

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Botany**

Doktorský studijní program: Botanika
Ph.D. study program: Botany

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis

Evoluční a ochranářské důsledky mezidruhové hybridizace u vzácných druhů rostlin
Evolutionary and conservation consequences of interspecific hybridization in rare plant species

Petr Vít

Školitel/Supervisor: Jan Suda

Průhonice, 13. 5. 2014

Souhrn

Hybridizace hraje nepochybně významnou roli v evoluci cévnatých rostlin. Obecně ale může mít jak pozitivní tak negativní důsledky, sahající od vzniku nových taxonů až po možné vyhynutí druhu introgresí. Tyto důsledky mohou být obzvláště intenzivnější u taxonů s omezeným geografickým rozšířením nebo u vzácných taxonů. Základem předkládané dizertační práce jsou tři studie zabývající se mezidruhovou hybridizací s účastí vzácného taxonu. Práce je doplněna studií, ve které vystupuje hybridizace jako zdroj variability a nového taxonu. Koexistence početných primárních hybridů s rodičovskými taxonomy byla odhalena u endemického rožce Slavkovského lesa (*Cerastium alsinifolium*) a jeho široce rozšířeným protějškem (*C. arvense*). Naproti tomu, hybridizace národních leknínů (*Nymphaea alba*, *N. candida*) je velmi vzácná. Předpokládalo se, že oba taxonomy hojně hybridizují, avšak naše karyologická data tento předpoklad nepotvrdila. Hybridizace v obou případech není vážným ohrožením vzácných taxonů. Třetí studie osvětuje důsledky mezidruhové hybridizace v rámci rodu *Diphasiastrum*. Obecně jsou ve střední Evropě rozlišovány tři základní a tři hybridogenní taxonomy. Vymezení jednotlivých taxonů je však nejednoznačné a díky introgresivní hybridizaci existují přechody (jak v morfologii, tak ve velikosti genomu) mezi taxonomy. Tato introgrese je z velké části umožněna lidskými aktivitami (m.j. disturbance), které umožnily kontakt mezi původně prostorově izolovanými taxonomy a jejich následnou hybridizaci. Původ nové agamospermické linie v rodu *Sorbus* byl popsán v poslední studii. Obdobné linie vznikají ve střední Evropě opakovaně díky mezidruhové hybridizaci. Nejčastěji vznikají agamospermičtí triploidi hybridizací diploidního (*S. torminalis*) a tetraploidního taxonu (např. *S. danubialis*, *S. graeca*). Dlouhodobá existence těchto linii je umožněna přechodem k agamospermickému způsobu reprodukce.

Summary

Hybridization plays an important role in the evolution of vascular plants. It can have both positive and negative consequences, ranging from the origin of new species on the one hand to the extinction of taxa through introgression on the other. These effects may be pronounced in geographically restricted or rare species. The core of this thesis are three case studies addressing interspecific hybridization involving rare angiosperm species. Finally, the thesis is completed with a study considering hybridization as a source of variation and new species. The coexistence of frequent primary hybrids with their parental taxa was revealed in the system comprising the rare species *Cerastium alsinifolium* and its widespread counterpart *C. arvense*. The spatial distribution of the endemic species and its habitat preferences were elucidated. In contrast, comparatively rare hybridization events were found in the *Nymphaea alba* – *N. candida* complex. Although it has been assumed that water lilies hybridize freely, our karyological data do not support this hypothesis. Hybrids therefore do not present a serious risk to either of these rare species. The third study describes interspecific hybridization in the spore-bearing genus *Diphasiastrum*. Traditionally, three basic and three hybridogenous species are recognized in Central Europe. However, species boundaries are blurred through frequent introgressive hybridization. Introgression has been catalysed by human activities (disturbances), which facilitate spatial contact between originally partly allopatric species and subsequent interspecific hybridization. The origin of a new agamospermous lineage through interspecific hybridization was described in the genus *Sorbus*. Apomictic triploids most likely originated via hybridization between diploid and tetraploid taxa. Their mode of reproduction shifted from sexual to apomictic, which assured their long-term persistence.

1) Úvod

Hybridizace hraje významnou roli v evoluci současných organismů. Je základním mechanismem procesů introgrese (přenos různých fenotypových znaků mezi taxony) nebo hybridní speciace. Většina cévnatých rostlin a kapradorostů vznikla (allo-)polyploidizací (hybridizace následovaná genomovou duplikací), která je tak považována za hlavní motor rostlinné evoluce (Soltis et Soltis 2009). Hybridizace také hraje zásadní roli v tzv. výživové evoluci lidstva. Ačkoliv první psané zmínky o hybridizaci jsou datovány do začátku 18. století, byla hybridizace pro lidstvo zásadní již od neolitu (Rieseberg et Carney 1998). V počátcích domestifikace a šlechtění rostlin i zvířat se hybridizační události stávaly vesměs náhodně či neúmyslně. Později docházelo k cílené selekci linií, které vykazovaly požadované vlastnosti, křížení blízce příbuzných druhů či lokálních odrůd bylo záměrné a narůstalo na intenzitě.

První studie zabývající se hybridizací přinesly několik nesprávných předpokladů. Hybridizace byla považována za slepu uličku evoluce, zvláště pro předpokládanou úplnou sterilitu hybridů (Grant 1981, Rieseberg et Carney 1998, Ouyang et al. 2010). Evoluční dopad hybridizace byl značně podceněn neboť byla považována za extrémně vzácný jev (Knobloch 1972). Ačkoliv největší pozornost evolučním důsledkům hybridizace byla a je věnována botaniky, v posledních desetiletích bylo zjištěno, že hraje zásadní roli i v evoluci živočichů (Dowling et Secor 1997, Hegarty et Hiscock 2005, Wissemann 2007, Soltis et Soltis 2009).

Hybridizace je zásadní pro generování nových, evolučně samostatných linií (které se mohou vyvinout v samostatný taxon), ale na druhé straně též může mít zhoubný vliv na populace vzácných rostlin. Ty mohou trpět hybridizací s běžně rozšířenými příbuznými taxonomy, což může vyústit ve smývání rozdílů mezi nimi a ohrozit genetickou integritu vzácné populace. Hlavní přirozené příčiny ohrožení populací vzácných taxonů jsou nízké počty jedinců, nízký počet populací, nesouvislé rozšíření či efekt okrajových populací. Během posledního století se k přirozeným příčinám přidal ještě vliv člověka. Fragmentace krajiny a změny jejího tradičního obhospodařování, degradace biotopů či jejich likvidace jsou nejvýznamnější vlivy člověka, které zvýšily pravděpodobnost vyhynutí většiny vzácných taxonů. Vzácné taxonomy jsou významnou součástí lokální i globální biodiverzity a jsou obecně považovány za indikátory bohatosti biodiverzity (Heywood et Iriondo 2003). Často mají úzké ekologické niky a jejich populace jsou ostrůvkovitě rozšířené v moderní krajině. Prostorově omezené populace vzácných taxonů jsou považovány za endemity určitých území (Kaplan 2012).

Důsledky hybridizace (jak prospěšné, tak ohrožující) jsou významnější u početně menších populací či u populací vyskytujících se na okrajích celkového areálu (což jsou často případy vzácných rostlin). Obecně i běžné mikroevoluční procesy (např. inbrední deprese, bottleneck, genetický drift či speciace) probíhají rychleji a snáze v případě malých populací než v početně velkých (Rhymer et Simberloff 1996). Vzhledem k tomu, že mnoho vzácných taxonů vzniklo z široce rozšířených příbuzných (z flóry ČR např. *Minuartia SMEJKALI* – Dvořáková 1988; *M. corcontica* – Dvořáková 1999; *Cerastium alsinifolium* – Novák 1960), bývají mnohem více náchylní k hybridizaci, pokud se dostanou do sekundárního kontaktu. U specialistů, jejichž rozšíření je omezeno na specifické stanoviště (např. hadcové či horské reliky), je jejich gene pool omezen kvůli dlouhodobé izolaci (díky specifickým ekologickým podmínkám). Populace těchto taxonů jsou často obklopeny mnoha relativně příbuznými genotypy, se kterými se mohou křížit (např. *Knautia* – Kolář et al. 2009, *Cerastium alsinifolium* – Vít et al. 2014).

Jedním z přehlížených fenoménů týkajících se hybridizace je tzv. antropohybridizace (Wójcicki 1991), která popisuje proces hybridizace s účastí pěstovaných nebo introdukovaných taxonů. Přenos jejich genů do nativních taxonů může mít neblahé následky (Abbott 1992, Bleeker et al. 2007, Campbell et al. 2009). Antropohybridizace je umožněna absencí reprodukčně izolačních mechanismů mezi nativními taxony a pěstovanými taxony. Antropohybridizace jako fenomén je kromě introdukce pěstovaných taxonů podporována fragmentací krajiny a změnami biotopů způsobenými člověkem (Allendorf et al. 2001). Důsledky antropohybridizace byly v současné době prezentovány např. u *Prunus fruticosa* (Musilová 2013) či *Malus sylvestris* (Cornille et al. 2013).

Zjištění, zda hybridizace je přirozeného či antropogenního původu může pomoci v ochranářské praxi při nastavování vhodného managementu u populací vzácných taxonů zasažených hybridizací. Současně je diskutováno, zda se má populacím vzácných taxonů zasažených hybridizací dostávat stejných ochranářských aktivit jako populacím bez vlivu hybridizace (eg. Thompson et al. 2009). Snahy ochranářů by měly být spíše zacíleny na čisté populace, než na záchranu populací zasažených vysokým stupněm hybridizace (např. odstraňováním nepůvodních taxonů a hybridů; Allendorf et al. 2001). V dizertační práci jsou kladený otázky týkající se vlivu mezidruhové hybridizace na populace vzácných rostlin s důrazem na ochranářské důsledky a zhodnocení jejich ohrožení.

Problematika studovaných taxonů

Cerastium alsinifolium Tausch (Smejkal 1990, Kaplan 2012) je kriticky ohrožený hadcový endemit západních Čech (Grulich 2012, Kaplan 2012). Vyskytuje se na území CHKO Slavkovský les, celkový areál druhu nepřesahuje 15 km² (Tájek et al. 2012). *Cerastium alsinifolium* se vyskytuje ve dvou zcela odlišných hadcových biotopech – suché trávníky hadcových výchozů a polostinná prameniště vlhkých hadcových lesů (Melichar 2005, Tájek et al. 2012). V několika populacích roste sympatricky s dalším velkokvětým rožcem – *C. arvense*, který je široce rozšířený na suchých trávnících a poloruderálních stanovištích po celé Evropě (Smejkal 1990). *Cerastium arvense* je relativně tolerantní k půdě s obsahem těžkých kovů (Levine & Greller 2004) a ve Slavkovském lese roste i na hadcových výchozech či v jejich bezprostředním okolí. Potenciální hybridizace mezi oběma taxony byla v minulosti několikrát zmiňována (Smejkal 1990, Hrouda 2002, Rybka et al. 2004), avšak nikdy nebyla dokázána řádnou biosystematickou studií. Současně nebyly nikdy zhodnoceny případné následky hybridizace pro biologii vzácného taxonu.

Ve střední Evropě se vyskytují dva původní druhy leknínů - *Nymphaea alba* a *N. candida*. Vymezení těchto druhů není zcela jasné, zvláště díky morfologické podobnosti, vysoké fenotypové plasticitě a udávané hybridizaci. Situace je nadále komplikována výskytem zahradních kultivarů. Jedinci s přechodnou morfologií byly dříve prezentovány jako mezidruhoví hybridní (Heslop-Harrison 1955, Ejankowski & Małysz 2011), ačkoliv jejich status nebyl dostačně potvrzen. Mezidruhová hybridizace leknínů je považována za velmi běžnou i vzhledem k vysokému počtu zahradnických kultivarů vzniklých hybridizací (Slocum 2005). Zahradnické kultivary jsou často (ať již schválně či náhodně) introdukovány do přírodních biotopů, kde mohou přežívat po velmi dlouhou dobu a interagovat s původními taxony. Odlišení kultivarů a původních taxonů pouze na základě morfologických charakteristik je velmi obtížné a často dochází k záměnám.

V současnosti je ve střední Evropě rozlišováno šest diploidních druhů rodu *Diphasiastrum*. Tři jsou považovány za základní druhy, tři jsou hybridního původu (ač tradičně pojímané jako druhy). Ve střední Evropě se plavuníky často vyskytují ve smíšených populacích a mohou vytvářet výrazné

hybridní roje. V rámci nich je určování jednotlivých druhů složité. Smíšené populace se nejčastěji vyskytují na člověkem silně ovlivněných stanovištích – sjezdovkách, průsekách, lesních překladištích dřeva apod. Hybridní původ tří taxonů byl potvrzen teprve nedávno pomocí low-copy jaderných markerů a velikosti genomu (*D. ×issleri*, *D. ×oellgaardii* a *D. ×zeilleri*; Aagaard et al. 2009a, 2009b). Tato studie také naznačila možnost zpětné hybridizace u Evropských zástupců rodu *Diphasiastrum*. Frekvence hybridizace, vliv na složení populací a případný vliv člověka nebyl doposud studován.

Taxonomická problematika rodu *Sorbus* pramení z rozeznávání a popisování nových taxonů, které vznikají hybridizací diploidních [*S. terminalis* (L.) Crantz, *S. aucuparia* L. a *S. chamaemespissus* (L.) Crantz] a tetraploidních druhů [taxony skupiny *S. aria* (L.) Crantz]. Hybridní linie či hybridogenní druhy (mikrospecie) jsou polyploidní a vznikají buď za účasti neredukovaných gamet případně zmíněnou hybridizací diploidů s polyploidy. Jejich evoluční úspěch je podmíněn přechodem k agamospermickému způsobu reprodukce, který může být doplněn zbytkovou sexualitou (Proctor et Groenhof 1992, Robertson 2004). Nově vzniklé linie mohou na stanovištích přežívat po mnoho let a dále ovlivňovat strukturu populací rodičovských taxonů (např. díky životaschopnému pylu; Ludwig et al. 2013). Mikrospecie mohou vznikat opakovaně ze stejných rodičovských kombinací a vykazovat obdobné morfologické vlastnosti s nepatrnými rozdíly způsobenými rozdílnými rodičovskými genotypy. Většina těchto linií je popisována jako samostatné taxonomy (viz současný počet druhů v rámci flóry ČR; Kaplan 2012). V poslední studii je prezentována biosystematická revize jeřábu krasového (*S. eximia*). Dříve byl dáván za příklad taxonu, u kterého se vyskytuje dvě různé ploidní úrovně (diploidní a tetraploidní; Jankun et Kovanda 1988) a vyskytuje se agamospermie, a to i na diploidní úrovni. Tento fakt byl často citován (Nelson-Jones 2002, Talent et Dickinson 2006, Dobeš et al. 2013), avšak nebyl věrohodně ověřen.

2) Cíle práce

- 1 - Zhodnotit rizika mezidruhové hybridizace u vybraných vzácných rostlin České republiky.
- 2 - Posoudit vhodnost využití jednotlivých metodických přístupů pro identifikaci hybridů (včetně karyologických, fenetických a molekulárních technik).
- 3 - Objasnit potenciální vliv člověka na míru hybridizace studovaných vzácných taxonů.

3) Materiál a metodika

Materiál pro všechny studie byl sbírána během vegetačních sezón v letech 2005-2012 v České republice a přilehlých státech. Pro srovnávací účely byly použity vzorky z Britských ostrovů a Skandinávie (studie *Diphasiastrum*). Každá populace byla zaměřena pomocí GPS, sbírány byly pouze nejnutnější části rostlinných pletiv. Ke zpracování materiálu byly využity následující metodické přístupy:

Průtoková cytometrie

Absolutní velikost jaderného genomu (C-values; Greilhuber et al. 2005) a DNA ploidní úroveň (Suda et al. 2006) byly měřeny dle metodiky detailně popsané Doleželem (Doležel et al. 2007). Byla zaznamenávána intenzita fluorescence 3.000-5.000 částic. Analýzy byly vyhodnocovány v programu Flomax 2.4b, dále byly analyzovány pouze histogramy s CV nepřesahujícím 6%. Rozdíly ve velikosti genomu byly testovány pomocí procedury GLM (general linear model) v programu SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Numerická morfometrika

Ke zhodnocení morfologické variability bylo vždy měřeno několik znaků na sterilních i fertilních částech studovaných rostlin. Dobře vyvinuté části rostlin byly buď rovnou použity k měření nebo zaherbářovány pro pozdější využití. Základní popisné statistiky byly vypočteny procedurou UNIVARIATE v programu SAS (ver. 9.2). Potenciální korelace mezi znaky byly sledovány pomocí Pearsonova a neparametrického Spearmanova korelačního koeficientu. Po dosažení hodnoty těsné korelace (>0.95) byl jeden ze znaků vyřazen. Morfometrická data byla dále analyzována procedurami PRINCOMP, CANDISC, DISCRIM a STEPDISC v programu SAS (ver. 9.2) dle metodiky detailně popsané Rosenbaumovou (Rosenbaumová et al. 2004). Vzhledem k tomu, že data neměla dle Wilks-Shapiro testu normální rozdělení, byla využita neparametrická funkce k-nearest neighbour a neparametrické korelační koeficienty.

Geometrická morfometrika a eliptická Fourierova analýza

Fotografie drobnějších morfologických znaků byly pořízeny pomocí fotoaparátu Olympus C-7070 na binokulární lupě Olympus SZX12, v případě větších listů skenovány přímo A3 skenerem. Ke zhodnocení tvarové variability byla využita metoda thin plates spline s klouzavými semilandmarky (Bookstein 1997, Zelditch et al. 2004). Eliptická Fourierova analýza pak byla využita pro objasnění tvarových charakteristik na listech. Tvarová variabilita byla zhodnocena metodou eliptické Fourierovy approximace (Kuhl & Giardina 1982) s využitím programu SHAPE 1.2 (Iwata & Ukai 2002). Detaily k analýzám jsou uvedeny v jednotlivých pracích (Vít et al. 2012, Hanušová et al. 2014 a Kabátová et al. 2014).

Pylová viabilita a aborce výtrusů

Fitness u jednotlivých taxonů (studie *Diphasiastrum*) byla odhadována pomocí podílu abortovaných výtrusů. Výtrusy byly považovány za abortované jestliže neobsahovaly protoplast nebo byly zhroucené (Quintanilla et Escudero 2006). Počet abortovaných výtrusů byl studován pod světelným mikroskopem (Olympus CH30) pod 100× zvětšením.

Pylová viabilita byla hodnocena podle protokolu Petersona (Peterson et al. 2010). Z každé rostliny byly použity dva prašníky, ty byly vypreparovány na podložním sklíčku, obarveny a sledovány pod světelným mikroskopem (Olympus BX41) při 100× zvětšení.

4) Výsledky a diskuse

Ačkoliv v posledních desetiletích bylo věnováno mnoho pozornosti studiu vzácných taxonů rostlin, většina z nich nezahrnovala komplexní biosystematický pohled. Obecně tyto dva obory (biosystematika a ochranářská biologie) byly velmi zřídka propojeny. Naštěstí v posledních letech se biosystematické studie s ochranářským dopadem objevují mnohem častěji (Hedrén et al. 2012, Moreira et al. 2013).

Předkládaná dizertační práce představuje tři různé případy mezidruhové hybridizace zahrnující vzácné druhy. Koexistence hybridů s rodičovskými taxony byla objevena u rožců (*Cerastium alsinifolium* / *C. arvense*). Vzhledem k absenci zpětných kříženců není hadcový endemit *C. alsinifolium* ohrožen hybridizací přímo, ale trpí spíše kompeticí o zdroje (záření, živiny, opylovači). Nedochází tedy ke smývání genetické integrity rodičovských taxonů, s největší pravděpodobností jsou hybridni pouze F1 generace. Díky kompetici na nelesních hadcových stanovištích však může dojít k vytlačení endemita hybridy. Primárním stanovištěm *C. alsinifolium* jsou s největší pravděpodobností řídké vlhké hadcové lesy, které hostí čisté populace a měla by jim být z ochranářského hlediska věnována největší pozornost.

Měření pomocí průtokové cytometrie odhalilo 45% rozdíl v absolutní velikosti genomu mezi dvěma nativními druhy leknínů – *Nymphaea alba* a *N. candida*. Navíc bylo zjištěno, že zahradnické kultivary od nich lze jednoznačně odlišit, opět na základě rozdílné (menší) velikosti genomu. Statistická analýza umožnila jednoznačnou diferenciaci jednotlivých taxonů i kultivarů na základě měřených morfologických znaků. Ačkoliv morfologicky přechodní jedinci byli dříve často považováni za hybridy, naše výsledky potvrdily, že k hybridizaci dochází v České republice pouze sporadicky (cca 1,8% analyzovaných vzorků). Oba přirozeně se vyskytující taxony tedy nejsou ohroženy přímo hybridizací, ale mohou být ohroženy introdukovanými hybridními kultivary. Zásadním zjištěním práce byl fakt, že nepůvodní kultivary se vyskytují v přirozených podmírkách ve velké míře a jsou s nativními taxony často zaměňovány.

Frekvence mezidruhové hybridizace jednotlivých druhů plavuníků (*Diphasiastrum*) a její důsledky byly zhodnoceny ve třetí studii pomocí velikosti genomu, numerické a geometrické morfometriky. Ačkoliv se velikosti genomu základních druhů liší, po zahrnutí hybridních druhů vzniklo kontinuum. Nejsložitější pattern byl nalezen u *D. ×issleri* and *D. ×oellgaardii*. Jejich velikost genomu se úplně překrývá, ačkoliv vznikly z různých rodičovských kombinací. Nejvyšší variabilita byla pozorována v několika populacích složených ze všech šesti taxonů a ve smíšených populacích *D. alpinum* a *D. tristachyum*. Na druhé straně, v rámci populací jednotlivých taxonů byla nalezena velmi nízká variabilita ve velikosti genomu. Podobný pattern vykazovala jak numerická tak geometrická morfometrika. Předpokládaná introgresivní hybridizace má ve smíšených populacích za následek smývání hranic mezi taxony a z praktického hlediska znemožňuje jejich jednoznačnou determinaci.

Poslední studie se zabývala původem a vymezením endemita Českého krasu – *Sorbus eximia*. V rámci biosystematického zhodnocení byl popsán nový taxon *S. barrandienica*. Průtoková cytometrie nepotvrdila výskyt dvou ploidií u *S. eximia* (diploidní a tetraploidní) a současně agamospermický reprodukční způsob u diploidních jedinců. Všechny nalezené rostliny byly triploidní, včetně *S. barrandienica*. Genetická variabilita obou taxonů byla velmi nízká, což naznačuje jejich jednorázový vznik a agamospermický způsob reprodukce. Ten také umožňuje dlouhodobé přežívání taxonů v populacích.

5) Závěry

Ve čtyřech studiích byly představeny různé vlivy hybridizace na vzácné druhy rostlin. Na jedné straně jsou některé taxony (hybridogenní zástupci rodu *Sorbus*) hybridizací přímo generovány a přechod na agamospermický způsob reprodukce umožnuje konzervaci tohoto taxonu v čase (tj. dlouhodobá existence na stanovišti bez dalšího vlivu rodičovských taxonů). Na straně druhé byl odhalen více či méně závažný vliv hybridizace přímo na vzácné rostliny. Ojedinělé hybridizační události nemají téměř žádný vliv na populace leknínů (*N. alba* a *N. candida*), na druhé straně výrazně více jsou ohroženy introdukcí hybridních kultivarů, které se dostávají do volné přírody z kultur a jsou naturalizovány v biotopech vhodných i pro původní taxonomy. Ačkoliv je hybridizace hadcového rožečku (*C. alsinifolium*) na nelesních stanovištích Slavkovského lesa masivní, nepředstavuje pro endemický taxon zásadní ohrožení. Ke zpětnému křížení nedochází, navíc se v hadcových lesích vyskytuje velmi početné čisté populace *C. alsinifolium*. Tendence k introgresivní hybridizaci byla odhalena v poslední studii, kde systém šesti druhů (3 základní a 3 hybridní druhy rodu *Diphasiastrum*) tvoří ve smíšených populacích morfologické a karyologické kontinuum. Hranice mezi taxony jsou v těchto populacích smytné, jako nejpravděpodobnější důvod se jeví introgresivní hybridizace.

1) Introduction

Hybridization plays an important role in the evolution of living organisms. It is the basic mechanism of processes such as introgression of diverse phenotypic traits between diverged taxa or hybrid speciation. Most flowering plants and ferns originated through (allo-)polyploidization (= hybridization followed by genome duplication), which is supposed to be the most powerful “engine” of plant evolution (Soltis et al. 2009). Hybridization plays a striking role in human “nutrition evolution”. Although the first written evidence is dated back to the early 18th century, hybridization has been important to humans since the Neolithic era (Rieseberg et Carney 1998). When domestication and breeding of plants and animals was in its infancy, hybridization events happened mostly accidentally and inadvertently. Later, by selecting crops (or breeds) carrying required characters, hybridization of closely related species or local races became intentional and increased in intensity.

In early studies devoted to hybridization, several incorrect presumptions had been made. Hybridization had been considered a “blind alley” of evolution because of assumed hybrid sterility (Grant 1981, Rieseberg et Carney 1998, Ouyang et al. 2010). The evolutionary impact of hybridization was once enormously underestimated due to presumed rarity of this phenomenon (Knobloch 1972). Although botanists have paid considerable attention to hybridization (Rhymer et Simberloff 1996), it has been proved in the last decades that hybridization plays an inestimable role not only in plant, but also in animal evolution (Dowling et Secor 1997, Hegarty et Hiscock 2005, Wissemann 2007, Soltis et Soltis 2009).

Hybridization is essential for generating new evolutionarily independent lineages (which may ultimately develop into new species); on the other hand, it can have a detrimental effect on populations of rare species. These may suffer from hybridization with common congeners, resulting in blurring of boundaries between taxa and threatening species’ genetic integrity. Low abundance of individuals, low number of populations, marginal populations and discontinuous range of distribution

are the main “natural” reasons rare species are under threat. During the last century, human influence considerably increased the risk of rare species becoming extinct, eg. by landscape fragmentation, changes in traditional landscape management, habitat loss and degradation, etc. Rare species represent an important component of both local and global biodiversity and are often regarded as indicators of biodiversity richness (Heywood et Iriondo 2003). They often have narrow ecological niches, which are patchily distributed in the modern landscape. Spatially-limited species include endemics of particular geographic regions (Kaplan 2012). The present thesis addresses questions concerning cases of interspecific hybridization that involve at least one rare species, with an emphasis on conservation consequences including a risk assessment.

Human-triggered hybridization involving rare species

In cases of rare species, the consequences of hybridization may be even stronger because their populations are often small or occur at the margins of the species’ distribution areas. Microevolutionary processes (eg. speciation, inbreeding depression, bottleneck effect, genetic drift) act more readily in small populations than in large populations (Rhymer et Simberloff 1996). Consequently, both beneficial and harmful consequences of hybridization (genesis of new evolutionary units vs. potential extinction of populations) are more striking (Rieseberg and Ellstrand 1993). Many rare species originated from widely distributed relatives (textbook examples from the Czech flora are *Minuartia SMEJKALI* – Dvořáková 1988; *M. corcontica* – Dvořáková 1999; *Cerastium ALSINIFOLIUM* – Novák 1960), and are therefore more prone to hybridize with their progenitors. Among insular-like specialists (eg. serpentine or mountain relicts) is distribution and gene pool limited due to long-term isolation to specific ecological conditions, but are surrounded by many related and potentially crossable genotypes (eg. *Knautia* – Kolář et al. 2009, *Cerastium ALSINIFOLIUM* – Vít et al. 2014).

One still overlooked phenomenon is so-called anthropohybridization (Wójcicki 1991), which refers to hybridization processes with the participation of cultivated or human-introduced species. Such species might have detrimental effects on related native plants. Dilution of their gene pool and gene transfer from crops/aliens are of the most important consequences of anthropohybridization (Abbott 1992, Bleeker et al. 2007, Campbell et al. 2009). Recent examples in which anthropohybridization has been recorded are *Prunus fruticosa* (Musilová 2013) or *Malus sylvestris* (Cornille et al. 2013). Anthropohybridization is largely facilitated by the absence of reproductive isolation mechanisms between crops/aliens and rare species. Crop cultivars often originated in different parts of the world. Reproductive isolation mechanisms are therefore often missing; when cultivars and native taxa come into contact, they may hybridize freely (Ellstrand et al. 1999). Contact between introduced and native taxa is facilitated by three main human activities: plant introduction, landscape fragmentation and habitat modification (Allendorf et al. 2001). Determining whether hybridization is of natural or anthropogenic origin is crucial for conservationists, whose task is to set up appropriate management plans and to take necessary actions. Human-induced changes in habitats may lead to secondary contact of previously separated species, promoting their hybridization (Rhymer et Simberloff 1996; eg. in *Viola lutea* subsp. *sudetica* × *V. tricolor* (Krahulcová et al. 1996), *Senecio hercynicus* × *S. ovatus* (Raudnitschka et al. 2007), *Arctium lappa* / *A. tomentosum* × *A. minus* (Repplinger et al. 2007), *Cerastium ALSINIFOLIUM* × *C. arvense* (Vít et al. 2014) or *Diphasiastrum* species (Hanušová et al. 2014).

A recurrent issue in conservation biology is whether populations with hybridizing rare species should receive the same conservation effort as non-hybridizing populations (eg. Thompson et al. 2009). Efforts should be targeted at maintaining remaining pure populations rather than at trying to save population already affected by high degrees of hybridization (eg. removal of non-native species and hybrids or restoration of habitats; Allendorf et al. 2001). Generally, biosystematic studies of species complexes with rare or endangered taxa threatened by hybridization with common relatives or intricate agamic complexes are highly appreciated by conservationists. Such studies allow them to better evaluate the risks of hybridization based on knowledge of reproductive modes, hybrid frequency and other important facts. The key question surrounding all conservation efforts undoubtedly is "How do we recognize hybrids?".

Species under study

Cerastium alsinifolium Tausch (Smejkal 1990, Kaplan 2012) is an outcrossing serpentine endemic of western Bohemia (Slavkovský les Mts). The total area occupied by this species does not exceed 15 km², with all sites situated within the Protected Landscape Area Slavkovský les (Tájek et al. 2012). *Cerastium alsinifolium* is a critically endangered plant in the Czech flora (Grulich 2012, Kaplan 2012). Currently, *C. alsinifolium* is reported from two rather contrasting types of habitat on serpentine bedrock, namely dry open grassland on rocky outcrops, and (semi)shaded springs and seeps in coniferous forests (Melichar 2005, Tájek et al. 2012). At several sites in the Slavkovský les Mts, it co-occurs with another perennial large flowered species, *C. arvense*, which is widely distributed in Europe and usually inhabits dry grasslands or semiruderal sites (Smejkal 1990). *Cerastium arvense* is relatively tolerant of soils with a high heavy metal content (Levine & Greller 2004), and in the Slavkovský les Mts it occasionally grows on outcrops of serpentine or in their immediate vicinity. Potential hybridization between serpentine endemic *Cerastium alsinifolium* and its widespread counterpart *C. arvense* in the Slavkovský les Mts has been suspected for a long time (Smejkal 1990, Hrouda 2002, Rybka et al. 2004). It has, however, not been proved by biosystematic approaches. Possible evolutionary consequences of the hybridization also remain unknown.

Two native *Nymphaea* species occur in Central Europe – *N. alba* and *N. candida*. Species boundaries between them are blurred by overall morphological similarities, high phenotypic plasticity and possible interspecific hybridization. The situation is further complicated by the occurrence of many garden cultivars. Morphological similarities are at least partly caused by close evolutionary relationships between *N. alba* and *N. candida* (Volkova et al. 2010). Individuals with intermediate morphologies have often been interpreted as interspecific hybrids (Heslop-Harrison 1955, Ejankowski & Małysz 2011) although their hybrid status has only rarely been evidenced. The few exceptions include crosses between *N. alba* and *N. candida* (= *N. × borealis* Camus) from several sites in Germany and Sweden, confirmed by AFLP fingerprints (Werner & Hellwig 2006, Nierbauer et al. 2014). Natural interspecific hybridization in *Nymphaea* seems to be quite extensive, as indicated by the great number of horticultural crosses (Slocum 2005). Garden cultivars have been repeatedly introduced, be it accidentally or intentionally, into natural habitats, where they can survive for long periods and potentially interact (compete or mate) with native plants. Reliable discrimination between escaped white-flowered cultivars and native species on the basis of morphological traits is difficult, if not impossible.

Six diploid *Diphasiastrum* taxa are traditionally recognized in Europe: three (basic) species and three morphologically intermediate hybrids traditionally treated as species. Mixed populations

frequently occur in Central Europe and often form apparent hybrid swarms. Species determination is quite problematic in mixed populations and especially in hybrid swarms occurring in man made habitats (eg. ski slopes, deforested strips). A number of factors complicate investigations of hybridization patterns in *Diphasiastrum*: simple morphology with few characters suitable for evaluation, high phenotypic plasticity and impossibility to accomplish hybridization experiments due to mycorrhizal gametophytes (Wilce 1961, 1965, Whittier 1977, Vogel et Rumsey 1999). The patterns of hybridization in *Diphasiastrum* have recently been addressed using two types of markers: low-copy nuclear genes and genome size. Sequences of three regions of the nuclear genome confirmed the hybrid status of *D. ×issleri*, *D. ×oellgaardii* and *D. ×zeilleri* (Aagaard et al. 2009a, 2009b). This study also indicates certain levels of recent hybridization and backcrossing within European *Diphasiastrum*. Its frequency and variation patterns in natural populations remain unknown, however. On the contrary, discrete variation in genome size in several parts of Europe indicates only primary hybridization with no hint of backcrossing (except for a few rare triploid hybrids) or introgression (Bennert et al. 2011).

In the genus *Sorbus*, taxonomic difficulties stem from recognizing and describing new species originating through hybridization of diploid sexual species [taxa from the group of *Sorbus aria* (L.) Crantz × *S. torminalis* (L.) Crantz, × *S. aucuparia* L. and × *S. chamaemespilus* (L.) Crantz]. Primary hybrids occur spontaneously and are of the same ploidy level as their parents (Meyer et al. 2005). Hybrid lineages and stabilized hybridogenous species (or so-called microspecies) have higher ploidy levels, indicating their formation through unreduced gametes or through hybridization of polyploids. Their evolutionary success is connected to agamospermy (apospory), which can be accompanied by residual sexuality (Proctor et Groenhof 1992, Robertson 2004). Newly originated lineages can persist *in situ* for many years and further shape the population structure of parental species (eg. as pollen donors; Ludwig et al. 2013). Microspecies may originate recurrently from the same parental combination and exhibit highly similar morphology with negligible differences due to distinct parent genotypes. Most discovered stabilized lineages are subsequently described as new species (see the number of *Sorbus* taxa in the flora of the Czech Republic; Kaplan 2012).

Biosystematic evaluation of *Sorbus eximia* is presented in the last study. It was a textbook example of diploid-tetraploid species with agamospermous mode of reproduction (including agamospermy at the diploid level; Jankun et Kovanda 1988). This exceptional diploid agamospermy was several times cited (Nelson-Jones 2002, Talent et Dickinson 2006, Dobeš et al. 2013), but never been reliably confirmed.

2) Aims of the thesis

- 1) To evaluate the risk of interspecific hybridization in selected rare species native to the Czech Republic
- 2) To assess the value of different methodological approaches (incl. karyological, phenetic and molecular techniques) for hybrid identification
- 3) To elucidate the human impact on the hybridization of rare plant species under investigation

3) Material and methods

Material for all studies was collected during 2005-2012 vegetative seasons in Czech Republic and adjacent regions. For comparative purposes, several Scandinavian and British Isles populations were also sampled (*Diphasiastrum* part). Each population was localized using a GPS device (Garmin eTrex Legend; WGS 84). Following methodological approaches were adopted:

Flow cytometry

Absolute genome sizes (C-values; Greilhuber et al. 2005) and DNA ploidy levels (Suda et al. 2006) were determined following methodology of Doležel et al. 2007. Fluorescence intensity of 3.000-5.000 particles was recorded. Analyses were scored in Flomax 2.4b software, histograms not exceeding a 6% coefficient of variance (CV) of G0/G1 peaks were analyzed further. Differences in genome size values were tested using a general linear model (GLM, due to unbalanced data design) in the SAS 9.2 package (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Numerical morphometrics

In order to examine morphological variation several characters were measured. Well developed parts were dried or directly used for morphometrics. Basic descriptive statistical parameters were computed for each of the characters using the UNIVARIATE procedure in SAS (ver. 9.2). The correlative relationship among the characters was investigated using Pearson's correlation and the non-parametric Spearman's rank coefficients to detect high correlations (>0.95) and avoid distortion of the multivariate analysis. Morphometric data were further analysed using PRINCOMP (principal component analysis), CANDISC (canonical discriminant analysis), DISCRIM (classification discriminant analysis) and STEPDISC (stepwise discriminant analysis with forward or stepwise selection of characters) procedures in SAS (ver. 9.2) following Rosenbaumova et al. (2004). Individual plants were used as operational taxonomic units (OTUs). Because the data distributions within groups were not multivariately normal (Wilks-Shapiro test), the non-parametric k-nearest neighbour discriminant function and non-parametric correlation coefficients were employed. Discriminant power was determined by cross-validation (Klecka 1980).

Geometric morphometrics and elliptic Fourier analysis

Photographs (RGB color images – JPG) of selected characters were taken using an Olympus C-7070 digital camera mounted on an Olympus SZX12 binocular microscope) to investigate the variation in the shape and position of leaves using the thin plate spline method with sliding semilandmarks (Bookstein 1997, Zelditch et al. 2004). Elliptic Fourier analysis was applied to elucidate the variation in leaf shape. The method of elliptic Fourier approximation (Kuhl & Giardina 1982) incorporated in the SHAPE 1.2 software package (Iwata & Ukai 2002) was employed to describe the variation in leaf shape of species. For details see Vít et al. 2012 and Hanušová et al. 2014.

Spore abortion percentage and pollen viability estimation

The spore abortion percentage was estimated in order to confirm the spore fitness of individual taxa. Spores were considered aborted when they lacked a protoplast or were collapsed

(Quintanilla et Escudero 2006). Spores were investigated under a light microscope (Olympus CH30) under 100× magnification.

Pollen viability was estimated using the protocol detailed by Peterson et al. (2010). Two anthers per individual were then dissected on a microscopic slide, stained, and the slides were observed using a light microscope (Olympus BX41) at a 100× magnification. At least two hundred pollen grains per sample were assessed.

4) Results and discussion

Although much attention has been paid to the conservation of rare species during the last decades, most studies have not taken a complex biosystematic approach. The conservation and biosystematic points of view have rarely been integrated in a single study. Fortunately, recent years have seen significant progress, which is manifested by the publication of research papers at the interface between conservation and biosystematics (eg. Hedrén et al. 2012, Moreira et al. 2013).

The thesis presents three cases of interspecific hybridization involving rare species. Hybrids coexist with parental taxa in the *Cerastium alsinifolium/C. arvense* system. The Czech serpentine endemic *C. alsinifolium* is threatened by competition from hybrids over both abiotic and biotic resources (light, nutrients and pollinators). Considering the absence of backcrosses, hybridization does not seem to severely affect the gene pool of the endemic species. Its genetic integrity will thus most likely be preserved. Nevertheless, in open sites, hybrids usually dominate over *C. alsinifolium* and may possibly outcompete it. Interspecific hybridization is much less pronounced in forest sites, which host core populations of the endemic and are therefore a conservation priority.

Flow-cytometric measurements revealed a ca 45% difference in genome sizes between *Nymphaea alba* and *N. candida*. Moreover, the genome sizes of *Nymphaea* cultivars were considerably lower than those of native species. Statistical analyses of morphological characters allowed reliable phenotypic delimitation of both *Nymphaea* species and garden cultivars. Although morphotypes with intermediate values of characters and/or a mosaic-like combination of characters have often been interpreted as interspecific hybrids, our results indicate that interspecific hybridization under natural condition is quite rare (at least in the Czech Republic), and a hybrid origin was confirmed in only eleven out of 612 analysed plants (ca 1.8%). Native *Nymphaea* species are thus not directly threatened by interspecific hybridization. An important finding is the frequent occurrence of accidentally or intentionally introduced *Nymphaea* cultivars in more or less natural habitats in the Czech Republic. It is likely that white-flowered cultivars have previously often been confused with indigenous species.

The frequency of interspecific hybridization among *Diphasiastrum* species and its consequences were evaluated using genome size analysis, and numerical and geometric morphometrics. Although genome sizes of basic taxa tend to differ, hybrids often form phenotypic continua. The most intricate genome size values were found in *D. ×issleri* and *D. ×oellgaardii*. The genome sizes of these hybridogenous species completely overlap even though they originated from different parental combinations. Very low genome size variation was detected in single-taxon populations. The highest variation was found in several populations that consisted of all six species,

and in mixed populations comprising both *D. alpinum* and *D. tristachyum*. A similar pattern of variation was subsequently observed in both numerical and geometric morphometrics.

The origin of the hybridogenous species *Sorbus eximia* was elucidated, and a new species (*S. barrandienica*) was recognized during the biosystematic revision of the *Sorbus eximia* group in the Bohemian Karst. Flow cytometry did not confirm the existence of two ploidy levels (di- and tetraploid) and reported agamospermy at the diploid level (Jankun et Kovanda 1988). All accessions of *S. eximia* and *S. barrandienica* turned out to be triploid. The genetic variation of both investigated species was extremely low, indicating their single origins. Long-term persistence of their populations was most likely facilitated by their agamospermous mode of origin.

5) Conclusions

Different outcomes of hybridization were presented in four studies. Several hybridogenous *Sorbus* species (here *S. eximia* and *S. barrandienica*) are directly generated by hybridization. Their long term *in situ* persistence (without the influence of parental species) is maintained by agamospermous mode of reproduction. On the other hand, more or less serious impact of hybridization on rare species was revealed in the remaining three studies. Rare hybridization events have minute influence on indigenous *Nymphaea* populations. They are more threatened by introduced horticultural hybrid cultivars, which escaped from gardens to natural habitats. Although the hybridization of serpentine endemic *Cerastium alsinifolium* is extensive in open sites, genetic integrity of this taxon is not jeopardized. Backcrosses were not observed and main species reservoir is constituted by pure serpentine forest populations. Tendency towards to introgressive hybridization was detected in the last study, where morphological and karyological continuum was created by six *Diphasiastrum* species. Species boundaries are blurred through frequent hybridizations, which are most probably enabled by human activities.

6) References

- Aagaard S. M. D., Vogel J.C. & Wilkstrom N. (2009a): Resolving maternal relationships in the clubmoss genus *Diphasiastrum* (Lycopodiaceae). – *Taxon* 58: 835-848.
- Aagaard S. M. D., Greilhuber J., Zhang X. C. & Wikstrom N. (2009b): Occurrence and evolutionary origins of polyploids in the clubmoss genus *Diphasiastrum* (Lycopodiaceae). – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 746-754.
- Abbott R. J. (1992): Plant invasions, interspecific hybridization, and the evolution of new plant taxa. – *Trends in Ecology and Evolution* 7: 401-405.
- Allendorf F. W., Leary R. F., Spruell P. & Wenburg J. K. (2001): The problems with hybrids: setting conservation guidelines. – *Trends in Ecology and Evolution* 16/11: 613-622.
- Bleeker W., Schmitz U. & Ristow M. (2007): Interspecific hybridisation between alien and native plant species in Germany and its consequences for native biodiversity. – *Biological Conservation* 137: 248-253.
- Bookstein F. L. (1997): Landmark methods for forms without landmarks: localizing group differences in outline shape. – *Medical Image Analysis* 1: 225–243.
- Campbell L. G., Snow A. A., Sweeney P. M. & Ketner J. M. (2009): Rapid evolution in crop-weed hybrids under artificial selection for divergent life histories.- *Evolutionary Applications* 2: 172-186.
- Cornille A., Gladieux P. & Giraud P. (2013): Crop-to-wild gene flow and spatial genetic structure in the closest wild relatives of the cultivated apple. – *Evolutionary Applications* 6: 737-748.
- Dobeš C., Lückl A., Hülber K. & Paule J (2013): Prospects and limits of the flow cytometric seed screen – insights from *Potentilla* sensu lato (Potentilleae, Rosaceae). - *New Phytologist* 198: 605-616.

- Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – *Nature Protocols* 2: 2233–2244.
- Dowling T. E. & Secor C. L. (1997): The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 593–619.
- Dvořáková M. (1988): *Minuartia SMEJKALII*, eine neue Art aus der *Minuartia gerardii*-Gruppe (Caryophyllaceae). – *Preslia* 60: 1–9.
- Dvořáková M. (1999): Zwei neue zur Sektion Polymechana gehörende *Minuartia*-Arten (Caryophyllaceae). – *Preslia* 70: 335–338.
- Ejankowski W. & Małysz B. (2011): Morphological variability of the water lily (*Nymphaea*) in the Polesie Zachodnie region, Eastern Poland. – *Biologia* 66: 604–609.
- Grant V. (1981): Plant speciation. New York, Columbia University Press.
- Greilhuber J., Doležel J., Lysák M. A. & Bennett M. D. (2005): The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “genome size” and “C-value” to describe nuclear DNA contents. – *Annals of Botany* 95: 255–260.
- Grulich V. (2012): Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. – *Preslia* 84: 631–645.
- Hanušová K., Ekrt L., Vít P., Kolář F. & Urfus T. (2014): Continuous morphological variation correlated with genome size indicates frequent introgressive hybridization among *Diphasiastrum* species (Lycopodiaceae) in Central Europe. – *Plos One* (accepted).
- Hedrén M., Nordström S., Pedersen H. A. E. & Stahlberg D. (2012): Systematics and conservation genetics of *Dactylorhiza majalis* ssp. *elatior* (Orchidaceae) on Gotland. – *Nordic Journal of Botany* 30: 257–272.
- Hegarty M. J. & Hiscock S. J. (2005): Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. – *New Phytologist* 165: 411–423.
- Heslop-Harrison Y. (1955): *Nymphaea* L. em. Sm. (nom. conserv.). – *Journal of Ecology* 43: 719–734.
- Heywood V. H. & Iriondo J. M. (2003): Plant conservation: old problems, new perspectives. – *Biological Conservation* 113: 321–335.
- Hrouda L. (2002): *Cerastium* L. In: Kubát K., Hrouda L., Chrtěk J. jun., Kaplan Z., Kirschner J. & Štěpánek J. [eds.]: Klíč ke květeně České Republiky [Key to the flora of the Czech Republic]. Academia, Praha.
- Iwata H. & Ukai Y. (2002): SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. – *Journal of Heredity* 93: 384–385.
- Jankun A. & Kovanda M. (1988): Apomixis at the diploid level in *Sorbus eximia* (Embryological studies in Sorbus 3). – *Preslia* 60: 193–213.
- Kabátová K., Vít P., & Suda J. (2014): Species boundaries and hybridization in Central-European *Nymphaea* species inferred from genome size and morphometric data. – *Preslia* 86: 131–156.
- Kaplan Z. (2012): Flora and phytogeography of the Czech Republic. – *Preslia* 84: 505–573.
- Knobloch I. W. (1972): Intergeneric hybridization in flowering plants. – *Taxon* 21: 97–103.
- Kolář F., Štech M., Trávníček P., Rauchová J., Urfus T., Vít P., Kubešová M. & Suda J. (2009): Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. – *Annals of Botany* 103: 963–974.
- Kuhl F. P. & Giardina C. R. (1982): Elliptic Fourier features of a closed contour. – *Computer Graphics Image Processing* 18: 236–258.
- Levine M. E. & Greller A. M. (2004): Ecological and floristic analyses of vascular plants along a gradient on disturbed serpentinite on opposing slopes in Staten Island, NY. – *Journal of Torrey Botanical Society* 131: 69–92.
- Ludwig S., Robertson A., Rich T. C. G., Djordjevic M., Cerovic R., Houston L., Harris S. A. & Hiscock S. J. (2013): Breeding systems, hybridization and continuing evolution in Avon Gorge *Sorbus*. – *Annals of Botany* 111: 563–575.
- Melichar V. (2005): Metodika monitoringu evropsky významného druhu rožec kuičkolistý (*Cerastium alsinifolium*). – Ms. Depon. in: AOPK, Praha.
- Meyer N., Meierott L., Schuwerk H. & Angerer O. (2005): Beiträge zur Gattung *Sorbus* in Bayern. – *Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft*. Sonderband: 5–216.
- Moreira O. C. B., Martins J. M., Sardos J., Maciel M. G. B., Silva L. & Moura M. M. T. (2013): Population genetic structure and conservation of the Azorean tree *Prunus azorica* (Rosaceae). – *Plant Systematics and Evolution* 299: 1737–1748.
- Musilová L. (2013): Assessing the threat of hybridization between *Prunus fruticosa* and cultivated Prunus species. Ms. Thesis. Depon. in: Knihovna katedry botaniky PřF UK, Praha.
- Nelson-Jones E. B., Briggs D. & Smith A. G. (2002): The origin of intermediate species of genus *Sorbus* – Theoretical and Applied Genetics 105: 953–963.
- Novák F. A. (1960): Fylogeneze serpentinových typů. [Phylogenesis of serpentine taxa] – *Preslia* 32: 1–8.

- Ouyang Y., Liu Y-G. & Zhang Q. (2010): Hybrid sterility in plant: stories from rice. – Current Opinion in Plant Biology 13: 186-192.
- Peterson R., Slovin J. P. & Chen C. (2010): A simplified method for differential staining of aborted and nonaborted pollen grains. – International Journal of Plant Biology 1: 66–69.
- Proctor M. C. F. & Groenhof A. C. (1992): Peroxidase isozyme and morphological variation in *Sorbus* L. in South Wales and adjacent areas, with particular reference to *S. porrigentiformis* E. F. Warb. – Watsonia 19: 21–37.
- Quintanilla L.G. & Escudero A. (2006) Spore fitness components do not differ between diploid and allotetraploid species of *Dryopteris* (*Dryopteridaceae*). – Annals of Botany 98: 609–618.
- Rhymer J. M. & Simberloff D. (1996): Extinction by hybridization and introgression. – Annual Review of Ecology and Systematics 27: 83-109.
- Rieseberg L. H. & Carney S. E. (1998): Plant hybridization. – New Phytologist 140: 599-624.
- Robertson A., Newton A. C. & Ennos R. A. (2004): Multiple hybrid origins, genetic diversity and population genetic structure of two endemic *Sorbus* taxa on the Isle of Arran, Scotland. – Molecular Ecology 13: 123–143.
- Rosenbaumová R., Plačková I. & Suda J. (2004): Variation in *Lamium* subg. *Galeobdolon* (Lamiaceae): insights from ploidy levels, morphology and isozymes. – Plant Systematic and Evolution 244: 219–244.
- Rybka V., Rybková R. & Pohlová R. (2004): Rostliny ve svitu evropských hvězd [Plant species of the system of Natura 2000 in the Czech Republic]. – Olomouc, Praha, Sagittaria.
- Slocum P. D. (2005): Waterlilies and lotuses: species, cultivars and new hybrids. Portland, Timber Press.
- Smejkal M. (1990): *Cerastium* L. In.: Hejný S. & Slavík B. (eds.) Květena České republiky [Flora of the Czech Republic] vol. 2. Praha, Academia.
- Soltis P. S. & Soltis D. E. (2009): The role of hybridization in plant speciation. – Annual Review of Plant Biology 60: 561-588.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P. & Krahulec F. (2006): Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. – Taxon 55: 447-450.
- Talent N. & Dickinson T. A. (2006): Endosperm formation in aposporous *Crataegus* (Rosaceae, Spiraeoideae, tribe Pyreae): parallels to Ranunculaceae and Poaceae. - New Phytologist 173: 231-249.
- Tájek P., Klaudisová A. & Vít P. (2012): Vývoj populace křížence rožečku kuřičkolistého (*Cerastium alsinifolium*) a rožečce rolního (*C. arvense*) v NPP Křížky v letech 1984-2012. – Sborník Muzea Karlovarského Kraje 20: 173-194.
- Thompson J. D., Gaudeul M. & Debussche M. (2009): Conservation value of sites of hybridization in peripheral populations of rare plant species. – Conservation biology 24: 236-245.
- Vít P., Lepší M. & Lepší P. (2012): There is no diploid apomict among Czech *Sorbus* species: a biosystematic revision of *S. eximia* and discovery of *S. barrandienica*. – Preslia 84: 71-96.
- Vít P., Wolfová K., Urfus T., Tájek P. & Suda J. (2014): Interspecific hybridization between rare and common plant congeners inferred from genome size data: assessing the threat to the Czech serpentine endemic *Cerastium alsinifolium* (Caryophyllaceae). – Preslia 86: 95-117.
- Wissemann V. (2007): Plant evolution by means of hybridization. – Systematics and Biodiversity 5: 243-253.
- Wójcicki J. J. (1991): Variability of *Prunus fruticosa* Pall. and the problem of antropohybridization. In: Zarzycki K., Landolt E. & Wójcicki J. J. [eds.] (1991): Contributions to the knowledge of flora and vegetation of Poland. Vol. 1. Zürich, Stiftung Rübel.
- Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D. & Fink W.L. (2004): Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer. Elsevier Academic Press, London.

Curriculum Vitae

Personal data

Petr Vít

* 15.10.1980 in Aš

Education

since 2006: PhD study, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague

2000 – 2006: MSc. study, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague

Employment

since 2011: PhD student, Institute of Botany ASCR, Průhonice, Department of Genetic ecology, Czech Republic (full time job)

2006-2011: PhD student, Institute of Botany ASCR, Průhonice, Laboratory of flow cytometry (part time job)

2005-2012: PhD student, Laboratory of flow cytometry, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague (part time job)

Publications (SCI papers):

Vít P., Šingliarová B., Zozomová-Lihová J., Mahold K. & Krak K. (2014): Development of microsatellite markers for *Pilosella alpicola* group (Hieraciinae, Asteraceae) and their cross-amplification to other Hieraciinae genera. – Molecular Biology Reports (**submitted**).

Hand M., Vít P., Krahlcová A., Johnson S. D., Oelkers K., Siddons H., Chrtěk J., Fehrer J. & Koltunow A. M. G. (2014): Evolution of apomixis loci in *Pilosella* and *Hieracium* (Asteraceae) inferred from the conservation of apomixis-linked markers in natural and experimental populations. – Heredity (**accepted**).

Hanušová K., Ekrt L., Vít P., Kolář F. and Urfus T. (2014): Continuous morphological variation correlated with genome size indicates frequent introgressive hybridization among *Diphasiastrum* species (Lycopodiaceae) in Central Europe. – Plos One (**accepted**).

Drašnarová A., Krak K., Vít P., Doudová J., Douda J., Hadincová V., Zákravský P. & Mandák B. (2014): Cross-amplification and multiplexing of SSR markers for *Alnus glutinosa* and *A. incana*. – Tree Genetics & Genomes (**in press**).

Kabátová K., Vít P., & Suda J. (2014): Species boundaries and hybridization in Central-European *Nymphaea* species inferred from genome size and morphometric data. – Preslia 86: 131-154.

Zozomová-Lihová J., Krak K., Mandáková T., Shimizu K. K., Španiel S., Vít P. & Lysák M. A. (2014): Multiple hybridization events in *Cardamine* (Brassicaceae) during the last 150 years: revisiting a textbook example of neoallopolyploidy. – Annals of Botany 113(5): 817-830.

Vít P., Wolfová K., Urfus T., Tájek P. & Suda J. (2014): Interspecific hybridization between rare and common plant congeners inferred from genome size data: assessing the threat to the Czech serpentine endemic *Cerastium alsinifolium* (Caryophyllaceae). – Preslia 86: 95-117.

Businský R., Frantík T. & Vít P. (2014): Morphological evaluation of the *Pinus kesiya* complex (Pinaceae). – Plant Systematics and Evolution 300/2: 273-285.

Kolář F., Lučanová M., Vít P., Urfus T., Chrtěk J., Féř T., Ehrendorfer F. & Suda J. (2013): Diversity and endemism in deglaciated areas: ploidy, relative genome size and niche differentiation in the *Galium pusillum* complex (Rubiaceae) in Northern and Central Europe. – Annals of Botany 111/6: 1095-1108.

Lepší M., Lepší P. & Vít P. (2013): *Sorbus quernea*: taxonomic confusion caused by the naturalization of an alien species, *Sorbus mougeotii*. – Preslia 85/2: 159-178.

Krejčíková J., Sudová R., Lučanová M., Trávníček P., Urfus T., Vít P., Weiss-Schneeweiss H., Kolano B., Oberlander K., Dreyer L. L. & Suda J. (2013): High ploidy diversity and distinct patterns of

- cytotype distribution in a widespread species of *Oxalis* in the Greater Cape Floristic Region. – Annals of Botany 111/4: 641-649.
- Lepší M., Lepší P., Sádlo J., Koutecký P., Vít P. & Petřík P. (2013): *Sorbus pauca* species nova, the first endemic species of the *Sorbus hybrida* group for the Czech Republic. – Preslia 85/1: 63-80.
- Vít P., Lepší M. & Lepší P. (2012): There is no diploid apomict among Czech *Sorbus* species: a biosystematic revision of *S. eximia* and discovery of *S. barrandienica*. – Preslia 84/1: 71-96.
- Horandl E., Dobeš C., Suda J., Vít P., Urfus T., Temsch E. M., Consedai A-C., Wagner J. & Ladinig U. (2011): Apomixis is not prevalent in subnival to nival plants of the European Alps. – Annals of Botany 108: 381-390.
- Loureiro J., Trávníček P., Rauchová J., Urfus T., Vít P., Štech M., Castro S. & Suda J. (2010): The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. – Preslia 82/1: 3-21.
- Ekrt L., Trávníček P., Jarolímová V., Vít P. & Urfus T. (2009): Genome size and morphology of the *Dryopteris affinis* group in Central Europe. – Preslia 81/3: 261-280.
- Kolář F., Štech M., Trávníček P., Rauchová J., Urfus T., Vít P., Kubešová M., and Suda J. (2009): Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. – Annals of Botany 103: 963-974.
- Slovák M., Vít P., Urfus T. & Marhold K. (2009): The Balkan endemic *Picris hispidissima* (Compositae): morphology, nuclear DNA content and relationship to the polymorphic *P. hieracioides*. – Plant Systematics and Evolution 278: 187-201.
- Lepší M., Vít P., Lepší P., Boublík K., & Kolář F. (2009): *Sorbus portae-bohemicae* and *Sorbus albensis*, two new endemic apomictic species recognized based on a revision of *Sorbus bohemica*. – Preslia 81/1: 63-89.
- Suda J., Loureiro J., Trávníček P., Rauchová J., Vít P., Urfus T., Kubešová M., Dreyer L. L., Oberlander K. C., Wester P. & Roets F. (2009): Flow cytometry and its applications in plant population biology, ecology and biosystematics: New prospects for the Cape flora. – South African Journal of Botany 75/2: 389-389.
- Slovák M., Vít P., Urfus T. & Suda J. (2009): Complex pattern of genome size variation in the polymorphic species *Picris hieracioides* (Compositae). – Journal of Biogeography 39: 372-384.
- Lepší M., Vít P., Lepší P., Boublík K., & Suda J. (2008): *Sorbus milensis*, a new hybridogenous species from northwestern Bohemia. – Preslia 80: 229-244.

Publications (popularization papers):

- Tájek P., Klaudisová A. & Vít P. (2012): Vývoj populace křížence rože kuřičkolistého (*Cerastium alsinifolium*) a rože rolního (*C. arvense*) v NPP Křížky v letech 1984-2012. – Sborník Muzea Karlovarského Kraje 20: 173-194.
- Urfus T. & Vít P. (2009): Plavuničky – tajemní návštěvníci z pravěku. – Živa 57/6: 251-253.
- Kolář F. & Vít P. (2008): Endemické rostliny českých hadců 1. Zvláštnosti hadcových ostrovů. – Živa 56/1: 14-17.
- Kolář F. & Vít P. (2008): Endemické rostliny českých hadců 2. Chrastavec, mochna, hvozdík a trávnička. – Živa 56/2: 67-69.
- Kolář F. & Vít P. (2008): Endemické rostliny českých hadců 3. Rožec kuřičkolistý a kuřička Smejkalova. – Živa 56/3: 111-113.
- Vít P. & Suda J. (2006): Endemické hybridogenní jeřáby ČR. – Živa 54/4: 251-255.

Conference posters

- Kolář F., Lučanová M., Píšová S., Fér T., Vít P., Urfus T., Chrtek J., Koutecký P. and Suda J. (2012): Evolutionary history of *Galium pumilum* agg. polyploid complex in deglaciated Europe. - International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity. Průhonice 7-10.5.2012.
- Kabátová K., Vít P. and Suda J. (2012): Interspecific hybridization between Central-European species of the genus *Nymphaea* - insight from flow cytometric, molecular, and phenotypic data. - International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity. Průhonice 7-10.5.2012.
- Urfus T., Ekrt L., Dvořáková K. and Vít P. (2012): Biosystematic study of Central European *Diphasiastrum* species. - International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity. Průhonice 7-10.5.2012.
- Vít P., Krahulcová A., Fehrer J. and Koltunow A. (2012): Distribution of apomixis-related markers in sexual and apomictic *Hieracium* subg. *Pilosella* accessions. - International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity. Průhonice 7-10.5.2012.
- Lepší M., Lepší P. and Vít P. (2012): Hybridogenous polyploid species *Sorbus quernea* – a taxonomic confusion raised by naturalisation of an alien species and revealing of introgression in *S. mougeotii*. - International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity. Průhonice 7-10.5.2012.
- Kalúšková J., Vít P. and Suda J. (2012): Assessing the threat from interspecific hybridization to the rare endemic *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus* (Caryophyllaceae). - International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity. Průhonice 7-10.5.2012.
- Dvořáková K., Urfus T., Krak K. & Vít P. (2010): Hybridization and microevolutionary relationships among Central European *Diphasiastrum* species. - 19th International Symposium "Biodiversity and Evolutionary Biology" of the German Botanical Society (DBG). September 16th – 19th 2010.
- Urfus T., Krahulec F., Vit P. & Kubešová M. (2009): Variation in *Pilosella officinarum* F. W. Schultz et Sch. Bip. in Central Europe: ploidy levels and their corelation with morphology. International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity. Saint Malo, France. 17-20.5.2009.
- Vít P., Suda J., Seifertová K., Kubešová M., Urfus T. (2009): Hybridization of *Cerastium alsinifolium* – caryological and morphological variation of serpentine endemic species. - International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity. Saint Malo, France. 17-20.5.2009.
- Slovák M., Vít P., Urfus T. & Suda J. (2008): Intraspecific genome size variation in *Picris hieracioides* L. - Xth Symposium of the International Organisation of Plant Biosystematists. Vysoke Tatry, Slovakia. 2-4.7.2008.

Grant projects

2007-2009: Významný český endemický rožec *Cerastium alsinifolium* - evoluční historie, reprodukční úspěšnost a důsledky křížení s *Cerastium arvense*. (GAAV, KJB601110709, project leader).

Awards

2010: Cena Josefa Hlávky

2009: Cena Živy za nejlepší článek v kategorii 26-30 let - Endemické rostliny českých hadců 1.- 3

2007: "Purkyňova cena" – Cena časopisu Živa za nejlepší popularizační článek (kategorie nad 30 let): Endemické jeřáby – perly mezi českými dřevinami.

Organization membership

since 2003: Czech botanical society