řadě se mohlo stát, že je analýza GBSSI ovlivněna výběrem vzorků, neboť nejbližší *A. alpinum* 2x

a *A. alpinum* 4x, jež jsou do souboru dat zahrnuty, jsou od sebe vzdálené téměř 1300 km vzdušnou čarou. Na druhou stranu *A. alpinum* 2x, vzdálená od sebe vzdušnou čarou více než 3500 km (Island – Černá Hora), vytváří monofyletickou skupinu.

Allopolyploidní vznik *A. odoratum*

Způsob vzniku tetraploidního *A. odoratum* byl, a stále je, jednou z nejčastěji diskutovaných otázek. Vzhledem k postupnému objevování cytotypů *A. alpinum* a rostlin dlouhá léta přiřazovaných k *A. odoratum* (mediteránní diploid) se měnily i názory na vznik tohoto druhu.

Z cytometrických analýz je patrné, že pokud budeme uvažovat dosud žijící rodiče tohoto druhu, nepřipadá v úvahu autotetraploidní vznik. 2C-hodnota *A. odoratum* je $12,902 \pm 0,349$ pg, čemuž neodpovídá dvojnásobek naměřené 2C-hodnoty žádného diploidního taxonu rodu *Anthoxanthum*.

Naopak teorii allotetraploidizace dobře podkládají 2C-hodnoty druhu *A. alpinum*, jakožto prvního uvažovaného rodiče ($2C = 5,528 \pm 0,072$ pg) a mediteránního diploida ($2C = 7,431 \pm 0,119$ pg), *A. maderense* ($2C = 7,028 \pm 0,029$ pg) či komplexu *A. aristatum / ovatum* ($2C = 7,667$ pg $\pm 0,498$), jež by se dali považovat za rodiče druhého. Součet těchto hodnot dává dohromady vždy nějakou z rozmezí 2C-hodnot druhu *A. odoratum*.

Allotetraploidní vznik dokládají i molekulární analýzy. U vzorků rostlin *A. odoratum* lze najít tři z dosud objevených haploskupin u stromů postavených na sekvencích *cpDNA* (obr. 7 a 8), taktéž se *A. odoratum* vyskytuje ve třech koncových větvích stromů založených na sekvenování genu *GBSSI* (obr. 11 a 12). To dokládá několikanásobný, nezávislý vznik tohoto druhu. Naše výsledky jsou v některých rovinách v nesouladu se studií Pimentela *et al.* (2007b), kterým se vyčlenila v NJ stromu na základě AFLP dat homogenní skupina *A. odoratum*. V roce 2008 pak ale Pimentel a Sahuquillo navrhovali na základě nezjištěné genetické diversifikace metodou RAPD a morfometrickými analýzami spojit druhy *A. odoratum* a *A. alpinum* do jednoho. Molekulární analýzy zahrnuté do této práce ale zcela jasně vyvrátily oprávněnost takového sloučení, neboť *A. alpinum* lze považovat pouze za jeden z rodičovských taxonů, který se podílel na obrovské genetické variabilitě tetraploidního *A. odoratum*. Druhá část skládky vedoucí k nejrozšířenějšímu zástupci rodu v Evropě je stále obestřena tajemstvím, neboť *GBSSI* gen u *A. odoratum* obsahuje alely všech možných diploidních zástupců mediteránu (*A. maderense*, mediteránního diploida i komplexu *A. aristatum / ovatum*) i jejich nejrůznější kombinace.

De facto to odpovídá všem dosud postulovaným hypotézám allopolyploidního vzniku tohoto druhu, jako je hybridizace *A. alpinum* 2x a *A. ovatum* (Jones 1964) či *A. alpinum* 2x a mediteránního diploida (Jones 1964, Teppner 1970, Hedberg 1986). Snad jen hybridizace *A. ovatum* a mediteránního diploida (Jones 1964) by se na základě velikosti genomu dala vyloučit.

Stejně jako Pimentelovi *et al.* (2007b), se nám nepodařilo vysledovat žádné geografické či jiné vazby v závislosti na genetické podobnosti populací. Zůstává tedy u spekulací.

Myslíme si, že na větším množství dat z většího geografického rámce by se, i pomocí dosud používaných molekulárních metod, dalo zjistit více o fylogeografii tohoto druhu, o které výše uvedení autoři, ale i Felber (1987) diskutují. Například oběma autory zmiňovaná refugia na Pyrenejském poloostrově a následná rekolonizace Evropy by mohla vysvětlit přítomnost haploskupiny „M2“ u rostlin *A. aristatum* / *ovatum* a *A. amarum* (Portugalsko) a *A. odoratum* (Švýcarsko) (obr. 9) či výskyt alely koncové větve GBSSI stromu označované jako „*“ (obr. 13). Tamní výskyt rostlin *A. odoratum* s haploskupinou „M“ i „A“ je z tohoto hlediska rovněž zajímavý.

Allopolyploid *A. odoratum* mohl též vzniknout v období sestupu diploidního *A. alpinum* z vrcholů Alp během období glaciálů. Tuto skutečnost potvrzují i reliktní lokality rakouských hadců (Melzer 1986), kde diploidní *A. alpinum* jako glaciální reliktní setrvalo dodnes. Zde je zajímavá i ta skutečnost, že *A. odoratum* v sympatrické populaci s *A. alpinum* nenesl jeho chloroplastový haplotyp z „A“ skupiny, ale naopak z haploskupiny „M1“. Totožný příklad je doložen i ze sympatrické populace *A. alpinum* 2x a *A. odoratum* z České republiky (CZ01).

Mediteránní diploid versus *A. maderense*

Během práce vyvstala na základě získaných cytometrických a molekulárních dat další otázka, a to vztah mezi mediteránním diploidem a druhem *A. maderense*. Statistické zhodnocení velikosti genomu (1Cx-hodnot) poukazuje na vzájemnou neodlišitelnost obou typů (tab. 8) a analýza GBSSI genu sice ukazuje vysoce podpořené oddělení větve s *A. maderense*, nicméně i těsnou vazbu některých alel zástupců mediteránního diploida k tomuto taxonu. Zatím nelze zcela vyvrátit ani 100% dokázat potenciální spojitost mezi zmíněnými druhy. Pimentel *et al.* (2007b) neměl do svých analýz zahrnutý rostliny mediteránních diploidů, proto je možné, že se v jejich analýze *A. maderense* v NJ stromě oddělilo jako samostatná větev od ostatních vytrvalých druhů. V diskuzi pak uvažuje jako možného předka *A. maderense* právě mediteránního diploida. Této hypotéze napovídá i ta

skutečnost, že předpokládaným místem původu mnoha makaronéských druhů je oblast Mediteránu (Francisco-Ortega *et al.* 1996). Tuto problematiku bude však nutné podrobit dalšímu zkoumání, nejspíše na základě morfometrických, karyotypových a dalších molekulárních analýz.

Variabilita ve velikosti genomu

Zajímavým fenoménem, který byl zjištěn napříč zkoumanými druhy, je vysoká vnitrodruhová variabilita velikosti genomu (tab. 7). Ta dosahuje extrémních hodnot u komplexu jednoletých druhů *A. aristatum* / *ovatum* (až 34 % v rámci DNA-diploidů). Samozřejmě tento fakt může souviset s umělým slučováním několika odlišných taxonů (v historii bylo popsáno relativně mnoho vnitrodruhových taxonů obou druhů (např. Valdés 1973, Lopéz-Gonzáles 1994), nicméně vnitropopulační variabilita dosahuje téměř stejných hodnot (populace E09 – 31.4 %, tab. 2). Obdobný, i když ne tak markantní rozdíl, byl zaznamenán u většiny taxonů (tab. 7). Příčin vzniku vnitrodruhové variability může být hned několik – aneuploidie (pravděpodobná u *A. amarum*, kde bylo publikováno několik chromozomových počtů v rozmezí $2n = 80-90$, Fernández & Queirós 1969, Teppner 2002), prezence či absence B chromozomů případně satelitní DNA (Hedberg 1990) a v neposlední řadě i počet kopií transpozonů (pro srovnání např. Zedek *et al.* 2010). Objasnění příčin takto vysoké vnitrodruhové variability vyžaduje další podrobné studium.

Korsika

Jako opravdu zajímavé místo co se druhů rodu *Anthoxanthum* týče, se zdá být Korsika.

I když zde nebyly nalezeny smíšené populace, kromě výše uvedeného komplexu s diploidními a triploidními jedinci, mohou se tu recentně potkávat jednoleté druhy (*A. aristatum* / *ovatum* – vyskytující se v přímořských polohách do ca 200 m. n. m.) s druhy vytrvalými (mediteránní diploid – nejčastější druh středních poloh [300–1200 m.n.m.], *A. odoratum* – výrazně horský druh [1500–2000 m. n. m.], a možná i *A. alpinum* – pravděpodobně vázán na nejvyšší polohy nad 2000 m. n. m.]). Zajímavý je například pravděpodobně rekombinantní původ alel, které se vyskytly u některých korsických rostlin *A. odoratum* (68 – F19, 101 – F20). Domníváme se, že vzhledem k vysokému zastoupení klonů není možné, aby rekombinace vznikly během PCR, ale souvisejí s místem výskytu a hybridogéním původem taxonu. Nicméně tuto spekulaci bude nutné ověřit dalšími analýzami.

Za zmínku též stojí přítomnost 2 klonů korsických rostlin (73 - F16, 91 - F17) na dobře oddělené větvi s *A. maderense* (obr. 10). To by nasvědčovalo teorii Pimentela *et al.* (2007b) o možné souvislosti vývojových větví mediteránního diploida s madeirskými rostlinami (viz výše). Možný je ale i druhý scénář odvíjející se od hybridizace dlouhodobě izolovaných madeirských typů mediteránními diploidy z Korsiky (i když se zdá podobný scénář velmi krkolomný, podobně „nepochopitelný“ přenos alel lze vysledovat i u „*“ větve v rámci GBSSI stromu). Že ke genovému toku z *A. maderense* dochází je potvrzeno přítomností shodné alely GBSSI genu v rostlině *A. odoratum* z Madeiry (212 - P03).

6. Závěr

V rámci předkládané diplomové práce byly řešeny dva okruhy otázek spojené s rozšířením a polyploidním původem rodu *Anthoxanthum* v Evropě. K výzkumu byly použity dvě v současnosti hojně využívané metody rostlinné biologie – průtoková cytometrie pro zjištění velikosti genomu, sekvenování DNA pro odhalení evolučních vztahů mezi taxony a jejich haplotypové diferenciaci.

Výsledky práce jsou následující:

- Průtoková cytometrie odhalila druhově specifickou velikost genomu u většiny evropských taxonů, což umožňuje jejich nezávislé a objektivní určení.
- U většiny taxonů byla zjištěná poměrně velká vnitrodruhová variabilita ve velikosti genomu.
- Byl objeven v literárních pramenech zmiňovaný, dosud ale pravděpodobně platně nepopsaný, vytrvalý diploidní mediteránní taxon. Je vázán na V Mediterán, zatímco jednoleté druhy komplexu *A. aristatum* / *ovatum* naopak čistě na Z Mediterán. Jediným nalezeným styčným místem obou skupin je ostrov Korsika, kde jsou oba typy výškově vikariantní.
- Statistické zhodnocení velikosti genomu poukazuje na vzájemnou neodlišitelnost mediteránního diploida a *A. maderense*. V rámci molekulárních analýz patří *A. maderense* do odvozené větve v rámci skupiny mediteránních diploidů.
- Byl potvrzen autopolyploidní vznik *A. alpinum* 4x z *A. alpinum* 2x nebo jeho přímého předka.
- Byl potvrzen allopolyploidní vznik *A. odoratum*. Prvním předpokládaným rodičem je *A. alpinum* 2x či jeho přímý předek, druhým rodičem by mohl být mediteránní diploid, rostlina z komplexu *A. aristatum* / *ovatum* či *A. maderense*. Dá se říci, že všechny zmiňované hypotézy byly potvrzeny, neboť byly u různých jedinců *A. odoratum* nalezeny různé alely (nebo jejich sesterské typy) všech zmíněných taxonů.
- Pomocí sekvencí nekódujících úseků *cpDNA* byly objeveny 3 haploskupiny (1 se dělí na další 2 subtypy), pomocí sekvenování genu *GBSSI* byly rozlišeny skupiny 4 (nebyly ale odlišeny 2 výše zmíněné subtypy)

- U všech molekulárních analýz se 100% oddělila větev vedoucí k *A. gracile* (nesdílí haplotyp s žádným z ostatních druhů), jeho velikost genomu je též zcela odlišná.
- Převládá vazba dané cpDNA haploskupiny ke stejnému typu GBSSI alel, ale většina zástupců *A. odoratum* vykazuje vysoký podíl zastoupení různých typů sekvencí, a to v různých kombinacích, což nasvědčuje mnohonásobnému a polytopnímu vzniku.
- *A. alpinum* 2x tvoří dobře odlišenou skupinu jak z pohledu cytometrického, tak molekulárního.
- Diploidní taxony v oblasti Mediteránu (vytrvalý mediteránní diploid a jednoleté *A. aristatum* / *ovatum*) spadají do stejné haploskupiny a mají podobnou velikost genomu, znesnadňuje to otázku zjištění jejich původu a jejich podílu na vzniku *A. odoratum*.

Sice se podařilo odpovědět na mnohé kladené otázky, některé však zůstávají nevyřešeny. Také se na základě získaných dat objevily další. Budoucí výzkum bude zaměřen na několikanásobný vznik a původ *A. odoratum* a s tím související vztah mezi mediteránním diploidem a *A. maderense*. Zřejmě přistoupíme k morfologickým, karyotypickým i dalším molekulárním metodám.

Rádi bychom se zabývali fylogeografií rodu, zahrnuli do analýz i *A. amarum*, a pokusili se tak zjistit místa vzniku a evoluční původ všech polyploidů.

7. Použitá literatura

- Alvarez I. & Wendel J. F. (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434.
- Böcher T. W. (1961): Experimental and Cytological studies on plant species. VI. *Dactylis glomerata* and *Anthoxanthum odoratum*. *Botanisk Tidsskrift* 56: 314-335.
- Bendiksby M., Tribisch A., Borgen L., Trávníček P. & Brysting A. K. (2011): Allopolyploid origins of the *Galeopsis* tetraploids – revisiting Müntzing's classical textbook example using molecular tools. *New Phytologist* 191: 1150-1167.
- Bogenrieder A. & von Stietencron A. (1985): Morphologische und cytologische Untersuchungen an *Anthoxanthum alpinum* Á. & D. Löwe und *Anthoxanthum odoratum* L. vom Feldberg im Schwarzwald. *Carolinea* 42: 51-56.
- Borrill (1963): Experimental studies of evolution in *Anthoxanthum* (Gramineae). *Genetica* 34: 183-210.
- Burnier J., Buerki S., Arrigo N., Küpfer P. & Alvarez N. (2009): Genetic structure and evolution of Alpine polyploid complexes: *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae) as a case study. *Molecular Ecology* 18: 3730-3744.
- Bretagnolle F. (2001): Pollen production and spontaneous polyploidization in diploid populations of *Anthoxanthum alpinum*. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 241-247.
- Clegg M. T., Gaut B. S., Learn G. H., jr. & Morton B. R. (1994): Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 6795-6801.
- Corriveau J. L. & Coleman, A. W. (1988): Rapid screening methods to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results of over 200 angiosperm species. *American Journal of Botany* 75: 1443-1458.
- Cronn R. C., Small R. L. & Wendel J. F. (1999): Duplicated genes evolve independently after polyploid formation in cotton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14406-14411.
- De Leonardis W., Pavone P., Terrasi M. C. & Zizza A. (1981): Numeri cromosomici per la Flora Italiana: 814-830. *Informatore Botanico Italiano* 13: 158-167.
- Demesure B., Comps, B. & Petit, R. J. (1996): Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* 50: 2515-2520.
- Doležel J. (1997): Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* 38: 285-302.
- Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (2007): Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Doležel J, Greilhuber J & Suda J. (2007b): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233-2244.
- Doyle J. J. & Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Dumolin-Lapégue, S., Demesure, B., Fineschi, S., Le Corre, V. & Petit, R. J. (1997): Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475-1487.
- Felber F. (1986): Distribution des cytodemes d'*Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. en Suisse. Les relations Alpes-Jura. *Botanica Helvetica* 96: 145-158.
- Felber F. (1987): Contribution à l'étude phytogéographique, biosystématique et expérimentale du complexe polyploïd *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. Thèse à l'UNINE, Neuchâtel.
- Felber F. (1988): Distribution des cytodemes d'*Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. en France et dans les régions limitrophes. *Bulletin de la Société Botanique de France* 135: 281-293.
- Felber F. (1993): Présence de trois taxons pérennes d'*Anthoxanthum* L. en Corse. In Jeanmonod D. et Burdet H. M. [eds], Notes et contributions à la flore de Corse, IX. *Candonellea* 48: 582-591.
- Fernandes A. & Queirós M. (1969): Contribution à la connaissance cytotoxinomique des spermatophyta du Portugal. I. Gramineae. *Boletim da Sociedade Broteriana* 2.a sér 43: 20-140.

- Filipová L. & Krahulec F. (2006): The transition zone of *Anthoxanthum alpinum* and *A. odoratum* in the Krkonoše Mts. *Preslia* 78: 317-330.
- Fortune P. M., Pourtau N., Viron N. & Ainouche M. L. (2008): Molecular phylogeny and reticulate origins of the polyploid *Bromus* species from section *Genea* (Poaceae). *American Journal of Botany* 95: 454-464.
- Francisco-Ortega J., Jansen R. K. & Santos-Guerra A. (1996): Chloroplast DNA evidence of colonization, adaptative radiation and hybridization in the evolution of the Macaronesian flora. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 4085–4090.
- Gielly L. & Taberlet P. (1994): The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular biology and Evolution* 11: 769-777.
- Greilhuber J., Tremsch E. M. & Loureiro J. C. M. (2007): Nuclear DNA Content Measurement. In: Doležele J., Greilhuber J. & Suda J. [eds.]: *Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes*: 67-101, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Hall T. A. (1991). BioEdit, a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Harris S. A. & Ingram, R. (1991): Chloroplast DNA and biosystematics. The effect of intraspecific diversity transmission. *Taxon* 40: 393-412.
- Hedberg I. (1964): Pubescence - a spurious taxonomic character in *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. *Svensk Botanisk Tidskrift* 58: 273-241.
- Hedberg I. (1967): Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. II. Investigations of some Swedish and of a few Swiss population samples. *Symbolae Botanicae Upsaliensis* 28/58: 5-88.
- Hedberg I. (1969): Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. III. Investigations of Swiss and Austrian population samples. *Svensk Botanisk Tidskrift* 63: 233-250.
- Hedberg I. (1970a): Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. IV. Karyotypes, meiosis and the origin of tetraploid *A. odoratum*. *Hereditas* 48: 471-502.
- Hedberg I. (1970b): Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. *Acta Universitatis Upsaliensis* 147: 3-8.
- Hedberg I. (1986): The genesis of tetraploid *Anthoxanthum odoratum*. *Symbolae Botanicae Upsaliensis* 27(2): 147-154.
- Hedberg I. (1990): Morphological, cytotaxonomic and evolutionary studies in *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. - a critical review. *Sommerfeltia* 11: 97-107.
- Ickert-Bond S. M. & Wen J. (2006): Phylogeny and biogeography of Altingiaceae: evidence from combined analysis of five non-coding chloroplast regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 512-528.
- Jones K. (1964): Chromosomes and the origin of *Anthoxanthum odoratum* L. *Chromosoma* 15: 248-274.
- Katterman G. (1931): Über die Bildung polyvalenter chromosomenverbände bei einigen Gramineen. *Planta* 12: 734-774.
- Khodlová Z. (2008): Problematika okruhu *Anthoxanthum odoratum* v Evropě. Bakalářská práce, depon. In: *Knihovna Katedry botaniky PřF UK, Praha*.
- Krak K. (2011): Využití sekvencí DNA při studiu evoluce rostlin. *Zprávy České botanické společnosti*. In press.
- Larkin M. A., Blaskshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., et al. (2007): ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Linné C. (1753): *Species plantarum: exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*, Tomus I. Impensis Laurentii Salvii, Stockholm.
- Litadière de R. (1949): Observation caryologiques et caryosystématiques sur diverses graminées, principalement de la flore méditerranéenne, *Memoires de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord* 2: 199-208.
- López-González G. (1994): Nota sobre el género *Anthoxanthum* L. (Gramineae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 51: 309-312.
- Lyons-Weiler J. & Milinkovitch M. C. (1997): A phylogenetic approach to the problem of differential lineage sorting. *Molecular Biology and Evolution* 14: 968–975.

- Mason-Gamer R. J. (2008): Allohexaploidy, introgression, and the complex history of *Elymus repens* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 598-611.
- Mason-Gamer R. J., Weil C. F. & Kellogg E. A. (1998): Granule-Bound Starch Synthase: Structure, Function, and Phylogenetic Utility. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1658-1673.
- Mayová M. (1982): Příspěvek k řešení problematiky *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. se zvláštním zřetelem k *Anthoxanthum alpinum* Á. & D. Löve. Diplomová práce na katedře botaniky vyšších rostlin, PFF UK, Praha.
- Melzer H. (1986): Notizen zur Flora des Burgenlandes, von Nieder- und Oberösterreich. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft, Österreich* 124: 81-92.
- Morton B. R., Clegg M. T. (1993): A chloroplast DNA mutational hotspot and gene conversion in a noncoding region near *rbcl* in the grass family (Poaceae). *Current Genetics* 24: 357-365.
- Müller K. (2005): SeqState – Primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA datasets. *Applied Bioinformatics* 4: 65-69.
- Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oestergren G. (1942): Chromosome numbers in *Anthoxanthum*. *Hereditas* 33: 242-243.
- Olmstead R. G. & Palmer J. D. (1994): Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany* 81: 1205-1224.
- Otto F. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman H. A. & Darzynkiewicz Z. [eds.]: *Methods in Cell Biology*: 105-110, Academic Press, New York.
- Palmer, J. D., Jansen R. K., Michaels H. J., Chase M. W., Manhart J. R. (1988): Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1180-1206.
- Parthasarathy N. (1939): Cytogenetical studies in Oryzeae and Phalaridideae. *Annals of Botany, London* N. S. 111: 43-76.
- Pimentel M., Estévez G. & Sahuquillo E. (2007a): European sweet vernal grasses (*Anthoxanthum*, Poaceae; Pooideae; Aveneae): a morphometric taxonomical approach. *Systematic Botany* 32: 43-59.
- Pimentel M., Sahuquillo E. & Catalán P. (2007b): Genetic diversity and spatial correlation patterns unravel the biogeographic history of the European sweet vernal grasses (*Anthoxanthum* L., Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 667-684.
- Pimentel M., Catalán P. & Sahuquillo E. (2010): Morphological and molecular taxonomy of the annual diploids *Anthoxanthum aristatum* and *A. ovatum* (Poaceae) in the Iberian Peninsula. Evidence of introgression in natural populations. *Botanical Journal of Linnean Society* 164: 53-71.
- Pimentel M. & Sahuquillo E. (2007): Intraspecific variation and phylogeography of the high-polyploid Iberian endemic *Anthoxanthum amarum* Brot. (Poaceae; Pooideae) assessed by random amplified polymorphic DNA markers (RAPDs) and morphology. *Botanical Journal of Linnean Society* 155: 179-192.
- Pimentel M. & Sahuquillo E. (2008): Relationships between the close congeners *Anthoxanthum odoratum* and *A. alpinum* (Poaceae, Pooideae) assessed by morphological and molecular methods. *Botanical Journal of Linnean Society* 156: 237-252.
- Pundeva R. S. (1974): Karyological study on the two varieties of *Anthoxanthum odoratum* L. var. *odoratum* and var. *montanum* Aschers. et Graebn. C. R. *Journal of the Bulgarian Academy of Sciences* 27: 395-398.
- Ramsey J. & Schemske D. W. (1998): Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 29: 467-501.
- Ronquist F. & Huelsenbeck J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rozmus M. (1958): Cytological investigations on *Anthoxanthum alpinum* L & L, a new species of the Flora of Poland. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 1: 171-185.
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sang T., Crawford D. J., Stuessy T. F. (1997): Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120-1136.

- Sang T. & Zhang D. (1999): Reconstructing hybrid speciation using sequences of lowcopy nuclear genes: hybrid origins of five *Paeonia* species based on *Adh* gene phylogenies. *Systematic Botany* 24: 148-163.
- Schaal R. A., Hayworth, D. A., Olsen, K. M., Reuscher, J. T. & Smith, W. A. (1998): Phylogeographic studies in plant prospects. *Molecular Ecology* 7:465-474.
- Schönwetter P., Popp M. & Brochmann C. (2006a): Central Asian origin of and strong genetic differentiation among the populations of the rare and disjunct *Carex atrofusca* (Cyperaceae) in the Alps. *Journal of Biogeography* 33: 948-956.
- Schönwetter P., Popp M. & Brochmann C. (2006b): Rare arctic-alpine plants of the European Alps have different immigration histories: the snow bed species *Minuartia biflora* and *Ranunculus pygmaeus*. *Molecular Ecology* 15: 709-720.
- Senchina D. S., Alvarez I., Cronn R. C., Liu B., Rong J., Noyes R. D., Paterson A. H., Wing R. A., Wilkins T. A., Wendel J. F. (2003): Rate variation among nuclear genes and the age of polyploidy in *Gossypium*. *Molecular Biology and Evolution* 6: 526-536.
- Shaw J., Lickey E. B., Beck J. T., Farmer S. B., Liu W., Miller J., Siripun K. C., Winder C. T., Schilling E. 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.
- Shaw J. & Small R. L. (2005): Chloroplast DNA phylogeny and phylogeography of the North American plums (*Prunus* subgenus *Prunus* section *Prunocerasus*, Rosaceae). *American Journal of Botany* 92: 2011-2030.
- Simmons M. P. & Ochoterena H. (2000): Gaps as characters in sequencebased phylogenetics analyses. *Systematic Biology* 49: 369-381.
- Slotte T., Ceplitis A., Neuffer B., Hurka H. & Lascoux M. (2006): Intrageneric phylogeny of *Capsella* (Brassicaceae) and the origin of the tetraploid *C. bursa-pastoris* based on chloroplast and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 93:1714-24.
- Small, R. L., Ryburn J. A., Cronn R. C., Seelanan T., Wendel J. F. (1998): The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. *American Journal of Botany* 85: 1301-1315.
- Soltis D. E., Soltis P. S. & Doyle J. J. (1998): *Molecular systematics of plants, II: DNA sequencing*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- Soltis D. E., Soltis P. S. & Tate J. A. (2003): Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist* 161: 173-191.
- Soltis, D. E., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Bell, C. D., Paterson, A. H., Zheng, C., Sankoff, D., de Pamphilis, C. W., Wall, P. K., Soltis, P. S. (2009): Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany*, 96: 336-348.
- Stehlik I. (2002): Glacial history of the alpine herb *Rumex nivalis* (Polygonaceae): A comparison of common phylogeographic methods with nested clade analysis. *American Journal of Botany* 89: 2007-2016.
- Suda J. (2004): An employment of flow cytometry into plant biosystematics. Ms. [Disert. práce, depon. in: Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha].
- Swofford D. L. (2002): PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods)*. Version 4. Sunderland, Mass. Sinauer.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. & Bouvet J. (1991): Universal primers for a mplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Tate J. A. & Simpson B. B. (2003) Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* 28: 723-737.
- Teppner H. (1970): Karyotypen europaischer, perennierender Sippen der Gramineen-Gattung *Anthoxanthum*. *Osterreichische Botanische Zeitschrift* 118: 280-292.
- Teppner H. (1998): *Anthoxanthum maderense* spec. nova und *A. odoratum* (Poaceae-Aveneae) von Madeira und deren chromosomen morphologie. *Phyton* 38: 307-321.

- Teppner H. (2002): Poaceae in the greenhouses of the Botanic Garden of the Institute of Botany in Graz (Austria, Europe). *Fritschiana* 31: 1-42.
- Timme R., Kuehl E. J., Boore J. L. & Jansen R. K. (2007): A comparative analysis of the *Lactuca* and *Helianthus* (Asteraceae) plastid genomes: identification of divergent regions and categorization of shared repeats. *American Journal of Botany* 94: 302-313.
- Tutin T. G. (1950): A note on species pairs in the Gramineae. *Watsonia* 1: 224-227.
- Valdés B. (1973): Revisión de las especies anuales del género *Anthoxanthum* (Graminae). *Lagascalia* 3: 99-141.
- Wendel J. F. (2000): Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42: 225–249.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M., Gelfand D., Sninsky J., White T. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, 315-322.
- Wills D. M. & Burke J. M. (2006): Chloroplast DNA variation confirms a single origin of domesticated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Heredity* 97: 403-408.
- Wood R. E., Takebayashi N., Barker M. S., Mayrose I., Greenspoon P. B., Rieseberg L. H. (2009): The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 13875-13879.
- Zedek F., Šmerda J., Šmarda P. & Bureš P. (2010): Correlated evolution of LTR retrotransposons and genome size in the genus *Eleocharis*. *BMC Plant Biology* 10: 265.
- Zeroual-Humbert-Droz C. & Felber F. (1999): Evidence from isozymes analysis of autopolyploidy in *Anthoxanthum alpinum* A. & D. Löve. *Botanica Helvetica* 109: 217-227.