

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky

Studijní program: Biologie (magisterské studium; N1501)

Studijní obor: Botanika (NBOTA ;1507T004)



Evoluční vztahy tetraploidních zástupců skupiny *Galium pusillum* (sekce *Leptogalium*) na území střední Evropy. Alopatriká diferenciace českého endemického druhu *G. sudeticum*.

Evolutionary history of tetraploid representatives *Galium pusillum* group (sect. *Leptogalium*) in central Europe. Allopatric differentiation of Czech endemic species *G. sudeticum*.

Bc. Adam Knotek

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Filip Kolář

Praha 2014



Prohlášení:

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

V Praze: _____

.....

podpis

Abstrakt

V předkládané práci se zabývám evoluční historií polyploidní skupiny *Galium pusillum* se zaměřením na český endemický druh *G. sudeticum*, který představuje ideální modelový případ pro studium alopatrické speciace v kontextu (post)glaciálního vývoje středoevropské krajiny.

Získaná morfologická a molekulární data poukazují na zcela odlišnou historii dvou izolovaných arel *G. sudeticum* v Krkonoších a na hadcích ve více jak 200 km vzdáleném Slavkovském lese. Krkonošské populace *G. sudeticum* jsou pravděpodobně pozůstatkem severního okraje areálu horského druhu *G. anisophyllum*, který při poledových změnách vegetace hybridizoval s nížinným druhem *G. valdepiosum*. To podporuje jak intermediární postavení krkonošských populací v morfologických a molekulárních AFLP analýzách tak i sdílení téhož chloroplastového haplotypu s geograficky blízkými nížinnými populacemi. Na druhé straně hadcové populace ze Slavkovského lesa jsou morfologicky i molekulárně zcela neodlišitelné od druhu *G. valdepiosum*.

Překvapivým výsledkem je nalezení geneticky zcela odlišné skupiny několika populací *G. valdepiosum* v západních Čechách a v Bavorsku, nacházejících se na reliktních stanovištích (vápenčové a hadcové výchozy). Tato skupina může představovat pozůstatek jiné, možná dálnější migrace a vyzdvihuje funkci edaficky podmíněných stanovišť jako refugií svébytné kryptické/genetické diverzity.

Studovaná skupina je z hlediska struktury genetické diverzity velmi mladá a málo rozlišená, avšak variabilita v rámci populací (a to i těch malých a výrazně izolovaných) je velmi vysoká. Studium cpDNA odhalilo vysoký počet vzájemně mezi druhy sdílených a spíše geograficky rozdělených haplotypů odrážející pravděpodobně ancestrální polymorfismus nebo častou hybridizaci v minulosti.

V NPR Praděd při průzkumu historické lokality *G. sudeticum* ve Velké Kotlině jsem našel neobvyklé tetraploidní rostliny s velikostí genomu odpovídající hexaploidnímu cytotypu. Domnívám se, že by se mohlo jednat o křížence *G. pumilum* (8x) a *G. sudeticum* (4x) s následnou změnou chromozómového počtu se zatím neznámým mechanismem.

Klíčová slova: *Galium*, *G. pusillum* agg., *G. pumilum*, *G. sudeticum*, *G. valdepiosum*, *G. anisophyllum*, hybridizace, postglaciální migrace, alopatrická speciace, polyploidizace, endemismus

Abstract

The presented study tries to reveal the evolutionary history of polyploid complex *Galium pusillum* aiming on a rare czech endemic species *G. sudeticum*, an ideal model to study allopatric speciation in the context of Central European (post)glacial development.

The species *G. sudeticum* grows in Krkonose Mts. and on serpentines in western Bohemia (Slavkovský les) more than 200 kilometers away. Our morphological and molecular data suggest a clearly different history of its two isolated areas. The populations in Krkonose Mts. are probable relics of mountainous species *G. anisophyllum* which was there on its northern border of occurrence and hybridized with lowland species *G. valdepilosum* during postglacial vegetations shifts. This fact is well supported by intermediate position of Krkonose Mts. populations in both morphological and molecular AFLP analyses and by sharing the same chloroplast haplotype with geographically close lowland populations. On the other hand the serpentine lowland populations in western Bohemia are both morphologically and genetically indistinguishable from *G. valdepilosum*.

Distinct genetic lineage of few populations belonging to *G. valdepilosum* (incl. one traditionally referred as *G. sudeticum*) was found in western Bohemia and Bavaria, located on relic stands (calcareous and serpentine outcrops). This group may represent a rest of probably older migration and emphasizes the function of edaphically conditioned localities as a refuge of specific cryptic diversity.

Studied group is according to its genetic diversity young and little diversified, but variability within populations (incl. small and isolated ones) is very high. Sequencing of cpDNA shows high number of haplotypes shared among studied species, but somehow geographically restricted, indicating possible ancestral polymorphism or frequent hybridization in past.

Some unusual plants were found in Velká Kotlina (natural reservation Praděd; Jeseníky Mts.) a historic locality of *G. sudeticum*. These plants have tetraploid chromosome number but their relative genome size corresponds to hexaploid cytotype. It suggests hybridization between *G. pumilum* (8x) and *G. sudeticum* (4x) with subsequent chromosomal changes of unknown mechanism.

Keywords: *Galium*, *G. pusillum* agg., *G. pumilum*, *G. sudeticum*, *G. valdepilosum*, *G. anisophyllum*, hybridization, postglacial migration, allopatric speciation, polyploidization, endemism

Poděkování

Já vím, je to už ohraná písnička, ale děkuji mému školiteli Filipovi Kolářovi, který se ke mně vždy choval s úctou, pochopením a zapálením. Nikdy mi neřekl, že jsem úplný trouba, i když bych si to zasloužil, a pomohl mi dovést zdárně do konce tuto diplomovou práci. Ovšem nemenší dík, snad nebude Filip závidět, patří mé drahé polovičce Katce, která mě nešetřila a peskovala mě. Řekla, co si myslí, i když věděla, že mě to bude bolet. Motivovala mě a chápala, že se teď opravdu musím věnovat škole a nemůžu se věnovat jí. Byla to dlouhá epizoda, ale ta končí a pokračujeme dál. Také musím poděkovat kolegům v pracovně/herbáři, kteří mi poskytli další cenné a praktické rady (např. práce s GISem) s občasnými hutnými dávkami cynismu. Každý kdo mohl, pomohl, ale někteří pomohli víc, a tak je zmíním, i když si asi zakládám na malér. Jsou to Kristýna Šemberová, Martin Hanzl, Filip Holič, Lenka Macková rozená Musilová, Monika Pospíšilová, Jana Bílá a Klára Kabátová. Za vedení a rady při práci v DNA laboratoři vděčím trojici Lenka Flašková, Gabriela Fuxová a Eliška Záveská. Za pipetování AFLP děkuji Soně Píšové. Za pomoc v cytometrické laboratoři děkuji Tomášovi Urfusovi, kterého jsem taky často bombardoval otázkami, jako kdyby to byl můj konzultant, Magdaleně Lučanové a Petrovi Vítovi. Honzovi Sudovi, který sice nepomáhal přímo mně, ale já z toho měl taky užitek. Za sběry a fotografie děkuju Michalovi Hronešovi z Univerzity Palackého v Olomouci. Janu Mumínkovi Martinkovi děkuji za pomoc s focením plodů. Za pomoc a rady při pěstování a udržování svízelů při životě děkuji Tomášovi Procházkovi a Martinu „Louskáčku“ Weiserovi, a taktéž zahradníkům z Botanické zahrady Přf UK. A úplně nakonec děkuji svým rodičům a prarodičům. Jste všichni skvělí!

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Otázky	3
2. Teoretický úvod	4
2.1 Taxonomické zařazení rodu <i>Galium</i>	4
2.2 Charakteristika sekce <i>Leptogalium</i>	6
2.2.1 Morfologie	6
2.2.2 Rozšíření	6
2.2.3 Taxonomické členění sekce	6
2.3 Problematika studia sekce <i>Leptogalium</i>	7
2.3.1 Polyploidizace	8
2.3.2 Hybridizace	8
2.4 Vývoj areálu sekce <i>Leptogalium</i> období čtvrtohor.....	9
2.5 Přehled druhů probíraných v analýzách.....	12
2.5.1 <i>Galium anisophyllum</i> VILL. – svízel nestejnolistý	12
2.5.2 <i>Galium sudeticum</i> TAUSCH – svízel sudetský	14
2.5.3 <i>Galium valdepilosum</i> H. BRAUN. – svízel moravský	16
2.6. Problematika použitých metod	18
2.6.1 Dominantní marker AFLP (amplified fragment length polymorphism).....	18
2.6.2 Průtoková cytometrie	19
2.6.3 Sekvenování DNA	20
3. Metodika	23
3.1 Sběr materiálu	23
3.2 Průtoková cytometrie (FCM)	24
3.3 Počítání chromozomů	26
3.4 Morfometrická analýza	27
3.5 Izolace DNA.....	30

3.6 Sekvenování chloroplastové DNA	30
3.6.1 PCR (polymerase chain reaction)	30
3.6.2 Přečištění	32
3.6.3. Sekvenování a sekvenační reakce	32
3.6.4 Analýza primárních sekvencí	32
3.6.5 Alignment	33
3.6.6 Analýza plastidových sekvencí	33
3.7 Amplified fragment Length Polymorphism (AFLP)	35
3.7.1 AFLP reakce	35
3.7.2 Přečištění a příprava na sekvenátor AFLP	37
3.7.3 Skórování AFLP dat	38
3.7.4 Analýza dat	38
4. Výsledky	40
4.1 Rozšíření druhu <i>G. sudeticum</i>	40
4.2 Relativní velikost genomu a chromozómové počty	41
4.3 Morfologická diferenciacce	44
4.3.1 Úprava dat, popisné statistiky a PCA	45
4.3.2 Shlukové analýzy	45
4.3.3 Diskriminační analýzy	47
4.3.4 Morfologie plodů	51
4.4 Sekvence chloroplastové DNA	53
4.5.1 Indexy variability, AMOVA	59
4.5.2 Analýza hlavních koordinát (PCoA)	62
4.5.3 Klastrovací analýzy Structure	63
5. Diskuze	68
5.1 Evoluční historie tetraploidních populací komplexu <i>G. pusillum</i> agg. ve střední Evropě	68
5.2 Taxonomická revize <i>G. sudeticum</i>	70
5.2.1 Vztahy Krkonoš a Slavkovského lesa	70

5.2.2 Revize lokality <i>G. sudeticum</i> ve Velké kotlině	73
6. Závěr/Shrnutí	75
7. Seznam použité literatury	76
8. Přílohy	86
8.1. Laboratorní protokoly	86
8.1.1 Izolace DNA (Qiagen DNeasy 96 Plant kit) s modifikacemi	86
8.1.2 Přečišťování kitem GENEAID	87
8.1.3 Přesražování octanem sodným	87
8.1.4 Přečištění a příprava na sekvenátor AFLP vzorků.....	88
8.2 Výsledky analýz.....	89
8.2.1 Pearsonův korelační koeficient	89
8.2.2 Spearmanův korelační koeficient	90
8.2.3 Deskriptivní statistika pro jednotlivé skupiny	91
8.2.4: PCA analýza morfologickýc dat	94
8.2.5: Seznam použitých lokalit/ List of sampled localities.....	96

1. Úvod

Vznik nových druhů, *speciace*, je proces, zodpovědný za nebývalou bohatost rostlinné říše. Omezením genového toku mezi populacemi se hromadí genetické odlišnosti, a (postupně) divergující populace mohou dát vznik novým taxonomickým jednotkám. Jednou z možností je tzv. *alopatrická speciace*, kdy k izolaci dochází oddělením populací v prostoru. Bariérou může být pohoří nebo moře, ale také určitý typ vegetace, např. les pro stepní rostliny a naopak. Klimatické změny v průběhu dob ledových a v postglaciálu zapříčinily změny v rozšíření různých vegetačních typů a vytvořily bariéry pro mnoho rostlin naprosto nepropustné. V kombinaci s využitím vhodných reliktních stanovišť se spojitá rozšíření mnoha druhů rostlin i vegetačních typů zcela fragmentovala a umožnila jejich separátní vývoj. Příkladem na území České republiky, může být český hadcový endemit rožec kuřičkolistý (*Cerastium alsinifolium*), který se izolací na hadcových ostrůvcích odlišil od populací Alpských (Novák 1960) nebo např. kruhatka matthioliho moravská (*Corthusa mathioli* subsp. *moravica*) v propasti Macocha, která má nejbližší příbuzné ve slovenských Karpatech a je popsána na úrovni poddruhu (Kovanda 1992).

Mnohem zajímavější je proces alopatrické *speciace* v kombinaci s *hybridizací* a s následným zdvojením genomu, tedy *polyploidizací*. Při posunu areálů jsou rostliny vystaveny stresu a může docházet k celé řadě procesů, např. vznik autopolyploidů, ale především může docházet v rámci sekundárního kontaktu k mezidruhové hybridizaci a vzniku allopolyploidů (Wisseemann 2007, Hegarty & Hiscock 2008), ale také např. nových apomiktních linií (Paun et al. 2006). Alespoň jedním kolem polyploidizace si podle současných studií prošly všechny semenné rostliny (Jiao et al. 2011). Zdvojením genomu získá rostlina více kopií jednoho genu, které nejsou pod selekčním tlakem a mohou volně mutovat. Díky tomu mohou být polyploidi více variabilní a obsazovat širší nebo jiné ekologické niky, často ale také bez větších morfologických rozdílů. Proces polyploidizace se může opakovat jak v prostoru, tak i v čase. Tímto způsobem vznikají mnohé taxonomicky obtížné skupiny s řadou jen málo rozlišených druhů, ale s naprosto jinou historií vzniku. Identifikace těchto událostí jsou výborným zdrojem informací k rekonstrukci dřívějších areálů rostlin a odhalují historické změny přírodních poměrů. To nám pomáhá pochopit vztahy v rámci problematických skupin a vysvětlit důvody značného roztříštění některých druhů organismů nebo neobvyklou heterogenitu souvislých ploch.

Jedinečné modelové příklady alopatrické diferenciací spjaté s polyploidizací v prostoru střední Evropy poskytuje polyploidní komplex *G. pusillum* (pouze pro území ČR se často užívá pojmenování komplex *G. pumilum*). V rámci Alpsko-Karpatského systému je zastoupen především

vysoce polymorfním a cytologicky variabilním horským druhem *G. anisophyllon* VILL. Zatímco v Alpách je tento druh zastoupen čtyřmi parapatricky rozšířenými cytotypy (diploidní, 2x, tetraploidní, 4x, hexaploidní, 6x, a oktoploidní, 8x), z Karpat jsou známy pouze cytotypy di- a tetraploidní (Ehrendorfer 1962, 1965). Jednotlivé cytotypy jsou částečně ekologicky vyhraněné, ale jen omezeně morfologicky diferencované. Zatímco diploidní cytotyp je fragmentován do několika oddělených refugií, polyploidní linie zauímají větší areály v okolí těchto „ostrovů“ (vzhledem k obecné preferenci otevřených horských stanovišť je však i celkové rozšíření polyploidů spíše fragmentární). Polyploidní linie tak pravděpodobně vznikaly opakovaně a nezávisle v různých částech areálu a to z lokálních diploidních typů (Piotrowicz 1958). Proces vzniku vyšších cytotypů a příčina současného pozoruhodného rozšíření těchto cytotypů jsou kladeny do souvislosti se střídáním teplejších a studenějších období v průběhu čtvrtohor. Zatímco ve vrcholném glaciálu a vrcholu dob meziledových (včetně pokročilejších fází holocénu) byly populace fragmentovány a mohla probíhat jejich alopatriká diferenciace, v přechodných fázích mezi těmito vrcholy (např. raný holocén) byly zřejmě podmínky pro tento druh příhodnější, docházelo ke zvětšování areálu, sekundárním kontaktům dříve izolovaných populací a hybridizaci spojené s polyploidizací (Ehrendorfer 1958). Tyto hypotézy se však opírají pouze o morfologické, karyologické analýzy a znalosti současných ekologických nároků a rozšíření jednotlivých cytotypů.

Nevyjasněné postavení má v kontextu druhu *G. anisophyllon* jeho Sudetsko-Hercynská paralela, kterou je český subendemický druh *Galium sudeticum* TAUSCH (kriticky ohrožený druh ČR zařazený mezi druhy evropského významu v rámci soustavy NATURA 2000 (Rybka et al. 2004, Grulich 2012). Jedná se o tetraploidní taxon ($x=11$, $2n = 4x = 44$), který je v současnosti udáván pouze z ledovcových karů v Krkonoších odkud byl popsán (Tausch 1835) a z hadcových ostrovů ve Slavkovském lese (Ehrendorfer 1956, Štěpánková 2000), tedy z míst vzdálených od sebe více než 200 km. Historické údaje ještě pocházejí z Hrubého Jeseníku (Štěpánková 2000). Existují však pochybnosti o totožnosti krkonošských a slavkovských populací. Byly nalezeny morfologické rozdíly mezi hadcovými/horskými populacemi, např. v délce internodií a v hustotě ochlupení, ale informativní hodnota těchto zjištění je vzhledem k rozdílnosti stanovišť omezená, protože hadcový substrát právě tyto znaky často ovlivňuje (Štěpánková 1997, Krahulcová & Štěpánková 1998). V oblastech sousedících se Slavkovským lesem, hostícím hadcové lokality *G. sudeticum*, se hojně nachází jiný druh *G. valdepilosum* je tedy možné, že se jedná o jeho hadcovou formu.

Kombinací současných metod jako je celogenomový screening pomocí AFLP, sekvenování jednotlivých úseků chloroplastové DNA, zjišťování ploidie a velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie (FCM) a klasické morfometrie si kladu za cíl objasnění vztahů jednotlivých populací *G. sudeticum* a možné způsoby jejich vzniku včetně možných vztahů s *G. anisophyllon* z okolních

pohoří. Prozkoumáním současných i historických lokalit chci zároveň zrevidovat celkové rozšíření druhu *G. sudeticum*.

Součástí práce je i krátký teoretický přehled uvádějící do problematiky rodu *Galium*.

1.1 Otázky

- 1) Jaká je genetická struktura tetraploidních populací *G. pusillum* agg. ve střední Evropě?
 - Jsou horské populace výrazně diferencované od těch nížinných nebo mezi oběma v současnosti geograficky oddělenými skupinami v minulosti docházelo k hybridizaci?
- 2) Jaký je vztah horských populací druhu *G. sudeticum* k populacím ekologicky a morfologicky blízkého horského druhu *G. anisophyllum* z Alp a Karpat?
 - Jedná se o nezávisle vzniklého polyploida nebo jde o geograficky izolovanou arelu tetraploidního cytotypu horského druhu *G. anisophyllum*?
 - V případě platnosti druhé hypotézy, jsou horské populace *G. sudeticum* bližší karpatské nebo alpské arele *G. anisophyllum*?
- 3) Jaké jsou vztahy hadcových a horských populací v rámci druhu *G. sudeticum*? Dochází u tohoto druhu k intraspecifické alopatrické diferenciaci izolovaných populací nebo se jedná o linie s odlišným evolučním původem?
 - Jsou hadcové a horské populace příbuznější sobě navzájem nebo je každá skupina bližší jinému taxonu (*G. valdepilosum* resp. *G. anisophyllum*)?
- 4) Jaká je míra populační genetické variability *G. sudeticum* ve srovnání s běžněji rozšířenými příbuznými tetraploidními druhy (*G. anisophyllum*, *G. valdepilosum*)?
 - Vyznačují se izolované populace *G. sudeticum* sníženou genetickou variabilitou, která by indikovala potenciální ohrožení celého druhu procesy spjatými s genetickým ochuzením malých populací?
- 5) Jaká je morfologická variabilita populací *G. sudeticum* a jejich potenciálně příbuzných druhů stejné ploidie?
 - Budou se jedinci *G. sudeticum* z krkonošských a slavkovských populací vzájemně morfologicky lišit?
 - Budou se odlišovat od *G. anisophyllum* a *G. valdepilosum*?

2. Teoretický úvod

2.1 Taxonomické zařazení rodu *Galium*

Oddělení: Magnoliophyta

Třída: Magnoliopsida

Řád: Gentianales

Čeleď: *Rubiaceae*

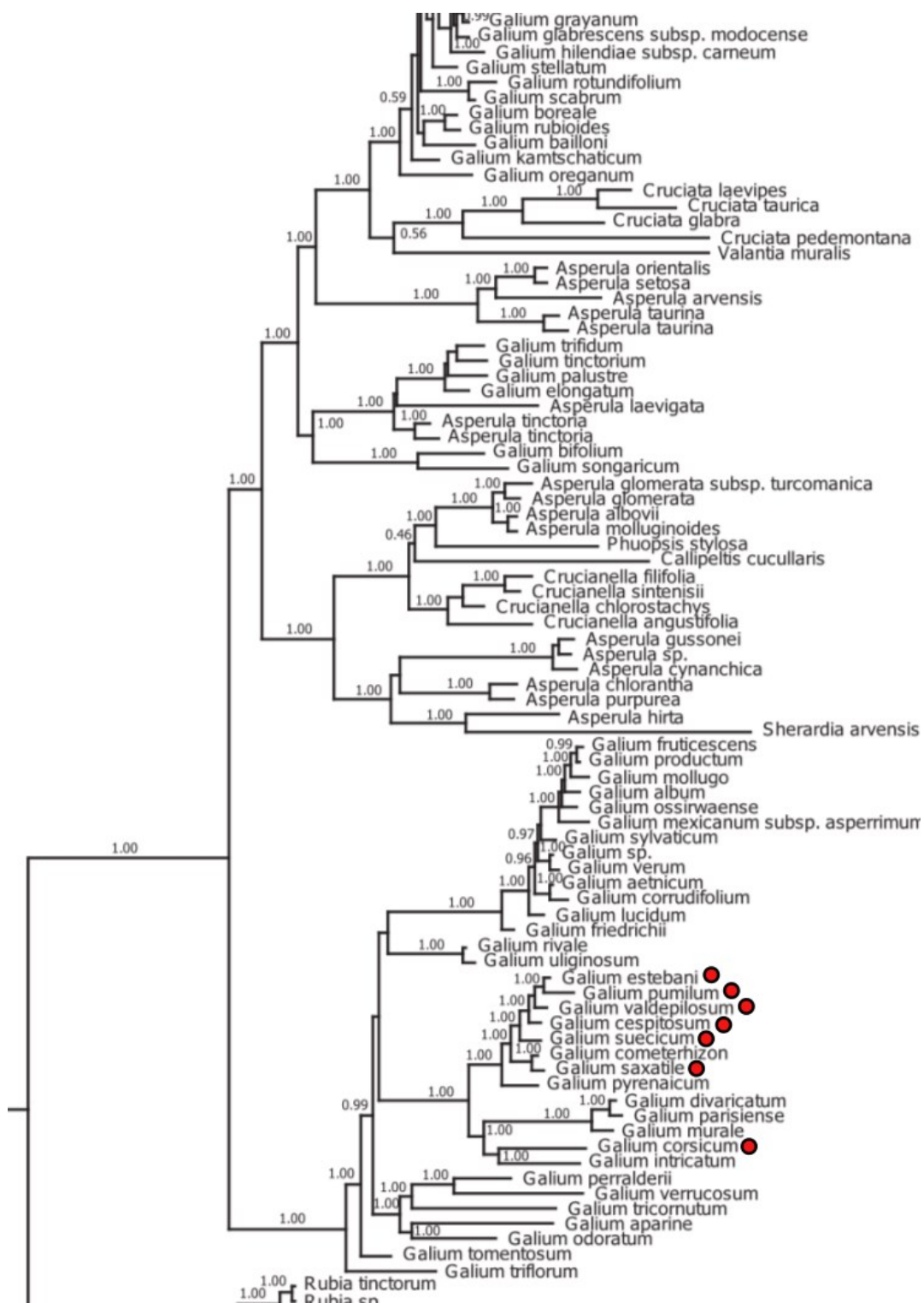
Podčeleď: *Rubioideae*

Tribus: *Rubieae*

Rod: *Galium*

Rod *Galium* patří do řádu Gentianales, čeledi *Rubiaceae* (APG III, Bremer et al. 2009), která zahrnuje přibližně 11 a půl tisíce druhů rozdělených do 42 tribů (Robbrecht & Manen 2006). V rodě *Galium* se rozpoznává zhruba 400 druhů s centrem rozšíření v Evropě a Turecku (145 a 101 druhů; Mabberley 2008). Na základě ITS a chloroplastových sekvencí se potvrdilo jeho zařazení do tribu *Rubieae* spolu s dalšími 10 rody *Asperula*, *Crucianella*, *Cruciata*, *Didymaea*, *Phuopsis*, *Rubia*, *Sherardia*, *Valantia* a *Callipeltis* (Robbrecht & Manen 2006, Soza & Olmstead 2010b). Poslední studie cpDNA (Natali et al. 1995, Soza & Olmstead 2010b) potvrdily tribus *Rubieae* jako monofyletickou jednotku a rozdělují jej na celkem sedm jasně podpořených skupin. Rod *Galium* není monofyletický. Rod *Asperula*, *Cruciata* a *Crucianella* spadají dovnitř tohoto rodu.

Naproti tomu sekce *Leptogalium*, kam spadají námi studované druhy, patří spolu se sekcemi *Galium*, *Hylaea*, *Leiogalium*, *Trachygalium* a *Orientigalium* do skupiny III z rodového hlediska monofyletické (Ehrendorfer unpubl., Soza & Olmstead 2010b). Více viz Obrázek 1: Bayesovský strom sekce *Rubieae* vytvořený pomocí tří chloroplastových úseků (rpoB-trnC, trnC-psbM, trnL-trnF-dhJ) s označenými druhy ze sekce *Leptogalium*. Posteriorní pravděpodobnosti zobrazeny nad větvemi (převzato, upraveno z Soza & Olmstead 2010b).



Obrázek 1: Bayesovský strom sekce *Rubieae* vytvořený pomocí tří chloroplastových úseků (rpoB-trnC, trnC-psbM, trnL-trnF-dhJ) s označenými druhy ze sekce *Leptogalium*. Posterioční pravděpodobnosti zobrazeny nad větvemi (převzato, upraveno z Soza & Olmstead 2010b).

2.2 Charakteristika sekce *Leptogalium*

2.2.1 Morfologie

Do této sekce spadají pouze vytrvalé hustě či řídce trsnaté byliny, s množstvím sterilních přízemních prýtů. Oddenky jsou vždy tenké, protáhlé. Čtyřhranné lodyhy dorůstají obvykle 30, ale někdy až 50 cm délky a většinou jsou poléhavé až vystoupavé. Mohou být zcela lysé nebo chlupaté, občas se zpětnými háčky. Listy s palisty jsou v 6-10 čtených přeslenech, vždy jednožilné, zakončené krátkou chrupavčitou osinkou či sklovitým chlupem. Květenství spíše rozvolněné, vejčité, pyramidální nebo chocholičnaté s chocholičnatými dílčími květenstvími a s koncovými větévkami obvykle bez listenů. Koruna je kolovitá s nejčastěji bílou, nazelenalou, nažloutlou, ale i fialovou nebo růžovou barvou. Korunní cípy mohou být zašpičatělé nebo hrodité. Plodem je dvounažka se suchým perikarpem. Povrch perikarpu může být hladký nebo s hrbolky, velmi vzácně chlupatý, ale nikdy s přichytnými háčky (Ehrendorfer 1976, Štěpánková 2000).

Od ostatních svízelů se tedy liší na první pohled drobným vzrůstem s tenkými, chabými lodyhami. Květy jsou v porovnání s ostatními běžnými druhy velmi drobné, zhruba poloviční a květenství je řídké. Listy na fertálních lodyhách jsou v poměru k délce velmi úzké a protáhlé, často až čárkovité.

2.2.2 Rozšíření

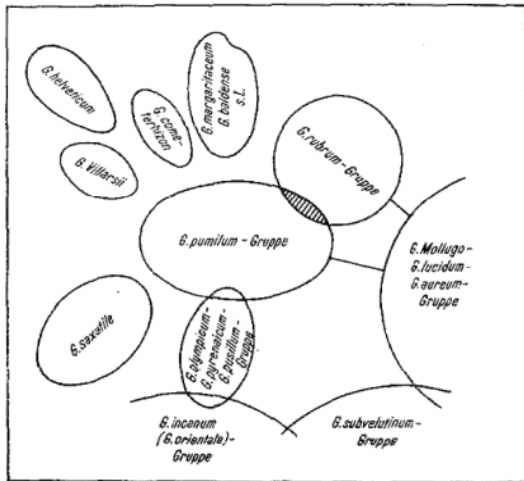
Centrum rozšíření je v Evropě včetně Islandu (*G. normanii*), Britských ostrovů (*G. sternerii*) a Skandinávie (*G. suecicum*, *G. sternerii*, *G. oelandicum*, *G. normanii*). Největší diverzity dosahuje v jihozápadní Evropě a ve středozeví, kde se nachází komplikované horské komplexy s až čtyřmi ploidními úrovněmi (skupina *G. rubrum* a *G. pusillum*). Okrajově zasahuje také do severní Afriky a do SZ Anatólie (*G. paleoitalicum*, *G. graecum*). Rozšíření většiny druhů, především nižších ploidí, je ostrůvkovité, fragmentární.

Roste od nížin až po nivální stupeň, především jako součást nejrůznějších travních a otevřených lesních společenstev (Ehrendorfer 1976).

2.2.3 Taxonomické členění sekce

Studiem tohoto komplexu se začal zabývat až F. Ehrendorfer v polovině 20. Století (Ehrendorfer 1949, 1956). Tehdy na základě jeho pozorování ekologie, morfologie a karyologie vytvořil první členění této sekce, které v malých obměnách přetrvává dodnes, dále doplňované novějšími morfologickými (Noack 1983), karyologickými (Krendl 1993), kombinovanými (Štěpánková

1997, Krahulcová & Štěpánková 1998) a také molekulárními metodami (Samuel et al. 1990). Další autoři se specializovali na určité oblasti a zrevidovali rozšíření jednotlivých taxonů např. na území Slovenska (Šípošová 1987) nebo Polska (Kucowa 1962, Kucowa & Madalski 1964).



Obrázek 2: Schéma skupin v sekci *Leptogalium* (převzato z Ehrendorfer 1949)

Současně je v této skupině rozpoznáváno 39 druhů (Ehrendorfer 1976), které spadají do několika morfologických skupin, které se mohou křížit. Téměř ve všech skupinách nacházíme více ploidních úrovní. Druhy, kterými se v této práci zabývám, spadají do skupiny *G. pusillum*, která zahrnuje druhy *G. suecicum*, *G. normanii*, *G. sternerii*, *G. oleandicum* (severní Evropa); *G. valdepilosum*, *G. austriacum*, *G. sudeticum*, *G. cracoviense*, *G. pumilum* (střední Evropa), *G. anisophyllum* (vysoká pohoří Alp, Karpat a Balkánského poloostrova), *G. fleurotii*, *G. megalospermum*, *G. pusillum*, *G. pseudohelveticum* (Francie, Itálie), skupina *G. helodes* a *G. papillosum* (Iberský poloostrov). Členění této skupiny vychází z (Krendl 1993) doplněné o severské druhy z (Kolář et al. 2013) a z konzultací s F. Ehrendorferem.

Je nutné brát v potaz, že rozdělení do těchto skupin je pouze pracovní. Jednotlivé druhy jsou morfologicky velmi plastické, kříží se a dochází zde k polyploidizaci. Vztahy mezi jednotlivými taxony jsou ve většině případů neznámé.

2.3 Problematika studia sekce *Leptogalium*

Rostliny v této sekci jsou velmi drobné, velmi plastické s minimem spolehlivých morfologických znaků. To je jeden z důvodů, proč je jejich studium tak obtížné a až do nedávna byly informace o vztazích mezi jednotlivými druhy velmi skromné. Důvodem, proč tomu tak je, může být jednak relativní mladost tohoto komplexu, která se udává někdy do začátku pleistocénu. Druhým důvodem je fakt, že se jednotlivé druhy poměrně snadno kříží a jejich hybridy jsou plně fertily. Třetím

důvodem pak může být existence různých reprodukčně zřejmě silně izolovaných cytotypů, které však od sebe většinou nelze morfologicky odlišit (Ehrendorfer 1949, 1956, 1958, 1962).

2.3.1 Polyploidizace

Téměř každý druh v této sekci má více než jeden stupeň ploidie, *G. valdepilosum* (2x, 4x), *G. sternerii*, *G. austriacum* (2x, 4x), *G. anisophyllum* (2x, 4x, 6x, 8x, 10x). Logickou výjimkou jsou málo rozšířené diploidní endemity jako je *G. cracoviense* nebo *G. oleandicum*. U *G. valdepilosum* byly mezi ploidiemi nalezeny morfologické rozdíly (Krahulcová & Štěpánková 1998) v kvantitativních znacích (rostliny vyšších ploidií jsou větší) a v chlupatosti. V jiných případech např. *G. sternerii* (Goodway 1957) a *G. anisophyllum* (Ehrendorfer 1958) však odlišení ploidií možné není. Avšak na rozdíl od morfologie se jednotlivé ploidní úrovně do jisté míry odlišují dle stanovištních nároků. Jedinci nižších ploidií jsou zatlačováni buď do vyšších nadmořských výšek nebo do oblastí bez konkurence ostatních rostlin, jako jsou skály, sutě a kary, zatímco vyšší ploidie zdatně kompetují v alpínských trávnících a jsou schopné růst i na kyselejších podkladech. Diploidi rostou spíše na bazických až neutrálních horninách (Ehrendorfer 1958). O časoprostorovém vývoji viz kapitola 2.4.

Mezi způsobem vzniku polyploidů prostřednictvím auto- či allopolyploidizace v případě sekce *Leptogalium* není možné vést jasnou hranici. Přestože se předpokládá vznik polyploidů při setkání dvou obvykle oddělených linií, nejsme schopni s jistotou odlišit allopolyploida od autopolyploida, protože rodiče hybridů jsou si blízké příbuzní, chromozomy nejsou nijak výrazně diferencované (Krahulcová & Štěpánková 1998) a volně se v hybridních párují (tetrasomická dědičnost; Ehrendorfer et al. 1996).

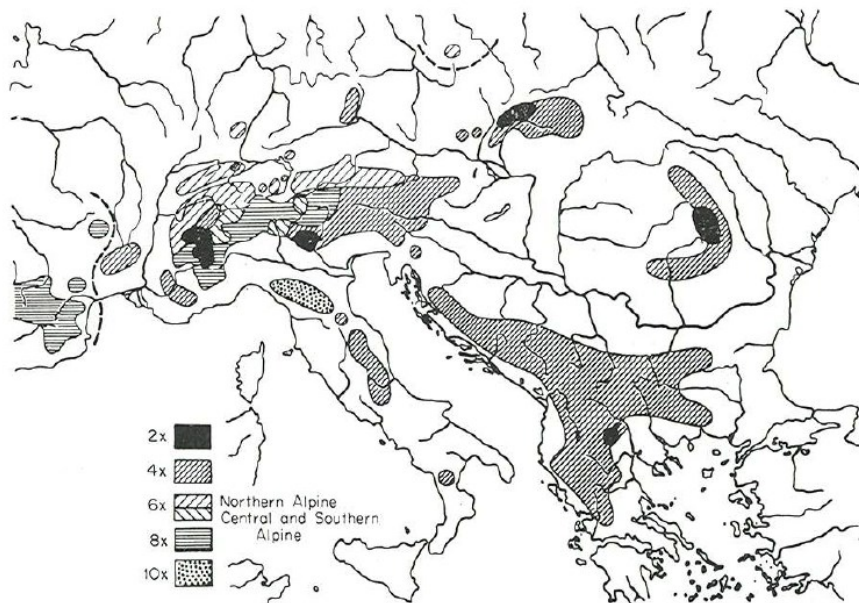
2.3.2 Hybridizace

Většina druhů se velmi ochotně kříží, především na stejné ploidní úrovni (Ehrendorfer 1976). Např. Goodway (1957) dokládá experimentální křížení různých morfologických typů stejné ploidní úrovně, tehdy označované jako *G. sternerii* a *G. pumilum*, zatímco křížení diploidů a tetraploidů morfologicky identických se mu nedařilo. F. Ehrendorfer (unpubl. zmínka v Ehrendorfer 1962) dokládá schopnost křížení mezi *G. anisophyllum* a *G. austriacum* na území Rakouska a dodává že vypěstovaní hybridy jsou plně fertily (Ehrendorfer 1962, unpubl.). Podobně potvrzuje i Šípošová (1987) křížení mezi tetraploidním *G. anisophyllum* a *G. austriacum* na území Slovenska. U morfologicky vzdálenějších druhů jsou hybridy snadno rozpoznatelné např. *G. rubrum* a *G. pumilum* za vzniku *G. x centroniae* (Ehrendorfer 1976). Wörz (1995) studoval sympatricky rostoucí *G. anisophyllum*, *G. valdepilosum* a *G. pumilum* a pozoroval introgresi sledovaných znaků, které si

vysvětloval právě schopností navzájem se křížit. I přítomnost křížení mezi různými ploidiemi byla potvrzena, Šípošová (1987) dokládá triploidní rostlinu, pravděpodobně křížence di- a tetraploidního cytotypu *G. anisophyllum* a dále (Krauhlová & Štěpánková 1998) našly dokonce dodekaploidní ($12x=144$) rostlinu, vzniklou pravděpodobně splynutím neredukovaných gamet tetraploidního *G. valdepilosum* a oktoploidního *G. pumilum*. O tom, jak se reálně hybridizace podílela na diverzitě studovaného komplexu, pomohlo až studium allozymů (Samuel et al. 1990, Ehrendorfer et al. 1996), které podpořilo postulované hypotézy postavením tetraploidního *G. austriacum* mezi diploidním *G. austriacum* a tetraploidním *G. anisophyllum*. Vysvětlením, proč v přírodě nenalzáme více meziploidních kříženců, může být kromě postzygotických reprodukčních bariér i fakt, že se většina druhů momentálně nenachází ve svém klimatickém optimu, má fragmentovaný areál a je zatlačena do refugiálních oblastí a většinou nedochází k sekundárním kontaktům. Např. v rámci celého areálu *G. valdepilosum* nebyla nalezena jediná ploidně smíšená populace (Kolář et al. 2014). Avšak v Alpách populace s více cytotypy existují (Ehrendorfer 1962) a to může být také jeden z důvodů proč situace v oblasti, odkud pochází většina diverzity tohoto komplexu, je tak nečitelná.

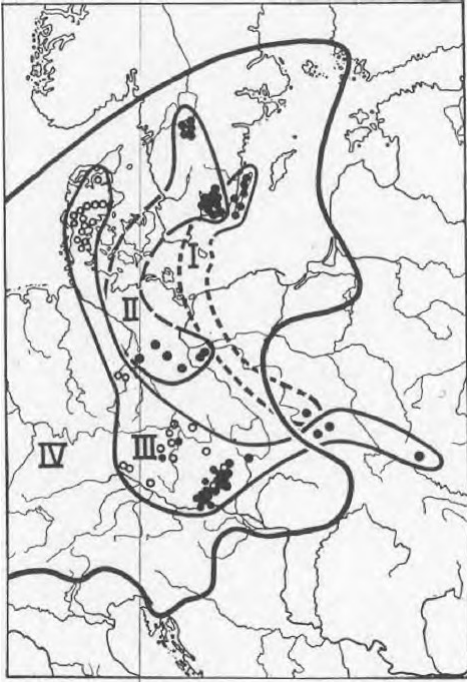
2.4 Vývoj areálu sekce *Leptogalium* období čtvrtohor

F. Ehrendorfer (Ehrendorfer 1958, 1962, 1965) na základě vlastních ekologických, karyologických a chorologických dat a poznatků geologie, klimatického a fytogeografického vývoje ve střední Evropě, popisuje teorii geneze druhů z okruhu *G. anisophyllum* v období čtvrtohor na území Alp. Zonaci polyploidních populací považuje za důsledek klimatických fluktuací související s opakovaným zaledňováním. Při oteplování a ústupu ledovce vznikala nová stanoviště, do kterých se mohly rostliny šířit. S postupným ochlazováním horské populace sestupovaly dolů a mohly se v údolích potkávat. Docházelo k hybridogenním kontaktům a vzniku polyploidů (popř. i hybridizaci mezi již etablovanými polyploidními liniemi). S dalším oteplováním se druhy opět šířily do odledněných oblastí, výhodu ale mají jedinci vyšších stupňů ploidie, které mohly být, na rozdíl od diploidů geneticky ochuzených vlivem redukce areálu, variabilnější a jsou schopné více kompetovat a rychleji se šířit. Diploidní populace pak zůstaly spíše v prostorově a ekologicky omezených refugiálních oblastech. Celý tento proces se opakoval a dal tak vznik postupně dalším vyšším cytotypům, tak jak je známe u *G. anisophyllum*, *G. marchandii* nebo *G. pumilum* (Ehrendorfer 1962, 1965).



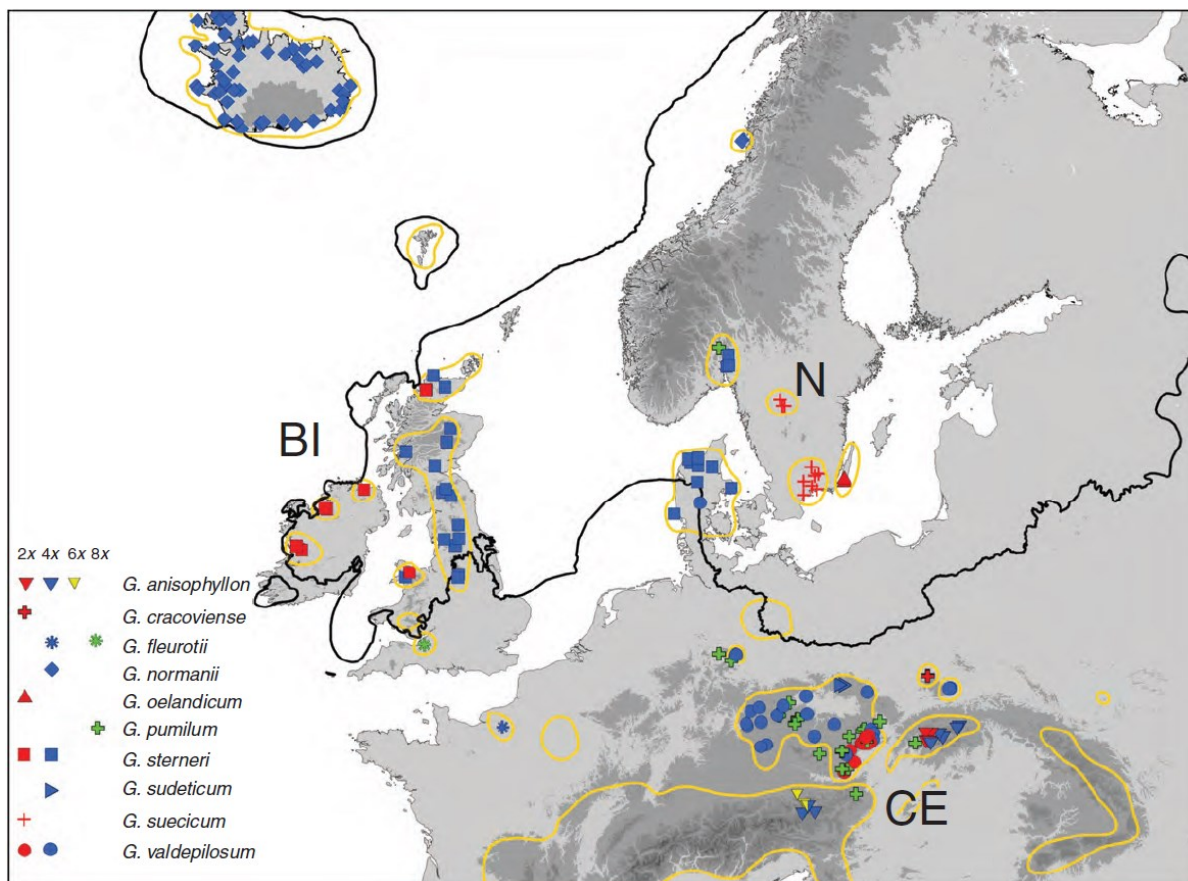
Obrázek 3: Distribuce alpského polyploidního komplexu sekce *Leptogalum*: *G. anisophyllum*: různé 2x, 4x, 6x, 8x, 10x cytotypy; za přerušovanou čarou pravděpodobně příbuzné horské až alpské druhy *G. marchandii* (8x, Pyreneje) a *G. sudeticum* (4x, Sudety) (Ehrendorfer 1965).

Na území střední a severní Evropy mohlo osidlování volných stanovišť probíhat v několika fázích, v závislosti na stanovištních vazbách konkrétních druhů, viz Obrázek 4: Postupnost osidlování střední Evropy a přilehlé Skandinávie ze sekce *Leptogalum*. I – *G. cracoviense* (diploid, jih) a *G. olandicum* (diploid, sever); II – *G. suecicum* (diploid); III – *G. valdepiosum* (plné kolečko diploid, prázdné kolečko tetraploid); IV – *G. pumilum* (plošné rozšíření, oktoploid) (Ehrendorfer 1962, 1965). Podle dosavadních představ proběhla první vlna v raném holocénu a zahrnovala druhy *G. cracoviense* a *G. olandicum* (STERNER & HYL.) EHREND. Jedná se pravděpodobně o pozůstatek druhů vázaných na otevřené stepi, které v té době převládaly. I když zde existuje názor, že by *G. cracoviense* na své lokalitě v Polsku mohlo existovat minimálně poslední dobu ledovou, jelikož sem pevninský ledovec nezasahoval (Cieslak & Szlag 2010). Druhá pozdější vlna zahrnuje *G. suecicum* (STERNER) EHREND., které se vyskytuje v severovýchodním Německu a jižním Švédsku a šířilo se společně se „severskými“ borovými lesy. Třetí vlna z období vrcholného holocénu zahrnuje tetraploidní *G. valdepiosum*, které při své cestě na sever došlo až do Dánska a dnes obývá otevřené lokality s „teplomilnější“ vegetací (otevřené smíšené a listnaté lesy, písčité duny, apod.). Poslední čtvrtá vlna zahrnuje období spojené s výraznou lidskou aktivitou v čele s *G. pumilum*, jehož areál je v současnosti největší (Ehrendorfer 1962).



Obrázek 4: Postupnost osidlování střední Evropy a přilehlé Skandinávie ze sekce *Leptogalum*. I – *G. cracoviense* (diploid, jih) a *G. olandicum* (diploid, sever); II – *G. suecicum* (diploid); III – *G. valdepilosum* (plné kolečko diploid, prázdné kolečko tetraploid); IV – *G. pumilum* (plošné rozšíření, oktoploid) (Ehrendorfer 1962)

Musíme však brát v potaz, že se jedná pouze o teorie založené na pozorování karyologie, morfologie a distribuce daných druhů. V současnosti nejsou k dispozici větší např. molekulární studie, které by byly schopné odhalit vztahy těchto jednotlivých migračních vln. I když nedávno vyšlá studie zabývající se rekolonizací Skandinávie druhy z této sekce (Kolář et al. 2013), poukazuje na rozdíly ve velikosti genomu *G. sterneti* a *G. suecicum* a *G. valdepilosum* ze střední Evropy. To by podporovalo spíše nezávislost severských a středoevropských populací a odporovalo teorii postupné kolonizace severských oblastí různými středoevropskými liniemi.



Obrázek 5: Geografická distribuce populací z agg. *G. pusillum* studovaných v článku (Kolář et al. 2013). Diploidi červeně, tetraploidi modře, hexaploidi žlutě, oktoploidi zeleně. CE = Centrální Evropa; BI = Britské ostrovy; N = Skandinávie. Černá čára vyznačuje přibližnou maximální hranici pevninského ledovce při posledním zalednění (Ehlers et al. 2011). Žluté čáry vyznačují distribuci agg. *G. pusillum* (Sternier 1944; Ehrendorfer 1958; Ehrendorfer 1962; Ehrendorfer 1976; <http://www.bsbi.org.uk/>). Rozšíření *G. pumilum* není vyznačeno (převzato z Kolář et al. 2013).

2.5 Přehled druhů probíraných v analýzách

Vybrané rostliny již byly popsány v bakalářské práci (Knotek 2012), na kterou tato práce navazuje. Zde pro přehled uvádím druhy, které byly použity při morfologických analýzách.

2.5.1 *Galium anisophyllum* VILL. – svízel nestejnolistý

2.5.1.1 Morfologie

Jedná se o vytrvalé trsnaté byliny vysoké 5-15 (-25) cm. Lodyhy jsou vzpřímené, občas poléhavé, čtyřhranné, většinou lysé nebo mírně chlupaté (např. na ztlustlinách v paždří přeslenů), na bázi mohou červenat, ke konci vegetační sezony mohou být červené celé. Internodia jsou v dolní třetině kratší nebo stejně dlouhé jako listy. Ve střední části se prodlužují a jsou 1-2x delší než listy.

Listy jsou v přeslenech po 5-8, obkopynaté nebo kopinaté obvykle zakončené chrupavčitou osinkou, 5-15(-20) mm dlouhé, 1-2(-3) mm široké a hladké, téměř vždy lysé jen vzácně s drobnými chloupky (nutná lupa). Okraje listů jsou podvinuté. Květenství latovité, bohatě větvené. Květní stopky 1-2 mm dlouhé, koruna bílá až žlutobílá, 2-4 mm v průměru. Korunní cípy tupé. Plod 1,5-2 mm velký, za zralosti tmavohnědý až černý, hladký nebo jemně bradavičnatý (Ehrendorfer 1976, Zahradníková 1985).

Morfologická variabilita tohoto druhu je vysoká, taktéž vzhledem k jeho pojetí, protože zahrnuje více ploidních úrovní, které se křížily mezi sebou. Toto pojetí pramení z neznalosti a komplikovanosti tohoto systému. Za vhodných podmínek může rostlina vytvářet kompaktní a za květu velmi dekorativní trsy. Na pastvinách je pak díky spásání velmi drobná a snadno přehlédnutelná. Od zde zmiňovaných druhů se v morfologii odlišuje především v absenci jakéhokoliv odění, krátkými internodii a hladkými plody.

Přestože například diploidní rostliny mohou být vzrůstem menší než vyšší ploidie, nelze je od sebe morfologicky odlišit (Ehrendorfer 1958).

2.5.1.2 Rozšíření

Vyskytuje se ve vysokých pohořích v jižní a centrální Evropě. Od Francie (Cévennes, Vogézy) do Německa (Jura). V Itálii Apeniny (např. Abruzzo) a většina Alp. Dále se vyskytuje v Karpatech. Na Slovensku roste v Tatrách a v centrálních Karpatech kromě Pienin (Zahradníková 1985) a pokračuje do Rumunska a Bulharska. Okrajově zasahuje do Polska. Na Balkáně se vyskytuje v zemích bývalé Jugoslávie: Slovinsku, Makedonii, Albánii (Šar Planina) a Řecku (např. Pindos), Černá Hora, Srbsko (Suva Planina). Zde je jeho rozšíření méně známo (Ehrendorfer 1976; in prep.).

2.5.1.3 Ekologie

Jedná se o horský druh rostoucí ve skalních puklinách, sutích a na pasených trávnících. Těžko snáší konkurenci ostatních rostlin a dobře se mu daří při okrajích dobytčích stezek apod. Roste na chudších bazických až neutrálních substrátech. Jedinci vyšší ploidie mohou růst na kyselejších podkladě, čedičích a silikátech. Vyskytuje se v subalpinském až alpinském stupni v otevřených společenstvech (Krendl 1993). Jednotlivé cytotypy tohoto polyploidního komplexu se mohou svými stanovištními nároky a ekologií výrazně lišit. Zatímco vyšší ploidie jsou konkurenčně zdatnější a můžeme je nacházet i v zapojenějších trávnících, ploidie nižší se omezují na různě sutě, skály a kary. Vyšší ploidie jsou schopné růst na kyselejších substrátech zatímco diploidi se omezují na neutrálnější substráty nebo vápence (Ehrendorfer 1976; in prep.).

2.5.1.4 Karyologie

Zahrnuje di-, tetra-, hexa-, okto- i dekaploidní ($2n=22; 44; 66; 88; 110$) jedince. Diploidi se vyskytují ostrůvkovitě většinou jako součást rozšířenějších vyšších ploidí. Vytvářejí pět linií. Ve slovenských Karpatech jsou diploidi označováni neplatně publikovaným jménem *G. fatrense* EHREND. & ŠÍPOŠOVÁ (Šípošová 1987). V Rumunsku pracovní označené *G. anisophyllon* „subsp. *primitivum*“. Na Balkáně je zastoupen diploidním cytotypem *G. plebeium* BOISS. & HELDR. Dále v severní Itálii v pohoří Brenta a přilehlém okolí *G. anisophyllon* „subsp. *tridentinum*“ a při hranicích v okolí průsmyku St. Benhardt *G. anisophyllon* „subsp. *tenué*“ (Ehrendorfer 1958, in prep.; Krendl 1993).

Tetraploidi jsou rozšířenější. Chromozomové počty dokládají výskyt v Polsku (Piotrowicz 1958, Skálinska et al. 1961) Slovensku (Šípošová 1987) a v Alpách v Rakousku, Itálii, Francii, Německu, Švýcarsku (Krendl 1993). Situace hexaploidů a oktoploidů je podobná, ale s omezením pouze na Alpy (Krendl 1993). Dekaploidi se vyskytují je v Apeninách (Ehrendorfer 1958).

Situace v Alpách je tedy situace o něco složitější. Na rozdíl od Karpat a Balkánu, kde se vyskytují jen diploidi a tetraploidi.

Vzácně byl nalezen triploidní kříženec (Šípošová 1987).

2.5.2 Galium sudeticum TAUSCH – svízel sudetský

2.5.2.1 Morfologie

Jedná se o vytrvalé, trsnaté byliny s četnými sterilními prýty. Lodyhy jsou přímé nebo vystoupavé, (7-)10-15(-20) cm vysoké, čtyřhranné, lysé, hladké. Prostřední lodyžní články jsou 1,5-2krát delší než listy. Listy v 5-6(-8)četných přeslenech, úzce obkopinaté, (12-) 15-18 (-20) mm dlouhé, 1,2-1,6 mm široké, krátce hrodité, na okraji lysé nebo vzácně s roztroušenými, k bázi listu směřujícími osténkatými chlupy, na bázi lodyhy brzy opadají. Květenství je latovité, v obrysu široce až protáhle vejčité, květní stopky 1,4-1,8 mm dlouhé. Koruna kolovitá, 2,5-3,4 mm v průměru, bílá. Merikarpia ledvinovitá, 1,4-1,7 mm dlouhá a 0,8-1,0 mm široká, tmavě hnědá až hnědočerná, na povrchu s pravidelně uspořádanými polokulovitými hrbolky (Ehrendorfer 1956, 1976, Štěpánková 2000).

Popis z (Štěpánková 2000) se vztahuje patrně k populacím rostoucím v Krkonoších (Tájek 2003). Noack (1983) ve své diplomové práci poukazuje na rozdíly především v odění a v povrchu plodů mezi populacemi z Krkonoš a ze Slavkovského lesa, k dispozici však měl jen několik položek. A dále Krahulcová & Štěpánková (1998) poukazuje na morfologické rozdíly mezi populacemi z Krkonoš a Slavkovského lesa, jako je poměr délky lodyhy a listu a chlupatost.

2.5.2.2 Rozšíření

G. sudeticum se podle stávajícího pojetí v současnosti vyskytuje v Krkonoších, odkud bylo popsáno (Tausch 1835), a ve Slavkovském lese.

Podle dosavadních znalostí se vyskytuje v Obřím dole v karu Čertova zahrádka, pak v tomtéž údolí na protějším svahu v lokalitě zvané Rudník, a dále na hřebeni mezi kary Malá a Velká kotelní jáma (Krahulcová & Štěpánková 1998). Na polské straně se vyskytuje v Malé a Velké sněžné jámě (Kucowa 1962). Další historickou lokalitou byla Velká kotlina v Hrubém Jeseníku doložená položkou od Lause (Štěpánková 2000), inventarizace Velké kotliny v roce (Bureš & Burešová 1983) jej znovu potvrdila, později se ale ukázalo, že šlo o záměnu s *G. pumilum* a současné inventarizace jej nepotvrdily a je zde nezvěstný (Radek Štencel ústní sdělení).

Ve Slavkovském lese roste výhradně na hadcových výchozech, např. lokality Vlček a Planý vrch (Krahulcová & Štěpánková 1998), Tájek (2003) ale dodává, že nalézal rostliny i v bezprostředním okolí skal. Nebyl však schopný určit, zda se jedná o *G. sudeticum* nebo *G. pumilum*, které by v okolí mělo růst. Druh *G. sudeticum* byl ze Slavkovského lesa poprvé uveden v práci F. Ehrendorfera (Ehrendorfer 1956) a od té doby je zde tradičně udáván. Příslušnost těchto populací k druhu *G. sudeticum* však není zcela zřejmé a je předmětem této práce.

Na polské straně Králického Sněžníku byla nalezena v 890 m. n. m. populace podobná *G. sudeticum* nebo *G. anisophyllum*, má však jinou velikost genomu a dosud se ji nepodařilo systematicky zařadit (Kolář et al. 2014).

2.5.2.3 Ekologie

Krkonošské populace rostou na sutích (Čertova zahrádka) či výchozech bazických hornin (Kotelní jámy), jako součást rozvolněných krátkostébelných subalpínských trávníků na humus chudých, sušších, mělkých a minerálně bohatých, zásaditých až neutrálních půd. Populace ze Slavkovského lesa rostou na hadcových skalkách (Krahulcová & Štěpánková 1998, Štěpánková 2000), ale i v jejich bezprostředním okolí mezi trsy bezkolence modrého (*Molinia caerulea*; Tájek 2003).

2.5.2.4 Karyologie

Galium sudeticum je tetraploid ($2n=44$) (Piotrowicz 1958, Krahulcová & Štěpánková 1998).

2.5.2.5 Ohrožení a ochrana druhu

V červeném seznamu ČR je zapsán jako druh kriticky ohrožený (C1r). Jedná se tedy o druh přirozeně vzácný, jehož areál se v poslední době nezmenšil (Grulich 2012). Populace mohou být

ohroženy lokálními katastrofami (sesuvy) aktuální nebezpečí ze strany změny společenstev jim nehrozí. Je také ze zákona, dle vyhlášky MŽP 395/1992 Sb., chráněn jako kriticky ohrožený druh (§1). Je také uveden ve Směrnici Rady evropských společenství číslo 92/43/EHS o ochraně volných stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin NATURA 2000 (Rybka et al. 2004).

2.5.3 *Galium valdepilosum* H. BRAUN. – svízel moravský

2.5.3.1 Morfologie

Jedná se o vytrvalé, řídce trsnaté byliny obvykle s četnými sterilními prýty na omak chytlavé. Lodyhy jsou chabé, poléhavé občas vystoupavé, (10-)15-30 cm vysoké, bohatě větvené, obvykle alespoň v dolní části krátce pýřité, spodní lodyžní články krátké, prostřední lodyžní články se prodlužují a jsou 2-4krát delší než listy. Listy v 6-7(-8)četných přeslenech, obkopynaté až úzce kopinaté, (8-)10-20(-25) mm dlouhé, (0,8-)1,0-1,8(-2,0) mm široké, zakončené chrupavčitou osinkou, na okrajích podvinuté, v dolní části lodyhy většinou krátce chlupaté, na okraji s roztroušenými obvykle nazpět směřujícími osténkatými chlupy. Horní listy jsou většinou hladké nebo chlupaté, ale méně. Květenství latovité, bohatě větvené, v obrysu široce obvejčité, často zaujímá až 3/4 délky celé rostliny. Květní stopky 2-5 mm dlouhé. Koruna kolovitá, 2-3(-4) mm v průměru, bílá. Merikarpia ledvinovitá, 1,0-1,4(-1,7) mm dlouhá, 0,7-0,9 mm široká, tmavohnědá, lesklá, na povrchu s nápadnými kuželovitými hrbolky. Existují dva morfologicky odlišné cytotypy (2x a 4x), přičemž diploidi se liší menšími rozměry merikarpií, koruny a listů. Tetraploidní rostliny jsou v dolní polovině nápadně chlupatější (Ehrendorfer 1976, Štěpánková 1997, 2000).

2.5.3.2 Rozšíření

Jedná se o druh s těžištěm rozšíření ve střední Evropě. Vyskytuje se disjunktivně od jihovýchodního Německa (Česká republika, jižní Polsko, severní Rakousko) až po západní Ukrajinu s izolovanou arelou *G. valdepilosum* subs. *slesvicense* v Dánsku (Ehrendorfer 1976, in prep.). V Čechách i na Moravě roste v teplejších oblastech, většinou ve výrazněji modelovaných územích, v nižším stupni pahorkatin a vrchovin. Zřetelná je kumulace v Českém středohoří, další výskyty jsou např. v okolí Prahy. V moravském předhůří Českomoravské vrchoviny je vázán na kaňonovitá údolí řek a potoků. V mezofytiku jen vzácně, výjimkou je údolí Vltavy (Štěpánková 2000).

2.5.3.3 Ekologie

Jedná se o teplomilný druh. Osidluje suché kamenité a skalnaté stráně, osluněné sutě, světlé lesy (doubavy, dubohabřiny, bory). Vyskytuje se také v okolí ventarol. Je to slabý kompetitor, který

roste na mělkých, vysychavých, silně skeletovitých, mírně zásaditých až mírně kyselých, minerálně bohatých, ale na živiny chudých půdách (Štěpánková 2000). Oba cytotypy se vyskytují na hadcových i nehadcových lokalitách, na silikátových i bazických horninách (zřídka však na vápencích; Krauhulcová & Štěpánková 1998). Diploidi obecně preferují otevřené dubo-borové lesy na kyselých půdách, zatímco tetraploidi jsou schopni růst i v zapojenější travinné vegetaci na bazických půdách (Kolář et al. 2014).

2.5.3.4 Karyologie

Galium valdepilosum sestává z di- a tetraploidního ($2n=22; 44$) cytotypu. Areály těchto cytotypů se nepřekrývají a v současnosti nebyly nalezeny žádné cytotypově smíšené populace (Kolář et al. 2014). Diploidi se vyskytují převážně na jihozápadě Moravy a dále na jih směrem do severního Rakouska. Tetraploidní populace rostou vzácně na Moravě (na sever od výskytu diploidů), v Čechách, ve východním Bavorsku a v pohoří Harz (Ehrendorfer 1949, 1956, Krauhulcová & Štěpánková 1998, Kolář et al. 2014). Z jižního Polska jsou udávány tetraploidní rostliny (Ehrendorfer 1962, Kucowa & Madalski 1964). Historicky byli z Polska udáváni i diploidi (Skálinska et al. 1961), nepodařilo se je však znovu nalézt a pravděpodobně šlo o chybu (Kolář et al. 2014). V Dánsku se vyskytuje *G. valdepilosum* subsp. *slesvicense*, která je také tetraploidní (Ehrendorfer 1975).

2.5.3.5 Ohrožení a ochrana druhu

V červeném seznamu ČR (Grulich 2012) je zapsán jako druh ohrožený (C3). Vzhledem ke kompetičním schopnostem druhu jsou rostliny ohrožené zarůstáním lokalit.

2.6. Problematika použitých metod

2.6.1 Dominantní marker AFLP (amplified fragment length polymorphism)

AFLP je metoda založená na namnožení určitých fragmentů celkové jaderné DNA, jejichž přítomnost či nepřítomnost se přečte pomocí vertikální polyakrylamidové elektroforézy nebo v současnosti častěji používaným automatickým sekvenátorem (Mueller & Wolfenbarger 1999, Meudt & Clarke 2007).

Postup získávání fragmentů se skládá ze čtyř kroků. Prvním je štěpení celkové DNA pomocí dvojice restričních enzymů, které štěpí DNA v místě konkrétní sekvence. Druhým krokem je ligace adaptorů na konce nastříhaných fragmentů pomocí enzymu T4 ligázy, ty jsou důležité pro dobré nasedání dalších primerů. Tímto způsobem vytvoříme opravdu velké množství fragmentů, které musíme zredukovat. Proto proběhnou ještě další dvě selektivní PCR reakce s použitím specifitějších primerů. V posledním kole je zároveň použit fluorescenčně značený primer, aby fragmenty bylo možné přečíst (Vos et al. 1995, Meudt & Clarke 2007).

Datovým výstupem této metody je řada (pattern) proužků, představující přítomnost různě dlouhých fragmentů. Proužek o určité délce představuje lokus. Skórováním těchto dat získáme matici jedniček (proužek přítomen) a nul (proužek nepřítomen).

AFLP patří mezi dominantní (nebo též binární) markery, protože zde nacházíme jen stavy 0 a 1 a není možné rozlišit dominantního homozygota od heterozygota (Fér 2011). Z těchto dat tedy nemůžeme odhadovat frekvence alel ani např. míru inbreedingu. Jednotlivé lokusy jsou anonymní a nemáme žádnou představu o jejich vývojové dynamice a rychlosti mutací a jejich homologii, kdy sledované alely nemusí pocházet ze stejného místa. Tomuto problému se dá vyhnout vyřazením krátkých fragmentu (do 150 bp) z analýz dat. Jinak ale riziko homoplázie (fragменты nejsou homologní) stoupá s taxonomickou vzdáleností porovnávaných vzorků. Též nepřítomnost proužku může mít různé následky, proto je u AFLP vhodné použít např. *Jaccardův* koeficient nebo takový, který negativní shodu (sdílení absence proužku) nebere v potaz (Bonin et al. 2007). Protože enzymy štěpí všechnu DNA, je tato metoda velmi citlivá na kontaminaci (nutné zahrnutí prázdných vzorků) i na celkový technický postup. Jako ideální se doporučuje zpracovávat vzorky najednou s použitím stejných materiálů a chemikálií. Přidávání dalších vzorků je problematické, srovnávání vzorků ze dvou laboratoří již téměř nemožné. Součástí každé publikace využívající AFLP by měla být chybovost „*error rate*“, která se vypočítá opakováním 5-10 % analýz a neměla by překračovat 5 % (Bonin et al. 2004).

Všechny tyto nevýhody jsou na druhou stranu také výhodami této metody. Nepotřebujeme mít předchozí znalost studovaného genomu. Analýzou celého genomu máme k dispozici velké

množství nezávislých lokusů, které mohou definovat jednotlivé druhy a populace a dobře tak poslouží např. při odhalování hybridizace nebo vzniku polyploidů (Guo et al. 2006, Španiel et al. 2011). Rozlišovací schopnost AFLP může být velmi vysoká, proto se využívá při studiu blízce příbuzných druhů, kdy variabilita sekvenovaných úseků např. ITS není dostačující (Després et al. 2003). Tím se i snižuje již zmiňované riziko homoplázie (Fér 2011).

2.6.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie, zkráceně FCM (flow cytometry measurement) je levná a rychlá metoda, která spočívá v kvantitativním vyhodnocování různých fyzikálních vlastností jednotlivých částic. Částicemi mohou být jednotlivé buňky, jádra, chromozómy (Doležel et al. 2007b), ale také problematické materiály jako je pyl (Kron et al. 2014). V botanice se nejčastěji užívá k měření množství DNA v jádře, což implikuje užití v odhalování reprodukčních způsobů včetně agamických komplexů (Dobeš et al. 2013; Krahulcová & Rotreklová 2010; Matzk et al. 2000). Tato metoda nalézá široké uplatnění v mnoha oborech i mimo botaniku, primárně ovšem v medicíně, ze které tato metoda umožňující počítání červených krvinek v 50. letech minulého století vzešla (Shapiro 2005).

Cytometrická analýza rostlinných vzorků byla zprvu značně problematická, poněvadž většina rostlinných buněk je vázána v pletivech a je obtížné je separovat. První pokusy spočívaly v rozpouštění buněčných stěn a získávání celých protoplastů (Suda 2011). Až v roce 1983 (Galbraith et al. 1983) byl uveden velmi jednoduchý a převratný postup spočívající v mechanické izolaci jader (prosté nasekání pletiv žiletkou v hypotonickém izolačním roztoku, odfiltrováním zbytků pletiv a přidáním potřebného barviva).

K barvení jaderných struktur lze použít barviva, která spadají do tří skupin podle struktur, na které se váží. Ke stanovení absolutní velikosti genomu je nejvhodnější ethidium jodid nebo propidium jodid, protože se vmezeřují do DNA neselektivně. Častěji se používá propidium jodid, protože je méně toxický. Dále jsou barviva, která se váží na A-T bohaté úseky. Mezi ně patří nejpoužívanější DAPI (4', 6-diamidino-2-fenylindol; Otto 1990, Kapuscinski 1995), s velmi dobrým rozlišením i malých rozdílů v množství a složení DNA. Nehodí se však, vzhledem ke způsobu vazby, na měření absolutní velikosti genomu (Doležel et al. 1992). Poslední skupinou jsou barviva vážící se na C-G bohaté úseky DNA, kam patří antibiotika mithramycin, chromomycin a olivomycin. V dnešní době se nepoužívají, protože nedosahují rozlišovacích schopností A-T specifických barviv (Suda 2011).

Pro průběh analýzy je nezbytné, aby obarvené částice vbíhaly do měřicí komůrky jednotlivě. Toho lze dosáhnout díky tzv. hydrodynamické fokusaci, kdy je suspenze částic soustředěna do středu měřicí komůrky jinou kapalinou (destilovanou vodou nebo solným roztokem), která je současně

vstříkována pod vyšším tlakem. Částice jsou díky tomu seřazené za sebou a protékají skrze komůrku postupně.

Pro změření míry fluorescence obarvených struktur je důležitý zdroj excitačního záření. Jako zdroj záření slouží nejčastěji laser nebo dioda a to o různých vlnových délkách podle užití daného barviva. Síla intenzity fluorescence (energie uvolněné při přechodu z excitovaného stavu do stavu původního) koresponduje s velikostí částice. Jelikož excitační záření má jinou vlnovou délku než vyzářená energie lze snadno odfiltrovat (Suda 2011). Délka jedné analýzy je několik minut, přičemž skrze komůrku můžeme analyzovat až 1000 částic za vteřinu (Doležel et al. 2007a).

Výsledky analýzy se zobrazují pomocí histogramu (síla relativní fluorescence/množství změřených částic) nebo 2D grafu s dodatečným zobrazením dalších parametrů (např. rozptyl světla). Důležitým parametrem kvality analýzy je variační koeficient (*coefficient of variation, CV*; Watson 1991). Jde o podíl směrodatné odchylky a střední hodnoty pozice píku (z anglického „peak“). Čím je pík užší, tím je CV menší. Ideální hodnota je do 3%. Při práci s problematickým materiálem je možné tolerovat i hodnoty do 5%.

Výhod průtokové cytometrie je několik. Je rychlá, za den můžeme změřit až stovky jedinců. V rámci jednoho měření, dle našeho zájmu, můžeme spolu měřit i několik jedinců. Jedná se o nedestruktivní metodu (obvykle stačí kousek listu), takže ji lze uplatnit i u ohrožených taxonů (Suda 2011). K analýze můžeme využít téměř jakékoliv pletivo. Problémem může být čeled' *Brassicaceae*, kde se ve většině pletiv uplatňuje endopolyploidizace a je možné použít jen korunní lístky. Možná je také analýza herbářových položek (Suda & Trávníček 2006) nebo konzervování pletiv v glycerolu (Kolář et al. 2012b), v současnosti probíhají pokusy s konzervací pomocí kuchyňské soli (Suda et. al in prep.). Průtoková cytometrie je nízkonákladová. Cena jednoho měření je několik desítek korun.

Velkou nevýhodou je tzv. nulová vizuální rozlišovací schopnost, kdy nevíme, zda měříme jednotlivé jádro nebo shluk jader (Suda 2011). Při vyhodnocování je nutné být kritický. Počty a násobky chromozomů nemusí korelovat s množstvím DNA. Pokud nemáme k dispozici i chromozomové počty z tradičních roztlakových preparátů, měli bychom se bavit pouze o „DNA ploidii“ (Suda et al. 2006). Taktéž je potřeba si být vědom možných interakcí sekundárních metabolitů s použitým barvivem (např. Bennett et al. 2008) a vyvarovat se analýzy přestárlých nebo jinak stresovaných pletiv.

2.6.3 Sekvenování DNA

Při sekvenování DNA získáváme informaci v podobě pořadí nukleotidů dané sekvence. Rozdíly mezi sekvencemi se mohou vyskytovat v podobě záměn nukleotidů nebo výskytem insercí a delecí jednoho či více nukleotidů (indel). Klasickou a nejčastěji používanou metodou je tzv. Sangerovo

sekvenování (Sanger 1988). Jde v podstatě o speciální PCR reakci, kde se kromě stavebních jednotek dNTP (deoxyribonukleotidy) vyskytuje i fluorescenčně značené ddNTP (dideoxyribonukleotidy). Při navázání dNTP polymerace úseku pokračuje, zatímco při navázání ddNTP chybí vazebné místo a polymerace úseku se ukončí. Správným poměrem dNTP a ddNTP tak v průběhu reakce získáme spoustu různě dlouhých úseku, které se liší právě o jeden nukleotid, a které v kapilárovém sekvenátoru elektroforézou roztřídíme. Fluorescenčně značené ddNTP na konci fragmentu umožní jeho přečtení. Délka čtení je v průměru 700 bazí dlouhá. Zvolením vhodných primerů můžeme jednotlivá částečně se překrývající čtení spojit a získat úsek i několik kilobází dlouhý. Podmínkou je znalost úseku, který chceme studovat (Krač 2011).

Podle kladených otázek si musíme zvolit, kterou část DNA chceme studovat. Zda jadernou (nDNA), mitochondriální (mtDNA) nebo chloroplastovou (cpDNA) a z toho úseky kódující či nekódující.

Jaderná DNA se dědí po obou rodičích (biparentálně) a může být tedy vhodná k detekci hybridizace resp. získání informace o hybridizaci a původu obou rodičovských linií. Díky vysoké abundanci a výskytu extrémně konzervativních úseků, vhodných k nasedání primerů (souhrn v Krač 2011) je často využívána jaderná ribosomální DNA (nrDNA). Jedná se o genové rodiny zodpovědné za stavbu částí malé a velké ribosomální podjednotky jejichž součástí jsou i do RNA přepisované nekódující části jako je např. Internal Transcribed Spaces (ITS). Hlavním problémem genů s velkým počtem kopií (stovky až tisíce kopií) je jev zvaný *concerted evolution* (Elder & Turner 1995). Jedná se o homogenizaci rozdílů mezi sekvencemi, a tedy ke ztrátě informace o jedné z rodičovských linií. Obecně se předpokládá, že u nedávno vzniklých hybridů jsou zachovány genové skupiny u obou rodičů. Ke koncertované evoluci ale nedochází u všech organismů stejnou rychlostí. Jsou známy případy, kdy ke kompletní homogenizaci sekvencí dochází již po několika generacích (*Armeria*, Fuertes Aguilar et al. 1999) v určitých případech je tento proces zpomalen a nedojde do konce (*Tragopogon*, Soltis et al. 2004), či téměř zcela zastaven (*Winteraceae*, Suh et al. 1993).

Vyhnout se tomuto problému lze studiem jaderných genů s nízkým počtem kopií (low-copy). Na rozdíl od nrDNA ale nejsou široce použitelné. Je nutná optimalizace, jelikož evoluční dynamika genů se může u různých skupin lišit. Možnosti studia komplikuje přítomnost polyploidů a nutnost rozpoznání ortologních a paralogních genů. Ortology jsou geny, které se rozlišily na základě speciace dvou druhů a dávají nám nějakou historickou informaci. Zatímco paralogy jsou geny, které se rozlišily na základě duplikace v jednom genomu. Jelikož pracujeme s různými variantami sekvencí, je nutné dané vzorky rozlišit klonováním a vzhledem k přítomnosti koncertované evoluce je vhodné studium doplnit o další marker (Krač 2011).

Práce s cpDNA je mnohem jednodušší jelikož je haploidní a nerekombinuje. Navržené primery tak lze použít u různých skupin bez nutnosti složitější optimalizace. Jednotlivé úseky jsou na chromozomu často ve stejném pořadí a díky tomu je DNA z chloroplastu univerzální a využitelná napříč rostlinnou říší (Krak 2011). CpDNA se na rozdíl od jaderné DNA dědí v dřtivě většině případů samičí linii (Harris & Ingram 1991). Jinak tomu je např. u nahosemenných, kde je cpDNA děděna výhradně po samčí linii (*Sequoia*, Neale et al. 1989; *Picea*, Sutton et al. 1991). Ve výjimečných případech se lze setkat s dědičností smíšenou (*Silene*, McCauley et al. 2007). CpDNA představuje kruhový chromozom o délce 71-230 kbp. Těchto chromozomů může být, vzhledem k počtu chloroplastů, v buňce až několik desítek. Nachází se zde velmi konzervativní úseky, kódující proteiny důležité pro správný chod buňky např. enzym RuBisCo nebo části fotosystému I a II apod. (Alberts et al. 2002) využitelné při zkoumání hluboké fylogeneze na úrovni řádu (*Cucurbitales*, Zhang et al. 2006) či různých linií krytosemenných rostlin (např. Soltis et al. 2002). Mezi kódujícími úseky jsou však využitelné i úseky nekódující, které jsou dostatečně informativní i na mezidruhovú úrovni (Taberlet et al. 1991, Shaw et al. 2005, 2007). Známým, avšak v některých případech obtížně zjistitelným problémem je tzv. „*chloroplast capture*“. Kdy je jaderná DNA vyředěna při intenzivní asymetrické hybridizaci. Zatímco chloroplastová DNA zůstane. Výsledkem je inkongruence mezi jadernou a chloroplastovou DNA, jelikož informace o hybridizaci bude v jádře vlivem rekombinace smazána a nečitelná. Vhodnou kombinací jak jaderných tak chloroplastových markerů můžeme tyto události podchytit (např. *Saxifraga* Winkler et al. 2013).

Mitochondriální DNA (mtDNA) je hojně využívána při studiu živočichů, u rostlin je její využití omezené. Až na výjimky je opět děděna uniparentálně. Nejedná se však o jednu kruhovou molekulu, nýbrž a směs různě dlouhých lineárních, cyklických a větvených molekul s velmi častými přestavbami, změnami pořadí genů, insercemi apod. Což znemožňuje její použití v menších projektech (Krak 2011). V kontrastu k čilé strukturní dynamice, ale obsahuje velmi konzervativní úseky DNA a byla použita např. při studiu fylogeneze krytosemenných rostlin (Soltis et al. 2002, Qiu et al. 2010).

3. Metodika

3.1 Sběr materiálu

Sběr rostlinného materiálu probíhal od roku 2009 do roku 2013 se zaměřením na Českou republiku a sousedící státy. Pro širší kontext jsem využil i sběry ze Skandinávie, Velké Británie a Islandu. Jako outgroup jsem do chloroplastových analýz zařadili *G. saxatile* ze tří lokalit.

Pro každou nalezenou populaci jsem sebral část trsu z alespoň 10 jedinců na molekulární analýzy (v několika případech méně s ohledem na velikost populace). Trsy jsem vybíral minimálně jeden metr vzdálené, abych se vyhnul opakovanému sebrání téhož jedince. Dále jsem sebral několik lodyžek z většího množství rostlin pro zjištění vnitropopulační ploidiní variability. Každou populaci jsem podložil minimálně jednou herbářovou položkou, která bude uložena v herbáři Katedry botaniky PřF UK (PRC). Část živého materiálu jsem dal do mikrotenových sáčků s trochou vody, pro pozdější cytometrické analýzy. Listy a části lodyh bez květů jsem v den sběru zabalil do čajových sáčků (dobře propouštějí vlhkost a jsou pevné) a zasypal silikagelem s indikátorem nasycení vodou. Pokud se silikagel nasýtil, vyměnil jsem ho za čerstvý a dále skladoval v neprodyšných tubách při pokojové teplotě. Pokud se při dlouhodobém skladování silikagel opět nasýtil, např. důvodem netěsnosti nádoby, vyměnil jsem jej opět za čerstvý.

Cytometrické analýzy byly prováděny k ověření ploidie. Na populacích *G. sudeticum*, *G. valdepilosum* a *G. anisophyllon* (vše tetraploidní cytotypy) jsem dále udělal přesnější opakovaná měření pro srovnání relativní velikosti genomu.

Pro sekvenování chloroplastové DNA jsem kromě vlastních populací využil i data dalších druhů z jiného současně běžícího projektu: *G. valdepilosum* (2x), *G. austriacum* (2x), *G. anisophyllon* (2x), *G. cracoviense* (2x), *G. oelandicum*, *G. sternerii* (2x, 4x), *G. suecicum* (2x), *G. normanii* (4x), *G. fleurotii* (4x, 8x) a po jednom jedinci *G. baldense* (2x) a *G. megalospermum* (2x).

Do molekulárních AFLP analýz byly zahrnuty tetraploidní cytotypy druhů *G. valdepilosum*, *G. anisophyllon*, *G. austriacum* a *G. sudeticum*.

Z těchto populací byl vyčleněn subset 12 populací zaměřený na detailní zhodnocení morfologické variability: 4 populace *G. sudeticum* (2 Krkonoše a 2 Slavkovský les), 5 populací tetraploidního *G. anisophyllon* (3 ze Slovenska a 2 z Rakouských Alp) a 4 populace tetraploidního *G. valdepilosum* z lokalit blízkých Slavkovskému lesu (2 hadcové a 2 nehadcové). Rostliny použité v morfometrických analýzách poslouží jako dokladový materiál a alespoň část z nich bude uložena v herbáři (PRC).

Vzhledem k výsledkům, budu pro přehlednost v celém textu označovat populace svízelů ze Slavkovského lesa jako *G. „sudeticum“* v uvozovkách, s ohledem na jeho pravděpodobné přeřazení z druhu *G. sudeticum* k druhu *G. valdepilosum*.

3.2 Průtoková cytometrie (FCM)

Pro stanovení DNA ploidie jsem celkem analyzoval 427 jedinců ze 46 populací. Z toho 5 populací *G. sudeticum* z Krkonoš, 4 populace *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa, 20 populací *G. valdepilosum* (7 z České republiky, tři z Polska, jedna z Dánska, 8 z Německa, jedna z Rakouska) a 15 populací *G. anisophyllon* (čtyři z Rakouska, 10 ze Slovenska, jedna z Itálie), jednu populaci z Polska a jednu populaci z Velké Kotliny v Jeseníkách o které se domnívám, že by se mohlo jednat o hybrida *G. pumilum* × *G. sudeticum*.

Pro stanovení stupně DNA ploidie (Suda et al. 2006) a rozdílech v relativní velikosti monoploidního genomu studovaného materiálu byla použita průtoková cytometrie. Pro barvení jsem použil fluorochrom DAPI. Barvení propidium-Iodidem, pravděpodobně kvůli interakcím se sekundárními metabolity rostlin, poskytuje u této skupiny výrazně méně přesné výsledky (Kolář et al. 2013).

Rostlinný materiál jsem odebíral z živých jedinců a uchovával v chladu v navlhčených mikrotenových sáčcích nebo sáčcích se ziplockem s označením populace a jedince. Pro zpracování bylo nezbytné, aby alespoň část rostliny zůstala zelená a živá. Pro delší uchování při delších zahraničních výjezdech se jako lepší jevíly mikrotenové sáčky, ve kterých rostliny přežívaly déle, pravděpodobně díky lepšímu přístupu vzduchu. Životnost vzorku snižuje střídání teplot. Je lepší rostliny uchovávat raději při pokojové nebo mírně nižší teplotě, pokud nejsme schopni udržet stabilní teplotu lednice. Nesmí dojít k přemrznutí, jinak se též životnost vzorku rapidně sníží. To se obvykle stane, pokud vzorky umístíme v lednici přímo u zdroje chlazení.

Pro stanovení DNA ploidie jsem analyzoval směsné vzorky nejvíce 5 jedinců současně, pokud výsledný histogram poukazyval na směs dvou DNA ploidí (vysoké píky v pozici odpovídající relativní fluorescenci diploidní i tetraploidní rostliny), každého jedince jsem znovu analyzoval zvlášť.

Pro zjištění jemnějších rozdílů v monoploidní relativní velikosti genomu jsem prováděl tři měření jednoho jedince ve třech různých dnech. Pokud se měření z různých dnů lišily o více než 2% nejvzdálenější hodnotu jsem vyřadil a zopakoval měření. Všechny vzorky byly připraveny podle optimalizovaných pracovních postupů (Doležel et al. 2007a) používaných v Laboratoři průtokové cytometrie katedry botaniky PŘF UK.

Od každého jedince jsem do analýz odebral cca 4 mm² pletiva. Jako interní standard jsem použil *Bellis perennis* L. (sedmikráska chudobka, 2C = 3,38 pg; Schönswetter et al. 2007), který jsem k ostatnímu analyzovanému materiálu přidával vždy v poměru 1:1. Materiál jsem v Petriho misce s 600 µl ledového extrakčního pufru OTTO I (složení tab. 1; Otto 1990) rozsekal nepoužitou ostrou žiletkou a promíchal opakovaným nasátím a vypuštěním suspenze pipetou. Suspenze jsem přefiltroval přes nylonový filtr s průměrem ok 42 µm do plastové zkumavky. Inkubace vzorků nebyla nutná. Vzhledem k pracovnímu postupu k ní ale docházelo a to v rozmezí 10 – 50 minut při pokojové teplotě a neměla na výsledky analýzy významný vliv. Několik minut před analýzou, jsem do vzorku přidal 1 ml barvicího roztoku s pufrem OTTO II (složení tab. 2; Otto 1990) a barvicí směsí s DAPI (složení v tab 3).

Ze vzorku bylo změřeno 5 000 částic při rychlosti 15 – 25 částic za vteřinu. Vzorky byly analyzovány v Laboratoři průtokové cytometrie katedry botaniky PŘF UK na cytometru Partec CyFlow ML (Partec GmbH, Münster, Německo), jako excitační zdroj byl použit UV LED čip. K analýze histogramů byl použit software FloMax 2.4d (Partec).

Tabulka 1: Příprava pufru OTTO I.

Pufr OTTO I
0,1M monohydrát kyseliny citronové
0,5% Tween 20 (v/v) (detergent)
destilovaná H ₂ O
<u>přefiltrovat (průměr ok 22 µm), skladovat v chladu</u>

Tabulka 2: Příprava pufru OTTO II.

Pufr OTTO II
0,4M Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O
destilovaná H ₂ O
<u>přefiltrovat (průměr ok 22 µm), skladovat při pokojové teplotě</u>

Tabulka 3: Příprava barvicí směsi pro cytometrické analýzy s fluorochromem DAPI.

Barvicí směs s DAPI	
zásobní roztok DAPI (Sigma); finální koncentrace 4 µg/ml	1 ml
pufr Otto II	25 ml
β-mercaptoethanol (Sigma); finální koncentrace 2 µg/ml	50 µl
<u>připravit čerstvý pro každé měření</u>	

3.3 Počítání chromozomů

Pro klasické počítání chromozomů pomocí světelného mikroskopu jsem použil tzv. feulgenovo barvení. Použil jsem kořenové špičky klíčících semen podle postupu v (Kolář et al. 2013).

Semena jsem sebral v roce 2013 a skladovali v suchu. Před nakličováním jsem semena uložil na 6 týdnů do lednice. Nakličování jsem prováděl v Petriho miskách, navlhčené na filtračním papíře. Semena klíčila mezi 10 až 20 dnem. Celá naklíčená semena s kořínky dlouhými 3-5 mm jsem vložil do 0,002 M roztoku 8-hydroxychinolinu; nejprve na dvě hodiny v temnotě při pokojové teplotě a pak jsem je dal na další dvě hodiny do lednice (4 °C). Poté jsem semena s klíčky propláchl vodou a předal do čerstvě připravené směsi ledové kyseliny octové (99 %) a ethanolu (96 %) v poměru 3:1. Takto připravené vzorky jsem do zpracování uchovával v tubách v mrazáku (-20 °C).

Vzorky jsem dal na 30 minut do 5M HCl při pokojové teplotě. Poté jsem je dvakrát promyl vodou. Vodu jsem odsál a přidal schiffovo činidlo. Vzorky jsem poté dal do tmy a barvil 60 minut při pokojové teplotě, a pak ještě 15 minuty lednici (4 °C). Následně jsem vzorky přenesl na podložní sklíčko do kapky 60 % kyseliny octové. Odřízl jsem přebytečná pletiva a nechal na sklíčku pouze mléčně zabarvenou kořenovou špičku. Pro lepší rozprostření pletiva jsem kořenovou špičku lehce narušil preparační jehlou, pak přiklopil krycím sklíčkem a lehce rozmáchl. Takto připravené vzorky jsem přenesl k počítání do mikroskopu Axio Imager A1 light microscope (Carl Zeiss) s digitálním fotoaparátem.

3.4 Morfometrická analýza

Pro morfometrické analýzy jsem z každé vybrané populace (tab. 4) sebral max. 20 jedinců, na kterých jsem změřil celkem 11 kvantitativních a 6 kvalitativních znaků. Pro míru chlupatosti jsem užil semikvantitativní škálu od 1-lysý do 4-hustě chlupatý. Ostatní znaky byly měřeny pomocí standardních metrik (délky, počty); seznam všech znaků v tabulce 5. Tato sada znaků byla na každé rostlině změřena na třech různých fertilních lodyhách. Dále jsem dopočítal ještě čtyři znaky poměrové. Chybějící hodnoty (asi 1 % z celkového datasetu) byly doplněny průměrem populace, v níž se jedinec s chybějící hodnotou vyskytoval. Sady těchto tří měření jsem pro jednotlivé jedince následně zprůměroval. Měření jsem prováděl v programu ImageJ (Schneider et al. 2012) na naskenovaných položkách s přiloženým měřítkem.

Tabulka 4: Seznam populací použitých v morfologických analýzách. Podrobnější popis lokalit v příloze 8.2.5.

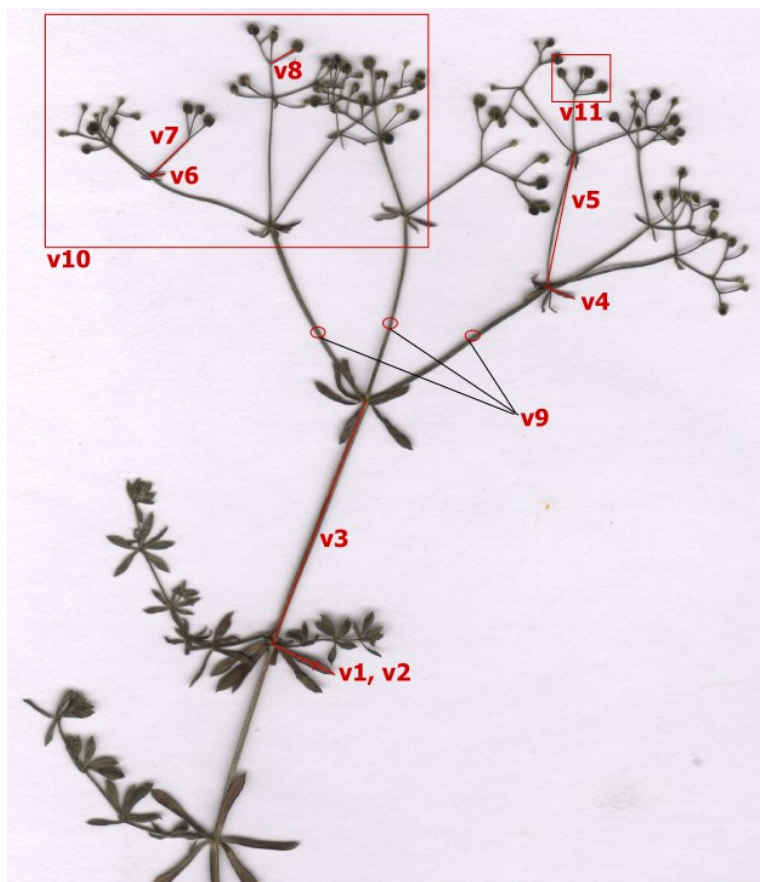
Druh/skupina	Č. pop.	Jméno lokality	Stát	Kraj	Podklad
G. anisophyllum	G139	Králova studňa	SK	Báňskobystrický kraj	vápenec
G. anisophyllum	G175	Obertauern	AT	Salcbursko	silikát
G. anisophyllum	G176	Sölkpass	AT	Štýrsko	silikát
G. anisophyllum	G264	Osobitá	SK	Žilinský kraj	/
G. sudeticum (Krkonosé)	G171	Čertova zahrádka	CZ	Královéhradecký kraj	erlán
G. sudeticum (Krkonosé)	G172	Kotel	CZ	Královéhradecký kraj	erlán
G. valdepilosum	G043	Kallmünz	D	Bavorsko	vápenec
G. valdepilosum	G045	Schuttersmühle	D	Bavorsko	dolomit
G. valdepilosum	G050	Woja	D	Bavorsko	hadec
G. valdepilosum	G151	Velichov	CZ	Karlovarský kraj	čedič
G. "sudeticum" (Slavkovský les)	G032	Planý vrch	CZ	Karlovarský kraj	hadec
G. "sudeticum" (Slavkovský les)	G136	Vlček	CZ	Karlovarský kraj	hadec

Povrch plodů je v této skupině důležitým znakem, ale nepodařilo se mi je zahrnout vzhledem k jejich malým rozměrům a neschopnosti tyto drobné rozdíly objektivně kvantifikovat a porovnat. Přesto jsem alespoň pro rychlé vizuální zhodnocení pořídil fotografie jednoho zralého a dobře vyvinutého plodu ze všech populací určených k morfologické analýze (kromě G045) + populace možného hybridu *G. pumilum* × *G. sudeticum* (G296) z Velké Kotliny.

Fotografie byly pořízeny mikroskopem olympus AX70 provis při 100x zvětšení pod UV zářením, kdy semena autofluoreskovala modrým světlem. Sady různě zaostřených fotografií byly pořízeny fotoaparátem NIKON D3200 a složeny v softwaru Zerene Stacker 1.02 (Trial; Zerene Systems LLC; zerenesystems.com).

Tabulka 5: Seznam měřených znaků a jejich zkratky použité v morfometrických analýzách.

Číslo znaku	Znak	Zkratka znaku
v1	Délka listu v části lodyhy pod květenstvím	leaf_le
v2	Šířka listu v části lodyhy pod květenstvím	leaf_wi
v3	Délka internodia nad měřeným listem	inter_le
v4	Délka listu ve střední části květenství	midle_leaf
v5	Délka navazujícího internodia ve střední části květenství	midle_inter
v6	Délka listu v horní části květenství	up_leaf
v7	Délka navazujícího internodia ve horní části květenství	up_inter
v8	Délka plodní stopky	stem
v9	Počet větví květenství	nb_infl_branch
v10	Počet plodných stopek ve větvi květenství	bract_infl
v11	Počet plodných stopek vycházejících z jednoho místa	bract_part
v12	Poměr délky a šířky listu (1/2)	leaf_lg_wi
v13	Poměr délky internodia a listu (3/1)	leaf_inter
v14	Poměr délky internodia a listu ve střední části lodyhy (5/4)	leaf_inter_mid
v15	Poměr délky internodia a listu v horní části lodyhy (7/6)	leaf_inter_up
v16	Chlupatost stonku v dolní části lodyhy	hair_stem_down
v17	Chlupatost listu v dolní části lodyhy	hair_leaf_down
v18	Chlupatost stonku ve střední části lodyhy	hair_stem_mid
v19	Chlupatost listu ve střední části lodyhy	hair_leaf_mid
v20	Chlupatost stonku v horní části lodyhy	hair_stem_up
v21	Chlupatost listu v horní části lodyhy	hair_leaf_up



Obrázek 6: Měřené kvantitativní znaky. Pořadí podle tabulky 5.

Analýzu dat jsem kompletně prováděl v programovém prostředí R 3.0.2. (R Core Team 2013) s pomocí skriptu MorphoTools (Koutecký in pres.). Jelikož diskriminační analýza vyžaduje normální rozdělení dat, otestoval jsem znaky na normální rozdělení (Shapiro-Wilk test), a znaky s nenormálním rozdělením jsem pro potřebné analýzy zlogaritoval přirozeným logaritmem. Zda některé znaky nejsou silně korelované, jsem ověřil pomocí Pearsonova a Spearmanova korelačního koeficientu.

Na základě geografie jsem si stanovil celkem 4 skupiny (*G. sudeticum* Krkonoše, *G. „sudeticum“* Slavkovský les; *G. anisophyllon* a *G. valdepilosum*), se kterými operuji v diskriminačních analýzách.

Analýzu struktury dat jsem provedl s PCA (analýza hlavních komponent) na datech centrovaných na nulový průměr a standardizovaných na jednotkovou směrodatnou odchylku. Pro jednotlivé mnou definované skupiny/taxony jsem provedl oddělené PCA analýzy (výsledky těchto dílčích analýz nejsou zobrazeny), ve kterých jsem si určil odlehle jedince a vyřadil je z vypočítávání populačních průměrů. Pro tyto populační průměry jsem provedl dvě shlukové metody: UPGMA (metoda průměrné vzdálenosti) a UPGMC (Gowerova metoda centroidní metoda).

Na standardizovaných a centrovaných datech jsem provedl kanonickou diskriminační analýzu (discr.calc), programový R balíček vegan (Oksanen et al. 2013). K vytvoření diskriminační funkce jsem použil pouze populace *G. valdepilosum* a *G. anisophyllon* (apriorně definované geograficky a ekologicky vymezené druhy, které byly zároveň podpořeny AFLP výsledky, viz výsledky, kapitola 4.5). Naopak populace druhu *G. sudeticum* (populace z Krkonoš i Slavkovského lesa) jsem do této analýzy pouze následně pasivně promítl (jejich zařazením s pomocí předem vytvořené diskriminační funkce). K nalezení znaků odlišujících *G. sudeticum* z Krkonoš a *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa jsem provedl ještě jednu diskriminační analýzu na datech pouze z těchto 4 populací.

Znaky nejlépe oddělující vybrané skupiny jsem určil v krokové diskriminační analýze „forward selection“ (funkce „discr.step“, 500 permutací založená na funkci „ordistep“ z balíčku vegan). Dále jsem provedl klasifikační diskriminační analýzu s krosvalidací (classif.da), opět pouze na populacích *G. valdepilosum* a *G. anisophyllon*. Tato verze funkce při krosvalidaci nevyřazuje z datasetu jedince, ale celé populace. Populace *G. sudeticum* (z Krkonoš i Slavkovského lesa) jsem poté do této analýzy pasivně vložil a sledoval, do jaké skupiny budou, s ohledem na vytvořené klasifikační pravidlo, zařazení jednotliví jedinci.

3.5 Izolace DNA

Pro izolaci DNA byly použity lodyhy s listy vysušené silikagelem (kuličky pórovité formy SiO₂). DNA byla izolována pomocí kitu „Qiagen DNeasy 96 Plant kit“. Před extrakcí jsem rostlinný materiál na prach rozdrtil třepačkou TissueLyser (Qiagen), kdy jsem do každé zkumavky vložil jednu karbidowolframovou kuličku (více kuliček se ve zkumavce zasekávalo), a nechal v třepačce drtit rychlostí 27 Hz po dobu tří minut. Pokud nebyla pletiva dostatečně rozdrcena, postup drcení jsem zopakoval.

Od výrobcem dodávaného protokolu (Qiagen) jsem provedl několik modifikací. Vzhledem k nízké výtěžnosti DNA jsem do zkumavek nepřidal obvyklých 10 mg rostlinného materiálu, ale 40-50 mg. Ze stejného důvodu jsem DNA rozpustil jen v 50 µl elučního pufru (AU buffer), namísto obvyklých 100 µl. Prováděl jsem i druhé eluce jako zálohu. Celý protokol v příloze 8.1.1.

Po izolaci jsem koncentraci DNA v roztoku měřil přístrojem NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Vzorky jsem skladoval v mrazáku při -20 °C.

3.6 Sekvenování chloroplastové DNA

Vybral jsem celkem 3 úseky chloroplastové DNA: rpoB-trnC, trnC-psbM (Shaw et al. 2005) a trnL-ndhJ. Primer trnL varianta „c“ (Taberlet et al. 1991) a ndhJ (Shaw et al. 2007) podobně jako v Soza & Olmstead 2010a, ale bez vnitřních primerů. Sekvenoval jsem 4-5 jedinců na populaci se zaměřením na populace zahrnuté v AFLP analýzách. Seznam použitých populací je uveden v příloze 8.2.5.

Tabulka 6: Seznam použitých chloroplastových primerů.

Úsek cpDNA	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	
rpoB-trnC	rpoB CKA CAA AAY CCY TCR AAT TG	trnC C AC CCR GAT TYG AAC TGG GG	(Shaw et al. 2005)
trnC-psbM	trnC CCA GTT CRA ATC YGG GTG	psbM ATG GAA GTA AAT ATT CTY GCA TTT ATT GCT	(Shaw et al. 2005)
trnL-ndhJ	trnL CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	ndhJ ATG CCY GAA AGT TGG ATA GG	(Taberlet et al. 1991, Soza & Olmstead 2010a)

3.6.1 PCR (*polymerase chain reaction*)

Pro namnožení potřebných úseků pomocí PCR jsem pracoval s izolovanou DNA naředěnou sterilní MiliQ vodou na koncentraci 10 ng/µl. Jako polymerázu jsem použil produkt *Immolase* od společnosti *Bioline* s dodaným pufrem. Složení PCR směsi v tab 7.

Tabulka 7: PCR směs pro jeden vzorek

PCR směs	μl
sterilní Milli-Q voda	15,10
IMMO buffer 10x	2,00
Mg (50mM)	1,00
dNTP (10mM)	0,40
<i>forward</i> primer (25 pmol/μl)	0,20
<i>reverse</i> primer (25 pmol/μl)	0,20
Immolase polymeráza (0,2 μl/1U)	0,10
Izolovaná DNA (10 ng/μl)	1
Celkem	19,00

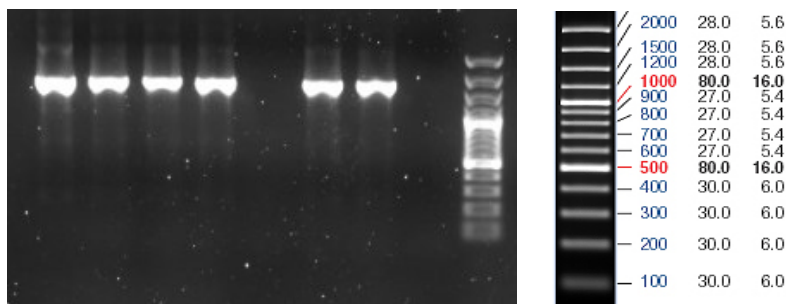
Vzorky jsem inkuboval v termocykleru (Eppendorf Mastercycler Pro). Pokud jsem nemohl PCR produkty ihned po skončení programu dát do lednice, nastavil jsem chlazení cycleru po skončení PCR (hold) na 10 °C, což je dostačující hodnota. Minimum přístroje 4 °C jsem nepoužíval, vzhledem k jeho neúměrnému opotřebení. Průběh PCR viz tab. 8.

Tabulka 8: Teplotní program PCR.

95°C	10:00		Prvotní denaturace
95°C	0:45	} 35x	Denaturace
57°C	1:00		Nasedání primerů (annealing)
72°C	2:00		Extenze úseků
72°C	10:00		Konečná extenze
10°C	∞		Hold

Výsledek PCR amplifikace jsem otestoval na 1% agarósovém gelu s etidium bromidem v 1×TAE pufru. Nanesl jsem 3 μl vzorku s 1 μl 6x loading dye „zelené barvení“, která se s DNA smíchá a zatíží ji, aby klesla na dno jamky v gelu. K elektroforéze jsem přidal 2 μl žebříčku O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Pro vyhodnocení gelu jsem použil dokumentační systém Gel Logic

100 s UV transluminátorem. V případě správné amplifikace byl detekován jeden výrazný proužek odpovídající délce studovaného úseku DNA. PCR produkt jsem skladoval v lednici a následující den přečistil.



Obrázek 7: Vizualizace PCR amplifikace DNA druhů rodu *Galium* pomocí elektroforézy na agarosovém gelu. Napětí 100 V. Zleva doprava 8 vzorků a žebříček O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Pátý a osmý vzorek nevyšel, proužek není přítomen. Délka produktu je zhruba 1600 bp (= páru bazí).

3.6.2 Přečištění

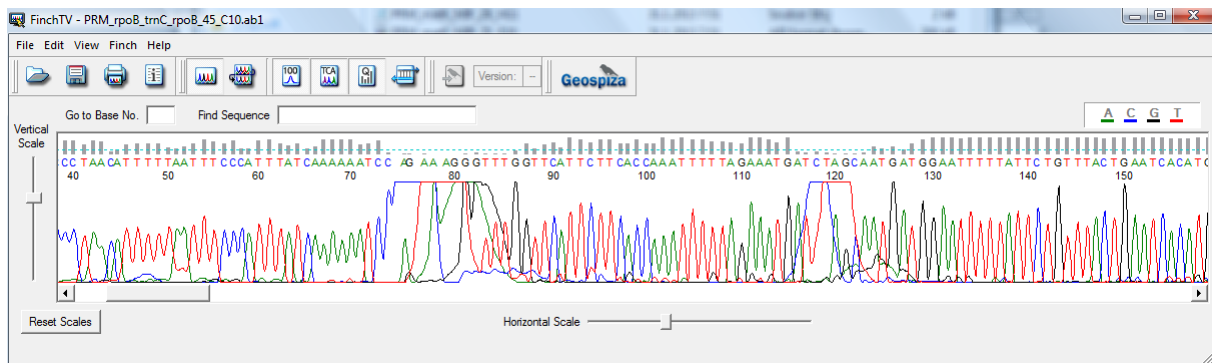
Produkty PCR je potřeba před sekvenční reakcí zbavit nežádoucích substancí (primery, nespotřebované dNTP, atp.). Jako nejspolehlivější a nejlevnější metoda se mi osvědčilo přesražení octanem (kompletní postup v příloze 8.1.3), která je efektivní i při slabém PCR produktu. Pokud jsem měl jen několik vzorků, použil jsem k přečištění kit od firmy GENE AID (celý protokol v příloze 8.1.2). Po přečištění jsem PCR produkty skladoval v lednici a nejdéle do týdne byly osekvenovány.

3.6.3. Sekvenování a sekvenční reakce

Modifikovaná PCR reakce s ddNTP, finální přesražení octanem sodným a sekvenování na šestnácti-kapilárním sekvenátoru 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) prováděla sekvenční laboratoř biologické sekce PŘF UK v Praze (<http://www.natur.cuni.cz/~seqlab>).

3.6.4 Analýza primárních sekvencí

Obdržené sekvence ve formátu *.ab1 jsem prohlížel v programu **FinchTV** (freeware, <http://www.geospiza.com/finchtv>) nebo v programu **Geneious** (placený software, 7.1.4, Biomatters). Nečitelné začátky čtení (asi 30 bp) jsem odstranil. Kolem hodnoty 80 a 120 bází se v několika případech vyskytovaly tzv. „bloby“, které pravděpodobně vznikly nedokonalým odpařením ethanolu při přečišťování DNA. Sekvence v tomto místě jsem nahradil symboly „N“. Délka čtení byla až 1000 bází, přičemž důvěryhodně čitelný byl chromatogram do délky 600 až 800 bází.



Obrázek 8: Ukázka zobrazení části sekvence G45I s primerem rpoB v programu FinchTV se zobrazením tzv. „blobů“, které vznikají nedokonalým odpařením ethanolu při předražování DNA.

Studované úseky cpDNA byly dlouhé 1200 bp (rpoB-trnC) nebo až 1600 bp (trnC-ndhJ, trnL-psbM). Používal jsem 2 primery (*forward a reverse*). Získal jsem tak dvě protiběžné sekvence, které se částečně překrývaly. Ty jsem spojil (vytvořil jsem *contig*) s využitím programu **SeqMan** (součást komerčního balíku DNASTAR Lasergene, <http://www.dnastar.com/>) popř. **Geneious** 7.1.4 (Biomatters Ltd.). Každý programem vytvořený *contig* jsem zkontroloval a manuálně opravil případné programem nejednoznačně nebo sporně určené báze. Sekvence jsem potom uložil v textovém formátu FASTA.

3.6.5 Alignment

Pro alignment sekvencí jsem využil algoritmus MAFFT 7 (Katoh & Standley 2013), se kterou jsem dosahoval nejlepších výsledků, a která je zdarma poskytována skrz webové rozhraní na <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>. Alignment ve formátu FASTA jsem zkontroloval správnost alignmentu v programu BioEdit nebo Geneious. Pro analýzy v programu TCS 1.21 (Clement et al. 2000) jsem zkrátil vícenukleotidové indely na délku jedné báze pro analýzy v programu. Při práci se sekvencemi a konverzi formátů jsem dále využil služeb balíčku **FaBox** dostupných na webových stránkách <http://www.birc.au.dk/~biopv/php/fabox/>.

3.6.6 Analýza plastidových sekvencí

Celkem jsem sekvenoval 3 úseky chloroplastové DNA rpoB-trnC, trnC-psbM a trnL-ndhJ. Úsek rpoB-trnC nebyl dostatečně variabilní a byl problematický z hlediska dlouhého polyA úseku. Proto jsem jej po fázi pilotního testování vyřadil a nezahrnul do celkových analýz.

Další dva úseky trnC-psbM a trnL-ndhJ byly osekvenovány u celkem 87 jedinců se zahrnutím druhů *G. sudeticum* (4x, Krkonoše, Slavkovský les), *G. valdepiosum* (2x, 4x), *G. austriacum* (2x, 4x), *G. anisophyllon* (2x, 4x), *G. cracoviense* (2x). Pro širší kontext jsem zahrnul i druhy *G. oelandicum*,

G. sternerii (2x, 4x), *G. suecicum* (2x), *G. normanii* (4x), *G. fleurotii* (4x, 8x) a po jednom jedinci *G. baldense* (2x) a *G. megalospermum* (2x).

Dále jsem pracoval pouze s úsekem trnC-psbM, ve kterém jsem analyzoval celkem 299 jedinců včetně rostlin ze severní Evropy zahrnutých pro širší kontext. Celkem: *G. megalospermum* 1 jedinec; *G. anisophyllon* 56 j. ze 14 populací; *G. austriacum* 27 j. z 8 pop.; *G. baldense* 1 j.; *G. cracoviense* 8 j. ze 2 pop.; *G. fleuroti* 3 j. ze 2 pop.; *G. normanii* 19 j. z 8 pop.; *G. oleandicum* 7 j. ze 3 pop.; *G. sternerii* 44 j. z 18 pop.; *G. suecicum* 16 j. ze 4 pop.; *G. valdepilosum* 98 j. z 29 pop.; *G. sudeticum* 16 j. ze 4 pop. v Krkonoších a 19 j. ze 4 pop. ve Slavkovském lese ve Východních Čechách. Jako outgroup *G. saxatile* 3 j. ze 3 populací.

Pro analýzu a rozlišení jednotlivých haplotypů jsem využil bayesovské analýzy v programu MrBayes 3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) . Podle výsledků ModelTestu s použitím „bayesian information criterion“ (BIC; Darriba et al. 2012) jsem vybral model GTR + G (nst=6, rate=gamma) Variabilita substitucí vzhledem k jejich pozici byla ošetřena gama distribucí. Počet kroků (mcmc) byl jeden milion se zápisem výsledku každých 1000 generací, prvních 25 % stromů bylo zahozeno.

Pro vytvoření haplotypové sítě jsem využil statistické parsimonie v programu TCS (Clement et al. 2000). Tuto analýzu jsem provedl ve dvou verzích, se zahrnutím indelů (zkrácené na délku 1 bp a kódované jako pátý stav) a bez indelů. Délkové polymorfismy úseků shodných nukleotidů jsem z analýzy vyřadil.

Vizualizace stromů proběhla pomocí programu FigTree 1.3.1 (freeware, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Haplotypová síť z programu TCS 1.21 byla upravena v grafickém programu Inkscape 0.48.4 (freeware, <http://www.inkscape.org/cs/>). Mapy byly vytvořeny v programu ArcMap 10 (ESRI, <http://www.esri.com/software/arcgis/arcgis10>).

3.7 Amplified fragment Length Polymorphism (AFLP)

Celkem jsem do AFLP analýz použil 303 jedinců tetraploidního cytotypu ze 46 populací s druhy *G. anisophyllum*, *G. austriacum*, *G. valdepiosum* a *G. sudeticum* z Krkonoš a Slavkovského lesa. Kompletní výčet použitých populací v příloze 8.2.5.

3.7.1 AFLP reakce

Analýzu AFLP (Vos et al. 1995) jsem provedl pomocí komerčního kitu „AFLP Core Reagent Kit I“ (Invitrogen) a „Pre-Amp Primer Mix I“ (Invitrogen). Pracoval jsem na ledu. Od běžného postupu, doporučeného výrobcem, jsem provedl řadu modifikací. Použité chemikálie jsem užil v pětinovém množství. Koncentraci DNA jsem měřil přístrojem NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). DNA v restrikční směsi jsem nechal štípat 12 hodin při 37 °C a na závěr 15 minut při 75 °C.

Tabulka 9: Restrikční směs pro jeden vzorek.

5x Reation buffer	1,0 µl
EcoRI/MseI	0,4 µl
Sterilní H ₂ O	1,1 µl
DNA (konc. 15 ng/ µl)	2,5 µl
Celkem	5 µl

Dále jsem do vzorku k již nastříhané DNA přidal 5 µl ligační směsi s T4 DNA ligázou (celkem 10,1 µl) a nechal opět inkubovat 12 hodin při 37 °C.

Tabulka 10: Ligační směs (Invitrogen) pro jeden vzorek.

Adapter/Ligation solution	4,8 µl
T4 DNA Ligase	0,2 µl
Celkem	5 µl

V dalším kroku jsem k preamplifikační směsi přidal 0,5 µl vzorku s nastříhanou DNA z předchozího kroku a vložil do cycleru dle programu v tabulce 11.

Tabulka 11: Preamplifikační směs pro jeden vzorek.

Pre-Amp primer mix (Invitrogen)	4 μ l
10x Buffer for RedTaq (Sigma)	0,5 μ l
Jumpstart RedTaq Polymerase (Sigma)	0,1 μ l
+ nastříhaná DNA z předchozího kroku	0,5 μ l
Celkem	5,1 μ l

Tabulka 12: PCR preamplifikační cyklus.

72°C	2:00		Prvotní denaturace
94°C	0:30	} 35x	Denaturace
56°C	0:30		Nasedání primerů (annealing)
72°C	2:00		Extenze úseků
60°C	30:00		Konečná extenze
10°C	∞		Hold

Po preamplifikační PCR jsem si připravil směs pro další selektivní PCR (složení tab. 13), ke kterým jsem přidal 2,5 μ l 10x naředěného produktu z předchozího kroku a vložil do cycleru. Jako selektivní primery jsem zvolil kombinaci čtyř párů primerů, viz tabulka 14. Čili na každý vzorek jsem provedl další čtyři PCR reakce pro každý pár primerů. Celkem jsem vyzkoušel 25 párů primerů. Primer EcoRI byl fluorescečně označen.

Tabulka 13: Složení selektivní PCR směsi pro jeden vzorek.

Sterilní H ₂ O	5,1 μ l
10x Buffer	1,0 μ l
dNTP	0,2 μ l
EcoRI primer (1 pmol/ μ l)	0,5 μ l
MseI primer (5 pmol/ μ l)	0,5 μ l
(JumpStart) RedTaq DNA Polymerase (1U/ μ l)	0,2 μ l
+ 10x naředěný produkt z předchozího kroku	2,5 μ l
Celkem	10 μ l

Tabulka 14: Použité kombinace primerů.

Primer I	Primer II
EcoRI-ACA(6-FAM)	MseI-CAA
EcoRI-ACT(VIC)	MseI-CAG
EcoRI-ACC(NED)	MseI-CTG
EcoRI-ACT(PET)	MseI-CTT

Všechny PCR reakce proběhly v cycleru “Mastercycler ep gradient S thermal cycler“ (Eppendorf). Správné proběhnutí selektivní PCR jsem ověřil nanesením 1 µl vzorku smíchané s 2 µl 6×loading dye na 1,8 % agarózový gel v 1x TBE pufru. Jako žebříček jsem použil 2 µl O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Pro vyhodnocení gelu jsem použil dokumentační systém Gel Logic 100 s UV transluminátorem.

Tabulka 15: PCR selektivní cyklus

94°C	2:00		Prvotní denaturace
65°C	0:30		Nasedání primerů (annealing)
72°C	2:00		Extenze úseků
94°C	0:30	} 8x	Denaturace
64°C	0:30		Annealing (V každém dalším cyklu -1 °C)
72°C	2:00		
94°C	0:30	} 23x	Denaturace
56°C	0:30		Annealing
72°C	2:00		Extenze úseků
60°C	30:00		Konečná extenze
10°C	∞		Hold

3.7.2 Přečištění a příprava na sekvenátor AFLP

Produkty selektivní PCR (celkem 4 na jednoho jedince) jsem smíchal dohromady. Z celkového produktu jsem odebral 4 µl, které jsem přesrážel octanem sodným. Protokol viz příloha 8.1.3. Vzorky byly analyzovány na šestnácti-kapilárním sekvenátoru 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) v sekvenační laboratoři biologické sekce PŘF UK v Praze (<http://www.natur.cuni.cz/~seqlab>).

3.7.3 Skórování AFLP dat

Primární data (elektroferogramy) byla analyzována programem GeneMarker 1.8 (Softgenetics LLC, State College, PA, USA). Skórovány byly pouze jednoznačné rozlišitelné fragmenty a to bez ohledu na jejich intenzitu (Tribusch et al. 2002) v rozmezí 100-500 bp, skórování jsem manuálně zkontroloval.

K zajištění reproducibility získaných dat jsem z celkového datasetu 10 % vzorků znovu analyzoval v celé proceduře (celá AFLP procedura, včetně izolace DNA a skórování). Po vyloučení nereproducibilních fragmentů dosahovala error rate celkového datasetu 5,4 %.

Výsledná 01 matice zahrnující 164 reproducibilních fragmentů a 303 jedinců jsem použil v dalších analýzách.

3.7.4 Analýza dat

Pro základní analýzy (počet variabilních proužků, počet proužků unikátní pro dané druhy) a práci s maticí jsem využil program FAMD 1.31 (Schlueter & Harris 2006). V programovém R balíku AFLPdat (Ehrich 2006) jsem provedl výpočty populační genetické diverzity (Nei's diversity index; Nei 1987) a proporce vzácných frgmentů, tj. rarity (DW index; Schönswetter & Tribusch 2005). Při stanovování genetické diverzity i rarity jsem vyřadil populace s počtem jedinců menším jak tři.

Pro zjištění proporcí vnitropopulační, mezipopulační a mezidruhové genetické variability v datasetu jsem provedl sadu analýz molekulární variance AMOVA ve standardním nastavení (1000 permutací) v programu Arlequin (Excoffier et al. 2005). Druhy/skupiny jsem stanovil na základě geografie: *G. anisophyllon*, *G. austriacum*, *G. valdepilosum*, *G. sudeticum* z Krkonoš. V celkové AMOVě jsem *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa zařadil do *G. valdepilosum*, ale v dílčích analýzách pro srovnání meziskupinové variability jsem *G. „sudeticum“* řadil jako samostatnou skupinu. *G. austriacum* jsem zahrnul jen do celodatasetové analýzy.

Pro zobrazení genetických distancí jednotlivých jedinců v mnohorozměrném prostoru jsem použil analýzu hlavních koordinát (PCoA) s Jaccardovým koeficientem (nebere v potaz negativní shodu), kterou jsem provedl v programu PAST 2.17 (Hammer et al. 2001).

K odhalení genetické struktury v datech včetně případných hybridizací jsem použil klastrovací program Structure 2.3.4. (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2007). Počáteční burn-in periodu jsem nastavil na 100 000, následující 1 milionem kroků MCMC (markov chain monte carlo). Počet skupin K jsem nastavil na 1-10, admixture model s korelovanými frekvencemi alel. Pro dominantní data byl využit „recessive allele model“, v němž byla alela „0“ kódována jako recesivní (Falush et al. 2007). K vyhodnocení optimálního počtu skupin (K) z výstupů programu Structure jsem použil skript

Structure-sum-2009 (Ehrich 2006). Jelikož rozdíly v ΔK (stanovené podle Evanno et al. (2005) nebyly vysoké, vybíral jsem K s relativně nejvyšším koeficientem podobnosti mezi jednotlivými opakováními pro dané K (similarity coefficient).

Provedl jsem celkem pět klastrovacích analýz vždy s $K=1-10$. Na základě výsledků první celkové analýzy jsem provedl další dvě analýzy tentokrát se zahrnutím pouze největších vylišených skupin (*G. valdepilosum*, *G. anisophyllon*). Ve snaze odhalit vztahy populací *G. sudeticum* ke zbytku datasetu, jsem stejným způsobem provedl další separátní analýzy na základních skupinách odhalených v celkové analýze (*G. valdepilosum*, *G. anisophyllon*), se zahrnutím a bez zahrnutí druhu *G. sudeticum* z Krkonoš.

Vizualizaci výsledků jsem vytvořil pomocí programu CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg 2007) a Distruct (Rosenberg 2004).

4. Výsledky

4.1 Rozšíření druhu *G. sudeticum*

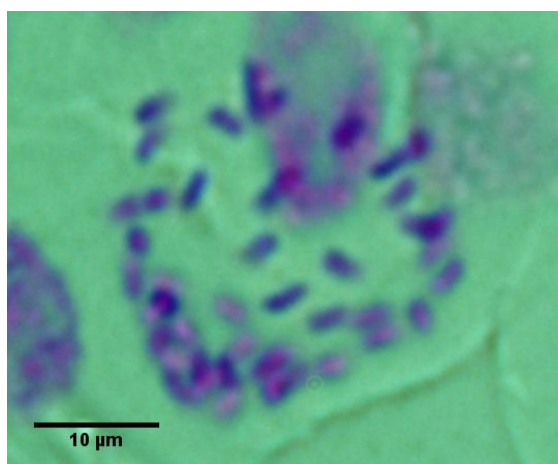
V průběhu diplomové práce jsem výskyt *G. sudeticum* v Krkonoších ověřil na všech jeho doposud známých lokalitách (podrobnosti k lokalitám v příloze 8.2.5.). V ČR to je v lavinovém svahu Čertova zahrádka (Obří důl), v tomtéž údolí na protějším svahu u štoly Rudník, dále na skalnatém hřebínku (SV orientované skály) mezi kary Malá a Velká kotelní jáma na JZ úbočí vrchu Kotel a na dně těchto karů. Na polské straně se nachází v karech Malá sněžná jáma (Mały Śnieżny Kocioł) a Velká sněžná jáma (Wielki Śnieżny Kocioł, rostliny od P. Kwiatkowského). Nově jsem rostliny našel také nad těmito kary (hrany skal pod vysílačem na Vysokém kole). Kromě populace z lokality Rudník, která zarůstá stromy, byly všechny populace životaschopné, bohatě kvetly a plodily.

Od poloviny 20. Století (Ehrendorfer 1956) se *G. sudeticum* udává i ze Slavkovského lesa, konkrétně z lokality Vlček a Planý vrch, kde jsem tyto lokality ověřil. Rostliny se v hadcových borech omezují na volnější vegetaci v blízkosti skal a v opuštěných hadcových lůmcích.

Na historické lokalitě Velká Kotlina v Jeseníkách, odkud je *G. sudeticum* dokládáno herbářovou položkou (LAUS 1933, uloženo v OLM), jsem jeho výskyt nepotvrdil. Konkrétně jsem navštívil jedenkrát malou kotlinu, kde jsem našel pouze oktoploidní cytotyp *G. pumilum* a třikrát jsem se vydal do Velké Kotliny. Našel jsem však rostliny vzhledově podobné *G. pumilum*, avšak s papilnatými plody podobnými spíše *G. valdepilosum* nebo *G. sudeticum*. Ty byly jednak přímo v SV části Velké Kotliny (1344 m n.m.), dále také na hřebtu u cesty mezi Vysokým májem a Kamzičnickem a jeden exemplář jsem našel také na hřebtu (1392 m n.m.) mezi údolími Desné a Sviního potoka u kvarcitových sutí na hranici lesa. Všechny rostliny jsem našel mezi trsy smilky tuhé (*Nardus stricta*), asociace *Festuco supinae-Nardetum strictae*. Souřadnice v příloze 8.2.5. Více v následující kapitole.

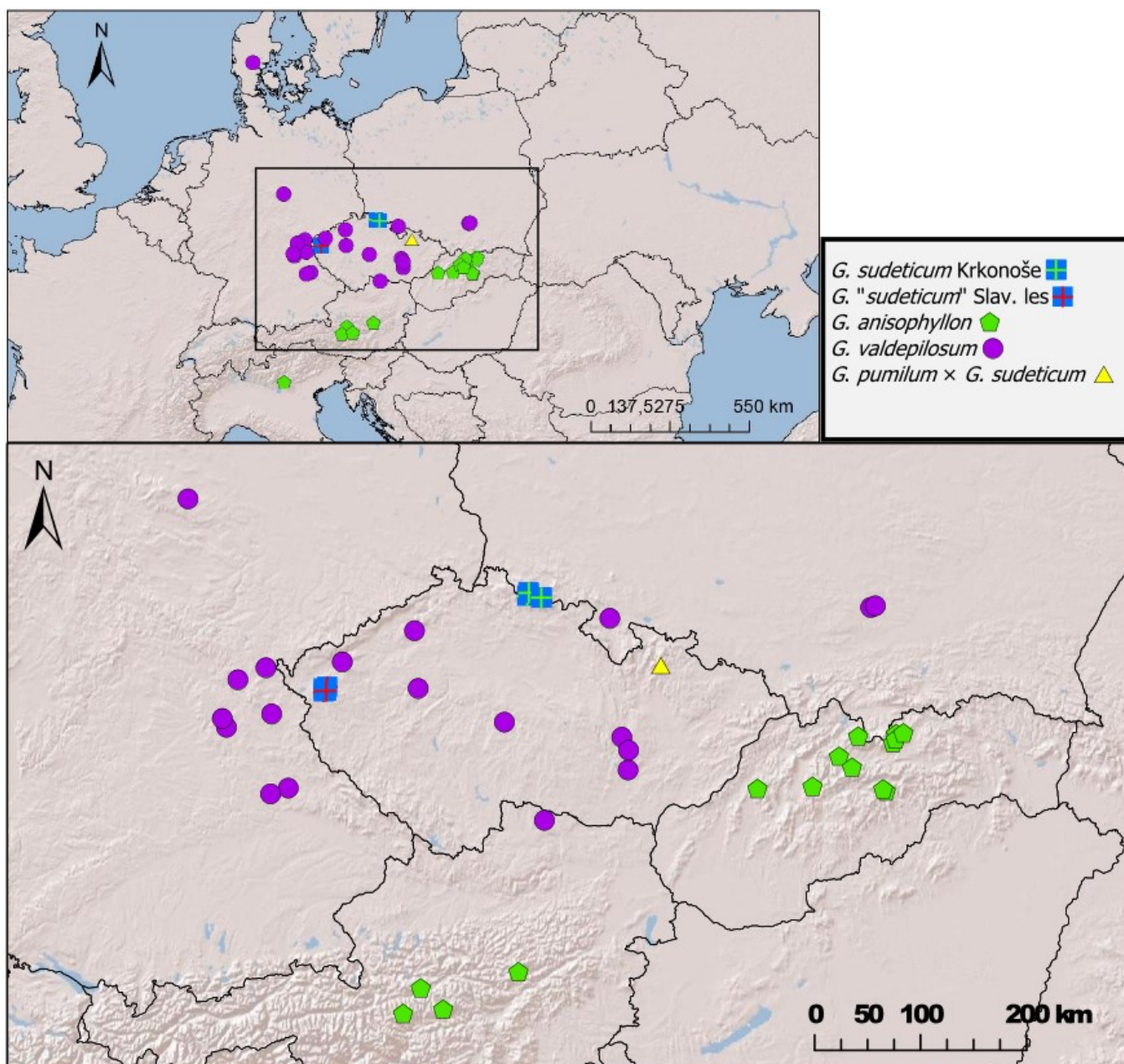
4.2 Relativní velikost genomu a chromozómové počty

Relativní velikost jaderného genomu jsem přesně stanovil u celkem 46 jedinců ze 46 populací. Všechny měřené populace byly dle cytometrických analýz tetraploidní s hodnotami relativního obsahu DNA od 0.498 do 0.538 (číslo udává poměr intenzity fluorescence vzorku k internímu standardu *Bellis perennis*). Výjimkou byla populace G294 z Jeseníků s relativním obsahem DNA 0,738, tzn. průměrně o 45 % větší než u ostatních tetraploidních vzorků. Tyto karyologické analýzy ukazují, že se nejedná o hexaploidní cytotyp, čemuž by přibližně odpovídala hodnota relativního obsahu DNA, ale spíše stále o cytotyp tetraploidní, jelikož všechny studované mitoticky se dělící buňky měly přibližně 40 chromozomů (obr. 9).

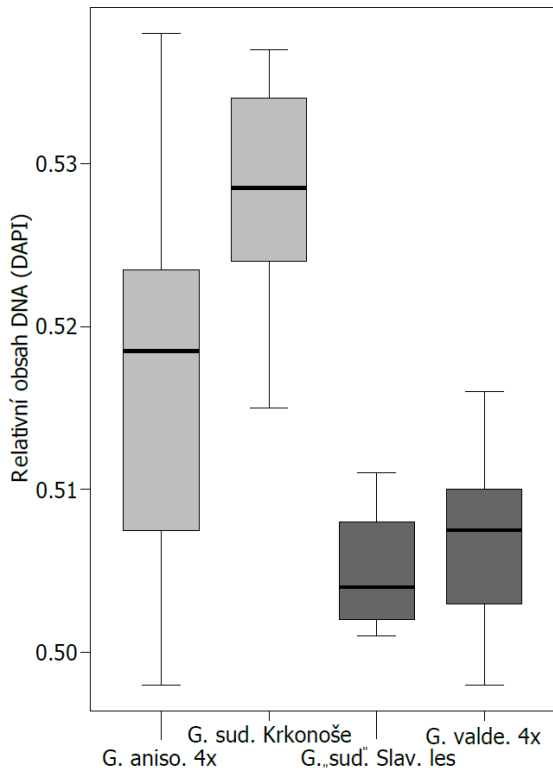


Obrázek 9: Buňka kořenné špičky z roztlačového preparátu s přibližně 40 chromozomy; populace G296 možného hybridu *G. pumilum* × *G. sudeticum* z Velké Kotliny; barvení schiffovým činidlem; zvětšeno 1000x.

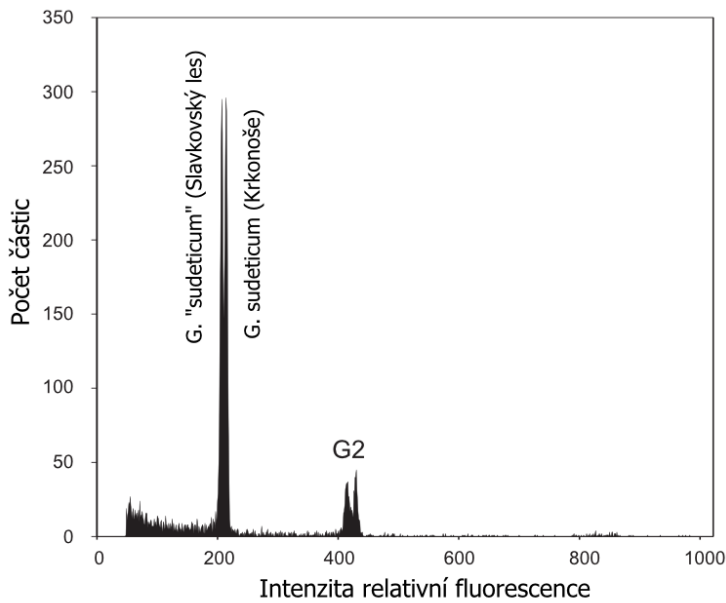
Populace *G. sudeticum* z Krkonoš se od rostlin rostoucích na hadcích ve Slavkovském lese významně liší (t-test, $p=0,0003$) ve velikosti genomu, v průměru o 3.8 %, viz obr 11 a 12. Velikostí genomu nejsou populace *G. „sudeticum“* z hadců ve Slavkovském lese odlišitelné od *G. valdepiosum*, zatímco populace z Krkonoš mají hodnoty vyšší. Rozpětí velikosti genomu u *G. anisophyllon* je největší a pokrývá celou variabilitu studovaného datasetu. Část těchto dat již byla publikována v (Kolář et al. 2014). Přehled všech hodnot 8.2.5.



Obrázek 10: Mapa lokalit použitých pro srovnání relativní velikosti genomu včetně lokality možného hybridu *G. pumilum* × *G. sudeticum* ve Velké kotlině.



Obrázek 11: Variabilita v relativní velikosti genomu u druhů *G. anisophyllum* (15 jedinců z 15 populací), *G. valdepiosum* (20 jedinců z 20 populací), *G. sudeticum* z Krkonoš (5 jedinců z 5 populací) a z hadců ze Slavkovského lesa (4 jedinci ze 4 populací). Krabice je rozpětí 1. A 3. kvartilu. Fousky vyznačují minimum a maximum. Osa y značí relativní velikost genomu v poměru k internímu standardu *Bellis perennis*.

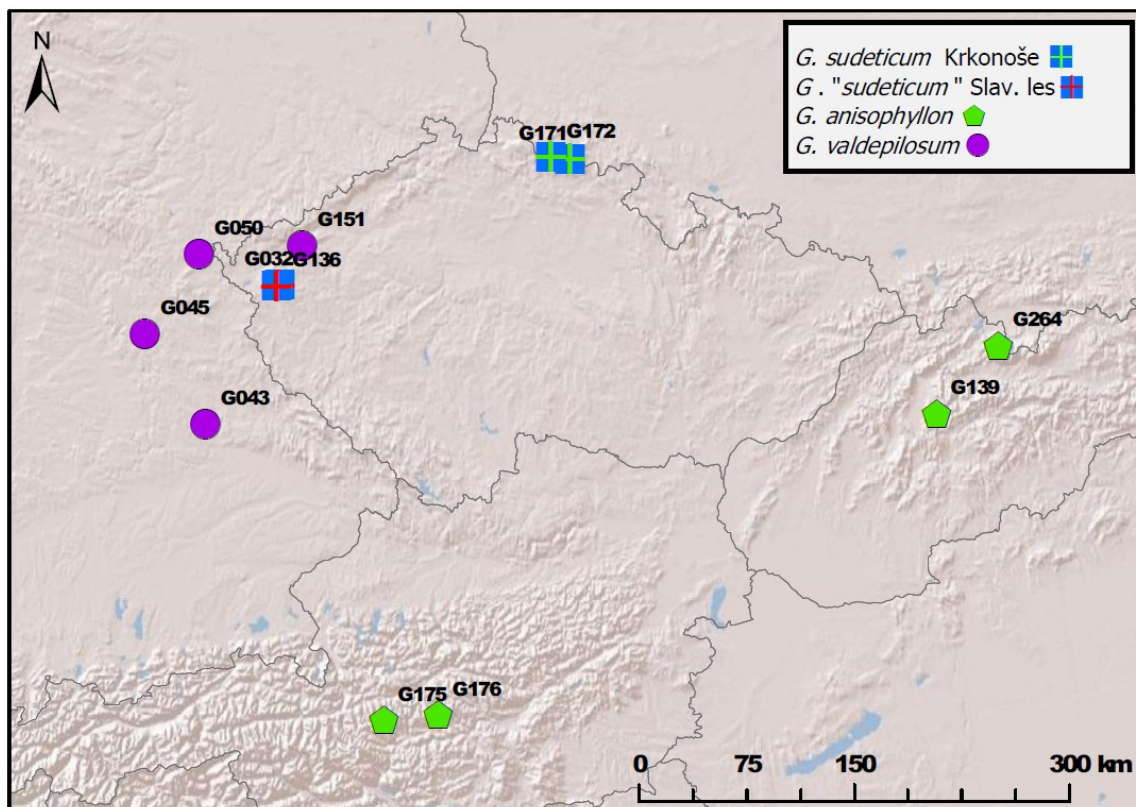


Obrázek 12: Histogram z průtokové cytometrie se simultánní analýzou jedince *G. sudeticum* z Krkonoš (populace G172) a *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa (populace G032). Rozdíl v relativní velikosti genomu je 3.8 %. Barvení DAPI (Kolář et al. 2014).

4.3 Morfologická diferenciacie

Do morfologické analýzy jsem zahrnul celkem 212 rostlin z 12 populací. Dvě populace *G. sudeticum* z Krkonoš, dvě populace *G. sudeticum* ze Slavkovského lesa, čtyři populace *G. anisophyllum* (2 z Rakouska, 2 ze Slovenska) a 4 populace *G. valdepiosum* (jedna z České republiky, tři z Německa). S těmito čtyřmi skupinami jsem pracoval ve statistických analýzách.

Původně jsem měl v plánu zahrnout také v zahradě pěstované rostliny ze stejných populací. Bohužel v roce 2014, kdy jsem pokus chtěl ukončit, většina rostlin nekvetla. To je důvod, proč při tomto morfologickém zpracování nemám zahrnuto více populací.



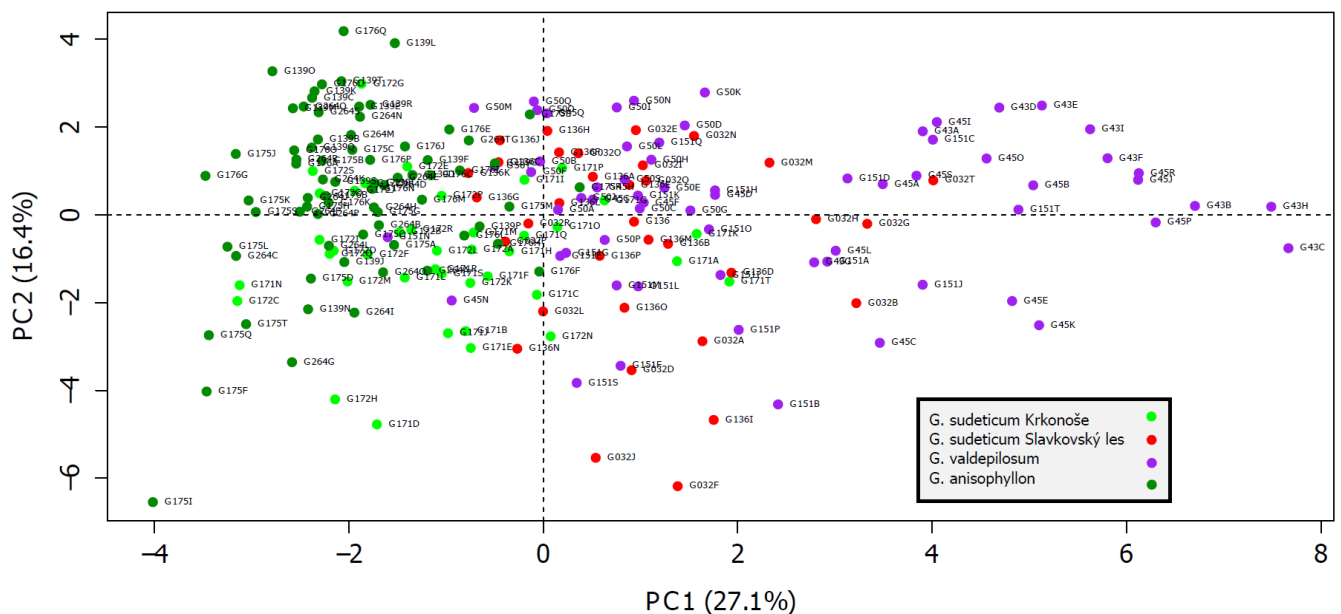
Obrázek 13: Poloha populací *Galium pusillum* agg použitých pro morfologické srovnání a jejich zařazení do čtyř skupin použitých v morfologických analýzách.

4.3.1 Úprava dat, popisné statistiky a PCA

Žádné znaky nebyly silně korelované ($<0,95$), nejvyšší korelační koeficient byl 0,82 (pearsonův korelační koeficient) a to mezi znakem pro délku listu ve střední a v horní části lodyhy. Celá tabulka s vyznačenými nejvyššími hodnotami je v příloze 8.2.1 a 8.2.2.

Dále jsem provedl základní deskriptivní statistiky (příloha 8.2.3) a zkontroloval normální rozdělení dat. Znaky 1, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 15 neměly normální rozdělení dat, proto jsem je pro diskriminační analýzy transformoval přirozeným logaritmem.

Pro zobrazení hlavních trendů v morfologické diferenciaci jsem provedl analýzu hlavních komponent (PCA) na všech 212 měřených jedincích. První tři osy vysvětlovaly 27.1 %, 16.4 % a 10.7 % celkové variability v datech. Podél první osy se oddělily především druhy *G. anisophyllum* a *G. valdepilosum*. *G. sudeticum* se blíží spíše skupině *G. anisophyllum* a *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa spíše *G. valdepilosum* (obr. 13).

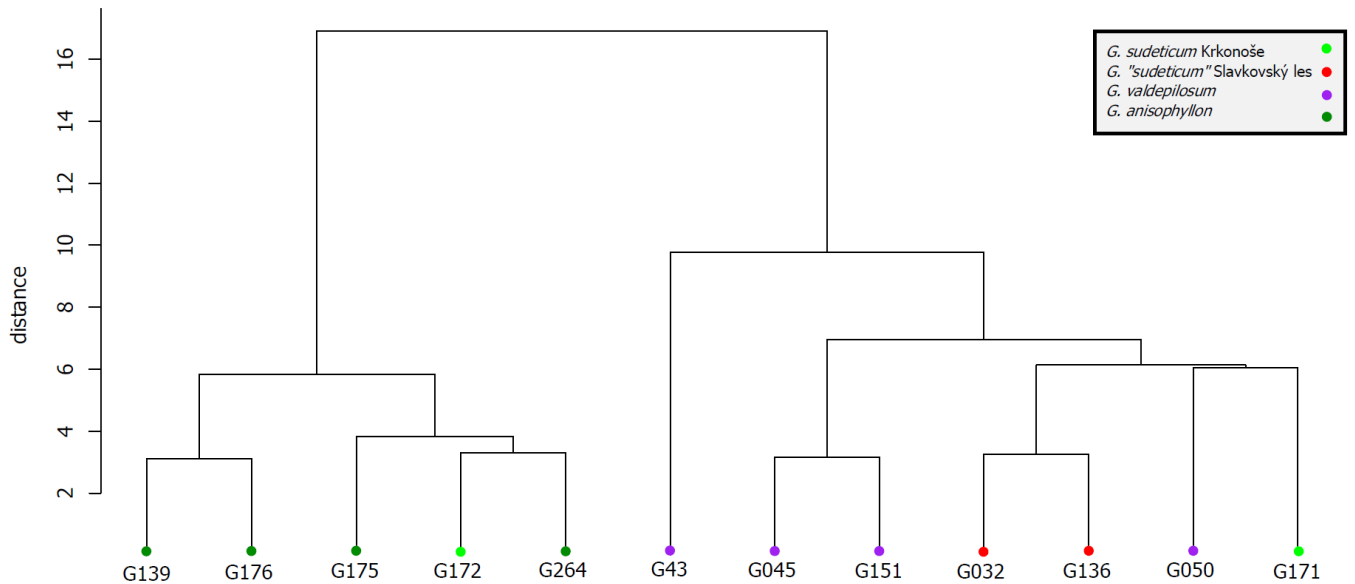


Obrázek 14: PCA analýza 21 morfologických znaků na 12 studovaných populacích z okruhu *Galium pusillum agg.* větší PCA s čitelnými popisky jedinců v příloze 8.2.4.

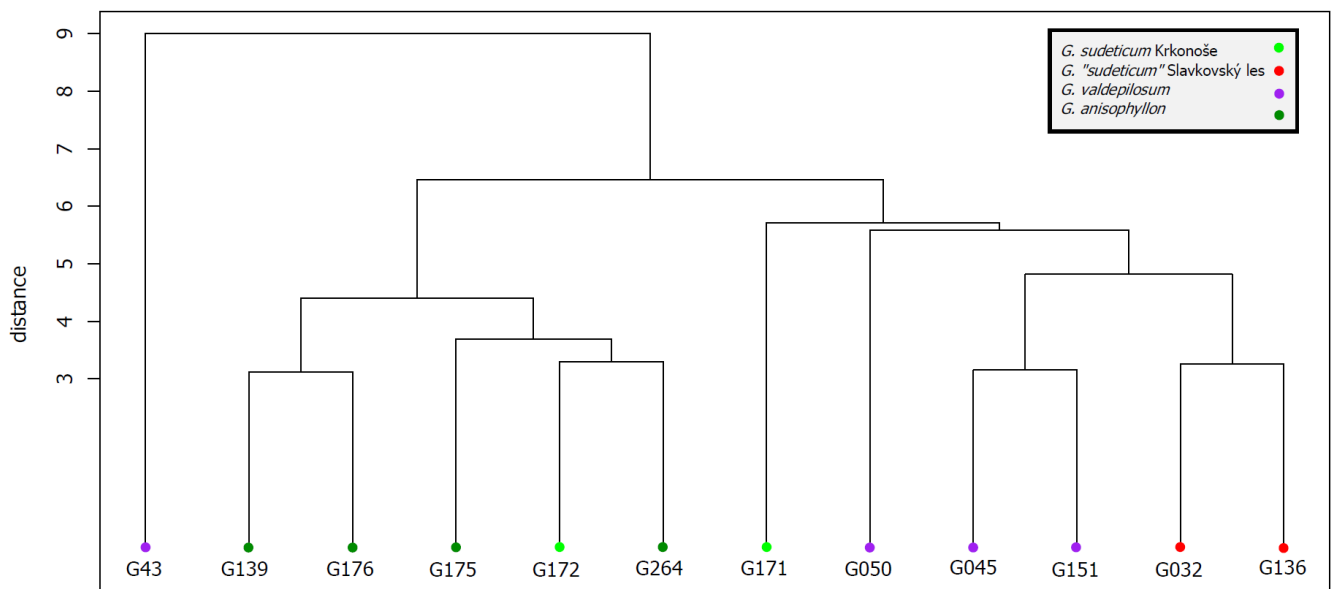
4.3.2 Shlukové analýzy

Morfologická podobnost populací jsem zobrazil pomocí dvou shlukovacích analýz UPGMA a UPGMC (Gowerova metoda) provedených na populačních průměrech. Obě metody podaly podobný výsledek (obr. 15 a 16). Tyto výsledky korespondují se skupinami vytvořenými v programu Structure na základě AFLP výsledků. Vytvořily se dva hlavní klastry s *G. anisophyllum* a *G. valdepilosum*,

populace G043 stojí samostatně. *G. sudeticum* ze Slavkovského lesa a jedna populace z Krkonoš připadla do klastru s *G. valdepiosum*, druhá populace z Krkonoš připadla do klastru s *G. anisophyllon*.



Obrázek 15: Morfologická podobnost studovaných populací *G. pusillum* agg. zobrazená pomocí UPGMC (Wardova metoda) na eukleidovských vzdálenostech mezi populačními průměry znaků.



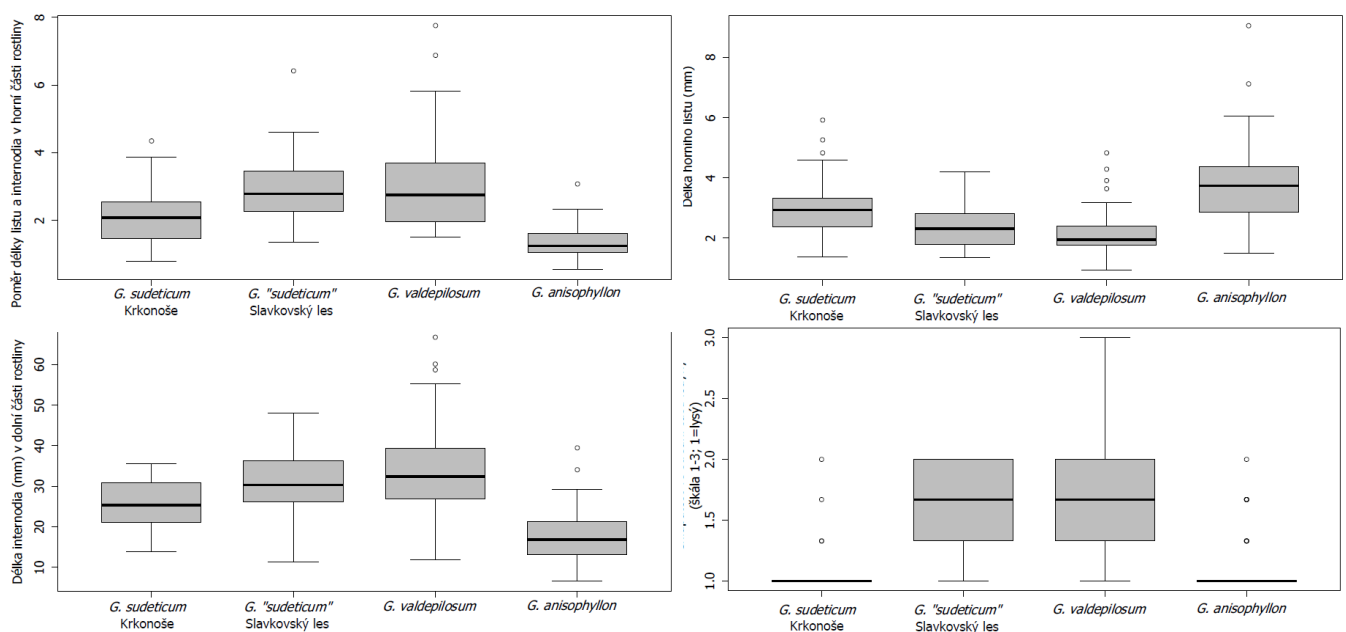
Obrázek 16: Morfologická podobnost studovaných populací *G. pusillum* agg. zobrazená pomocí UPGMA (metoda průměrné vzdálenosti) na eukleidovských vzdálenostech mezi populačními průměry znaků.

4.3.3 Diskriminační analýzy

Taxon *G. sudeticum* vykazuje přechodný charakter mezi *G. anisophyllon* a *G. valdepilosum*, a to jak v morfologických analýzách (obr. 14 PCA), tak i v molekulárních datech (viz kap. 4.5). Diskriminační funkce jsem proto vytvořil pro dataset oddělující v nižších polohách rostoucí druh *G. valdepilosum* a horský druh *G. anisophyllon*. Do výsledných diskriminačních analýz jsem potom studované populace *G. sudeticum* pasivně promítl.

V diskriminační funkci (osa vysvětluje 91,17 %) se zadané skupiny téměř nepřekrývají (obr. 18). Populace *G. sudeticum* ze Slavkovského lesa, se po promítnutí zařadila do skupiny *G. valdepilosum*. Populace z Krkonoš vykazují přechodný charakter mezi *G. anisophyllon* a *G. valdepilosum*, protože vykazují částečný, avšak neúplný, překryv s oběma skupinami (obr. 19, 20, 21).

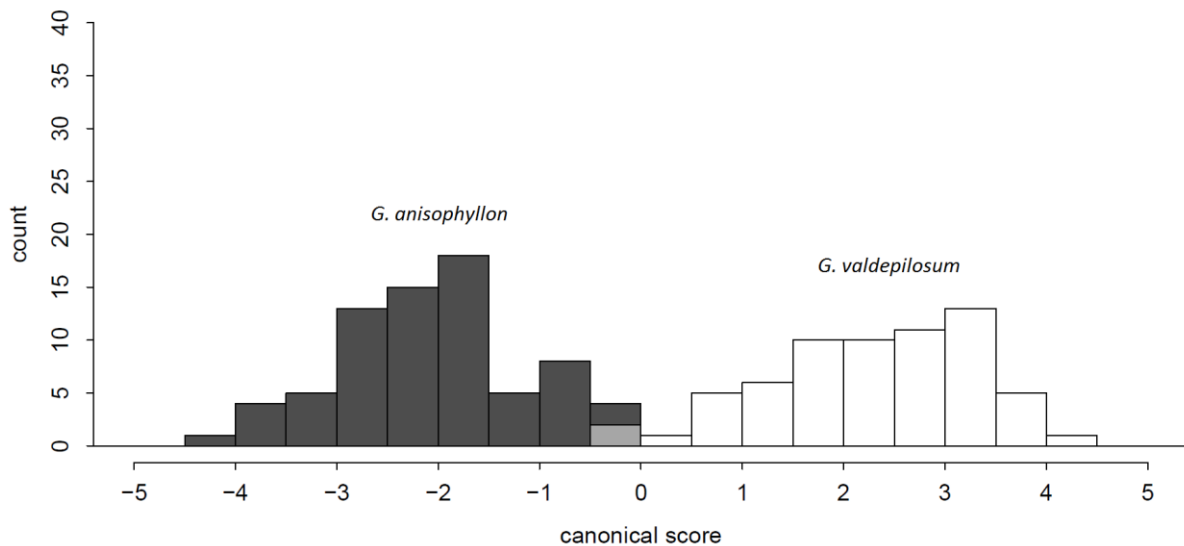
Při postupném výběru (forward selection) byly jako znaky přispívající nejvíce k odlišení skupin *G. valdepilosum* a *G. anisophyllon* vybrány poměr délky listu a internodia v horní části lodyhy, chlupatost listů ve střední části lodyhy, délky internodia a délky listu v horní části lodyhy (leaf_inter_up; hair_leaf_mid; inter_le ; up_leaf).



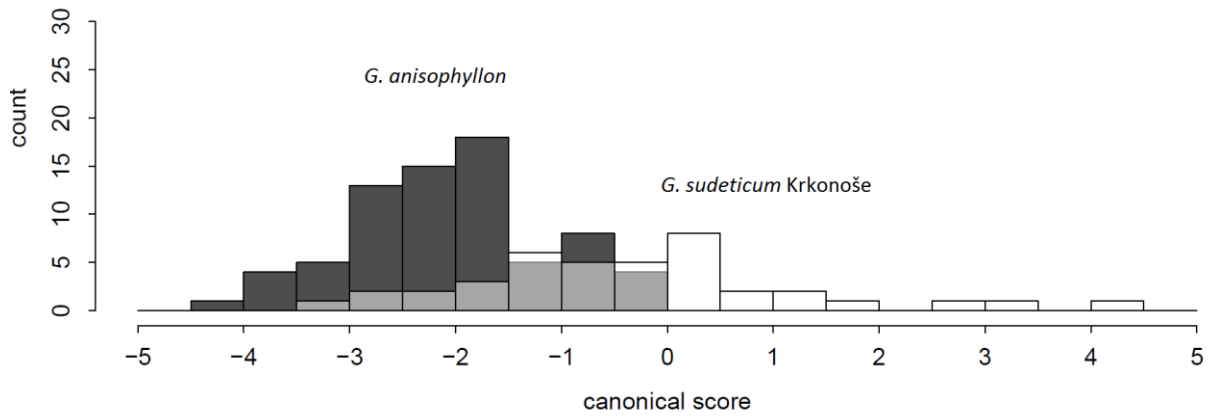
Obrázek 17: Rozptyl hodnot čtyři znaků vybrané při postupném výběru jako nejvhodnější k odlišení skupiny *G. valdepilosum* a *G. anisophyllon* vynesené u všech čtyř studovaných skupin populací z okruhu *G. pusillum* agg.

Tabulka 16: Příspěvky jednotlivých znaků v kanonické diskriminační funkci mezi skupinami *G. valdepilosum* a *G. anisophyllon*. Čtyři nejvyšší absolutní hodnoty jsou vyznačeny tučně.

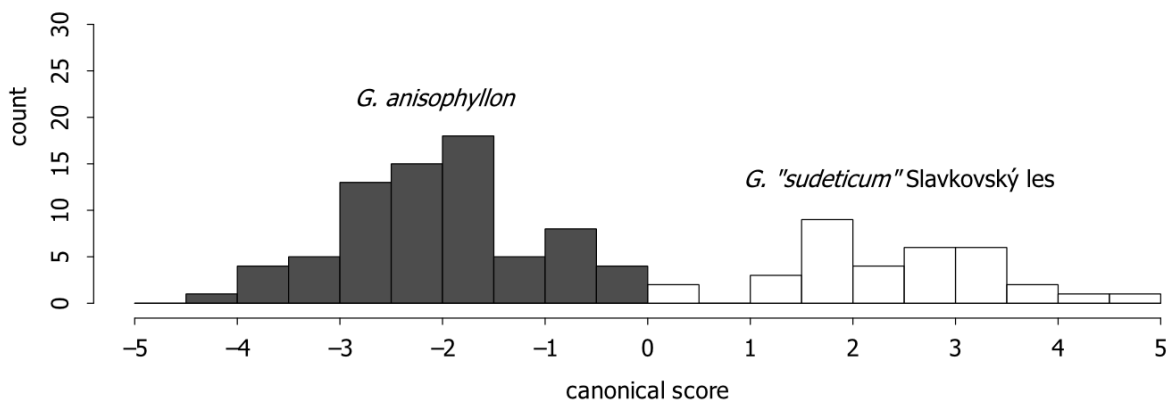
Znak	CCA1	Znak	CCA1
leaf_le	0.139048071	lg_wi	-0.04084928
leaf_wi	0.161239347	leaf_inter	0.380208452
inter_le	0.405791004	leaf_inter_mid	0.352769897
midle_leaf	-0.256585321	leaf_inter_up	0.493122491
midle_inter	0.070579744	hair_stem_down	0.265350703
up_leaf	-0.396515119	hair_leaf_down	0.468528727
up_inter	0.133120504	hair_stem_mid	0.252238159
stem	-0.096537032	hair_leaf_mid	0.404438595
nb_infl_branch	-0.029754361	hair_stem_up	0.091925351
bract_infl	0.037610604	hair_leaf_up	0.212715299
bract_part	0.064128626		



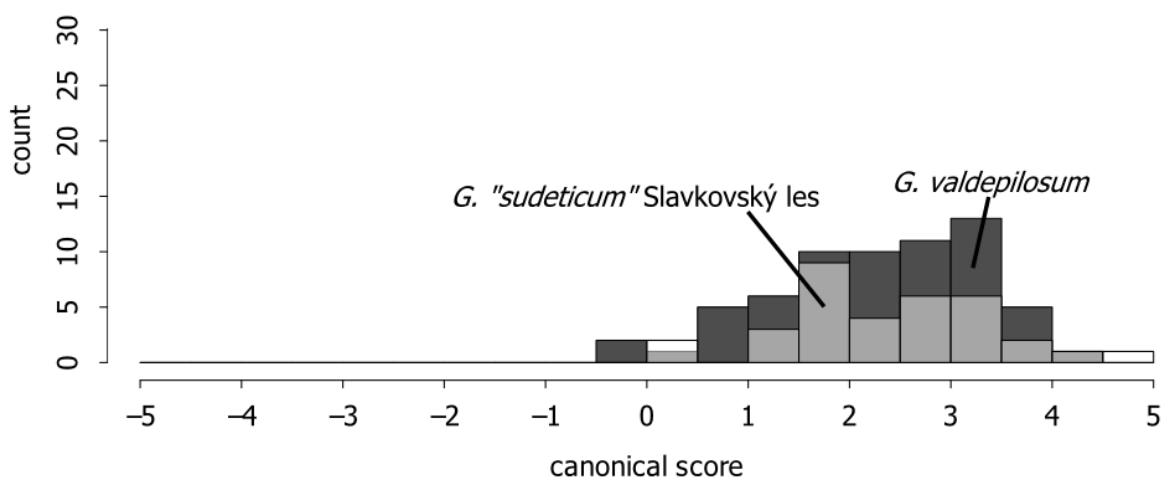
Obrázek 18: Kanonická diskriminační analýza všech 21 znaků mezi skupinami *G. anisophyllon* (populace G139, G175, G176, G264) a *G. valdepilosum* (populace G043, G045, G050, G151). Celkem 138 jedinců. Osa x vysvětluje 91,17 % variability.



Obrázek 19: Pasivní promítnutí *G. sudeticum* z Krkonoš (populace G171 a G172) ke skupině *G. anisophyllon* (populace G139, G175, G176, G264) do výsledku kanonické diskriminační analýzy odlišující *G. anisophyllon* a *G. valdepiosum*. Osa x vysvětluje 91,17 % variability.

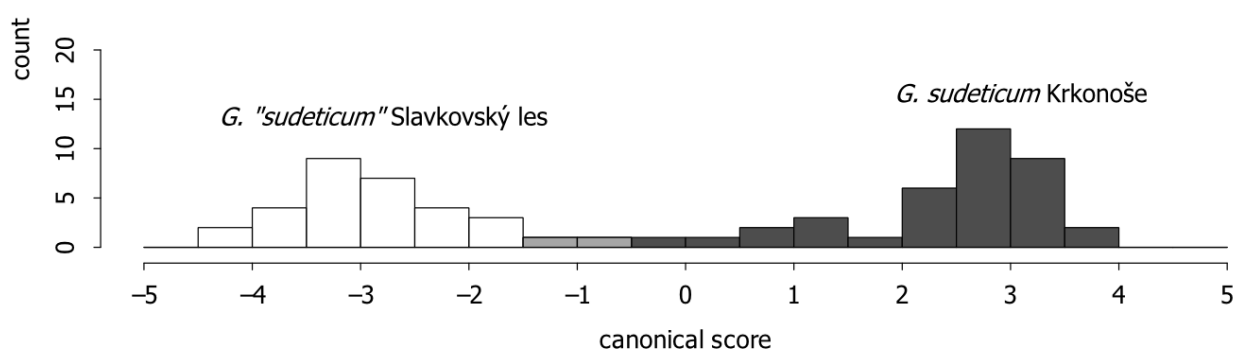


Obrázek 20: Pasivní promítnutí *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa (populace G032 a G136) ke skupině *G. anisophyllon* (populace G139, G175, G176, G264) do výsledku kanonické diskriminační analýzy odlišující *G. anisophyllon* a *G. valdepiosum*. Osa x vysvětluje 91,17 % variability.



Obrázek 21: Pasivní promítnutí *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa (populace G032 a G136) ke skupině *G. valdepiosum* (populace G043, G045, G050, G151) do výsledku kanonické diskriminační analýzy odlišující *G. anisophyllon* a *G. valdepiosum*. Osa x vysvětluje 91,17 % variability.

Pro nalezení znaků odlišujících *G. sudeticum* z Krkonoš a *G. „sudeticum“* Slavkovského lesa jsem provedl ještě jednu diskriminační analýzu na datech pouze z těchto 4 populací. Znaky pro chlupatost lodyhy jsem vyřadil, protože se v nich pro zadané populace nevyskytovala žádná variabilita. Zadané skupiny se podařilo oddělit (obr. 22), avšak nejvyššího příspěvku dosáhly znaky pro chlupatost listu v dolní a střední části lodyhy (hair_leaf_down, hair_leaf_mid) a až pak s násobně menším příspěvkem znak pro poměr délky listu a internodia a počet plodných stopek (leaf_inter, bract_part). Přehled v tabulce 17.



Obrázek 22: Kanonická diskriminační analýza 18 znaků (znaky pro chlupatost lodyhy nebyly zahrnuty) mezi skupinami *G. sudeticum* (populace G171, G172) a *G. valdepilosum* (populace G032, G136). Celkem 138 jedinců. Osa x vysvětluje 91,95 % variability.

Tabulka 17: Příspěvky jednotlivých znaků v kanonické diskriminační funkci mezi skupinami *G. sudeticum* z Krkonoš a *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa. Čtyři nejvyšší absolutní hodnoty jsou vyznačeny tučně.

Znak	CCA1	Znak	CCA1
leaf_le	0.073208042	bract_infl	0.162459
leaf_wi	0.096160542	bract_part	0.176768
inter_le	-0.150369104	leaf_lg_wi	-0.05392
midle_leaf	0.082546904	leaf_inter	-0.21299
midle_inter	-0.032186475	leaf_inter_mid	-0.11385
up_leaf	0.162862879	leaf_inter_up	-0.17056
up_inter	-0.031818353	hair_leaf_down	-0.71241
stem	0.049100537	hair_leaf_mid	-0.42847
log_nb_infl_branch	0.247853414	hair_leaf_up	-0.14874

Klasifikační diskriminační analýzu jsem provedl s obdobným rozdělením (pasivní promítnutí *G. sudeticum*) do skupin jako pro kanonickou diskriminační funkci. Při klasifikační funkci mezi *G. valdepilosum* a *G. anisophyllon* byla úspěšnost určení 89.2 % a 95.9 %. Nejproblematictější byla populace G050 (Woja) se správností určení 79 %. Výsledky funkce pro jednotlivé populace jsou uvedeny v tabulce 18. Při pasivním promítnutí *G. sudeticum* (tab. 19) byly populace G032 a G136

(Slavkovský les: Planý vrch, Vlček) určeny jednoznačně jako *G. valdepilosum*, populace z Krkonoš G172 (Kotelní jámy) v 90 % případů spadla do skupiny *G. anisophyllon*. Nejproblematictější byla populace G171 (Čertova zahrádka), která spadla z poloviny do obou skupin.

Tabulka 18: Procentuální úspěšnost správného zařazení při klasifikační diskriminační analýze uvedená pro jednotlivé populace.

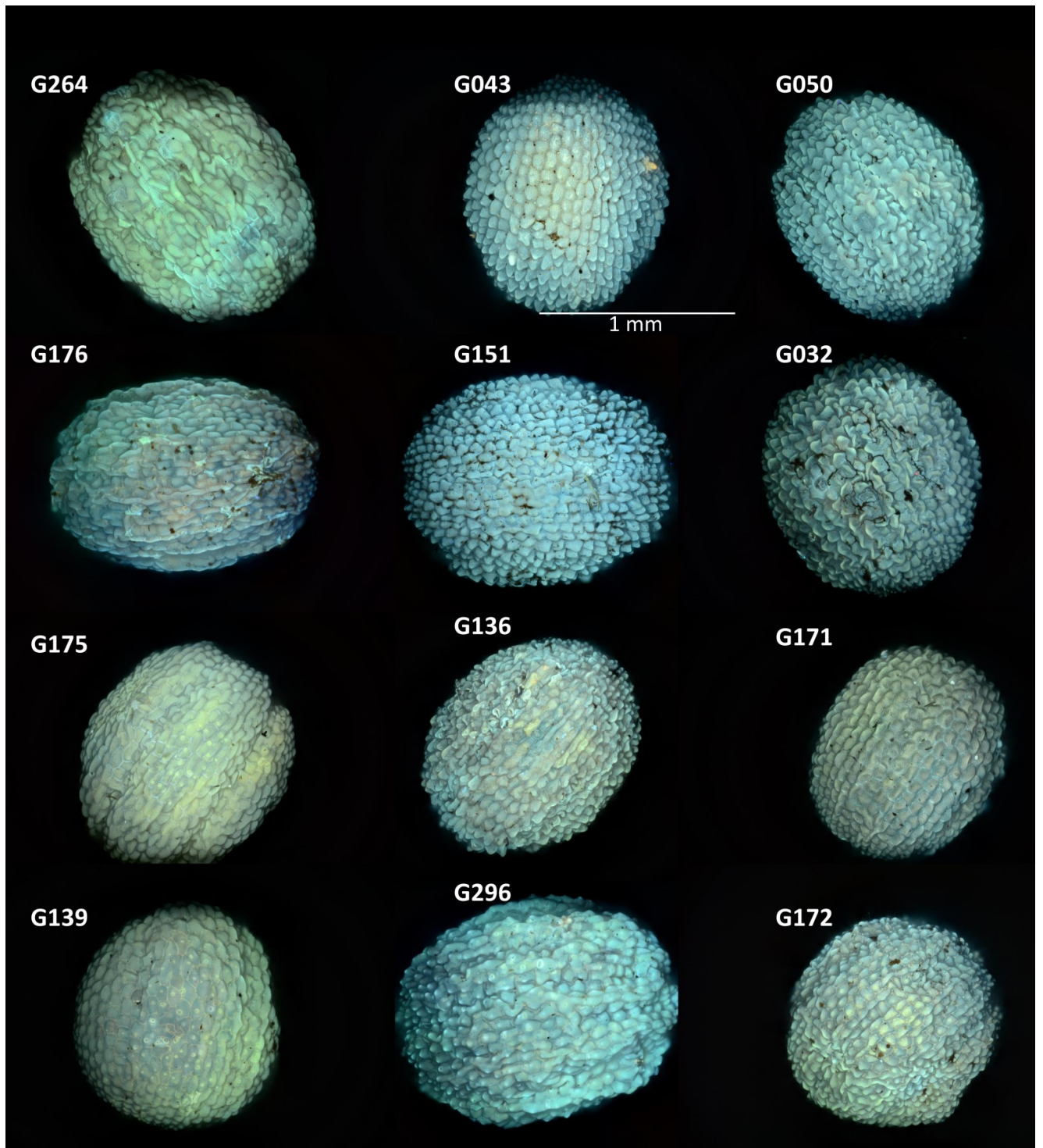
Populace	Druh	Určeno jako		N	Úspěšnost určení
		<i>G. valdepilosum</i>	<i>G. anisophyllon</i>		
G043	<i>G. valdepilosum</i>	9	0	9	100 %
G045		17	1	18	94.45 %
G050		15	4	19	78.95 %
G151		17	2	19	89.47 %
G139	<i>G. anisophyllon</i>	0	18	18	100 %
G175		0	18	18	100 %
G176		2	15	17	88.24 %
G264		1	19	20	95 %

Tabulka 19: Výsledky klasifikační funkce mezi *G. valdepilosum* a *G. anisophyllon* při pasivním promítnutí populací *G. sudeticum*.

Populace	Druh	Určeno jako		N
		<i>G. valdepilosum</i>	<i>G. anisophyllon</i>	
G171	<i>G. sudeticum</i>	55 %	45 %	20
G172	Krkonoše	10 %	90 %	20
G032	<i>G. „sudeticum“</i>	100 %	0 %	17
G136	Slavkovský les	100 %	0 %	17

4.3.4 Morfologie plodů

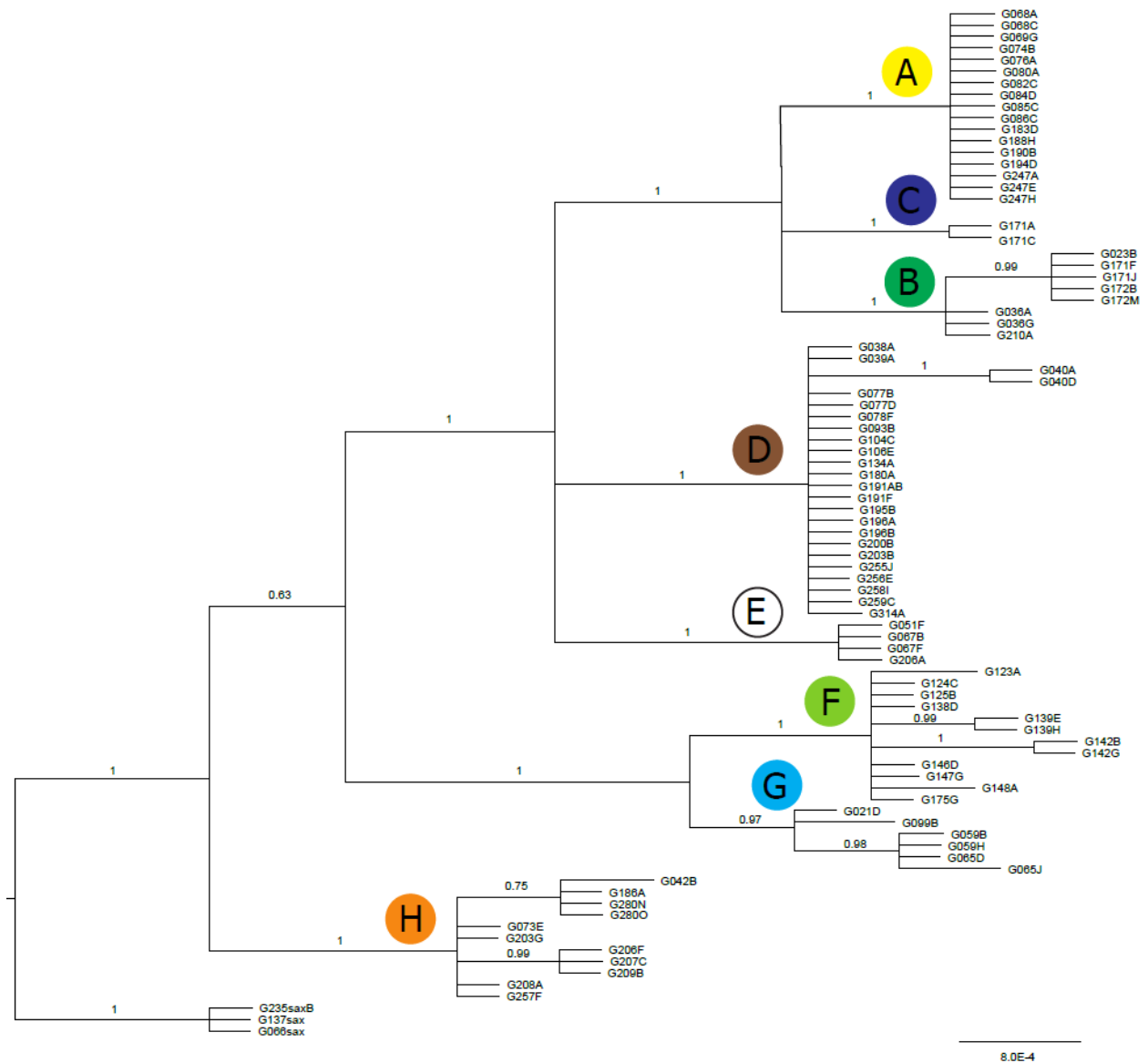
Fotografie 12 plodů z vybraných populací jsou pouze ilustrativní. Druh *G. valdepilosum* má papily na povrchu nejvýraznější, kuželovité. *G. sudeticum* má papily již menší, ale plody z Krkonošských populací se zdají být o trochu hladší. *G. anisophyllon* má plody s nejméně vystouplými polokulovitými papilkami. Plod z populace G296 od možného hybridu *G. pumilum* × *G. sudeticum* má plody s hrbolkatými papilami (*G. pumilum* má plody hladké).



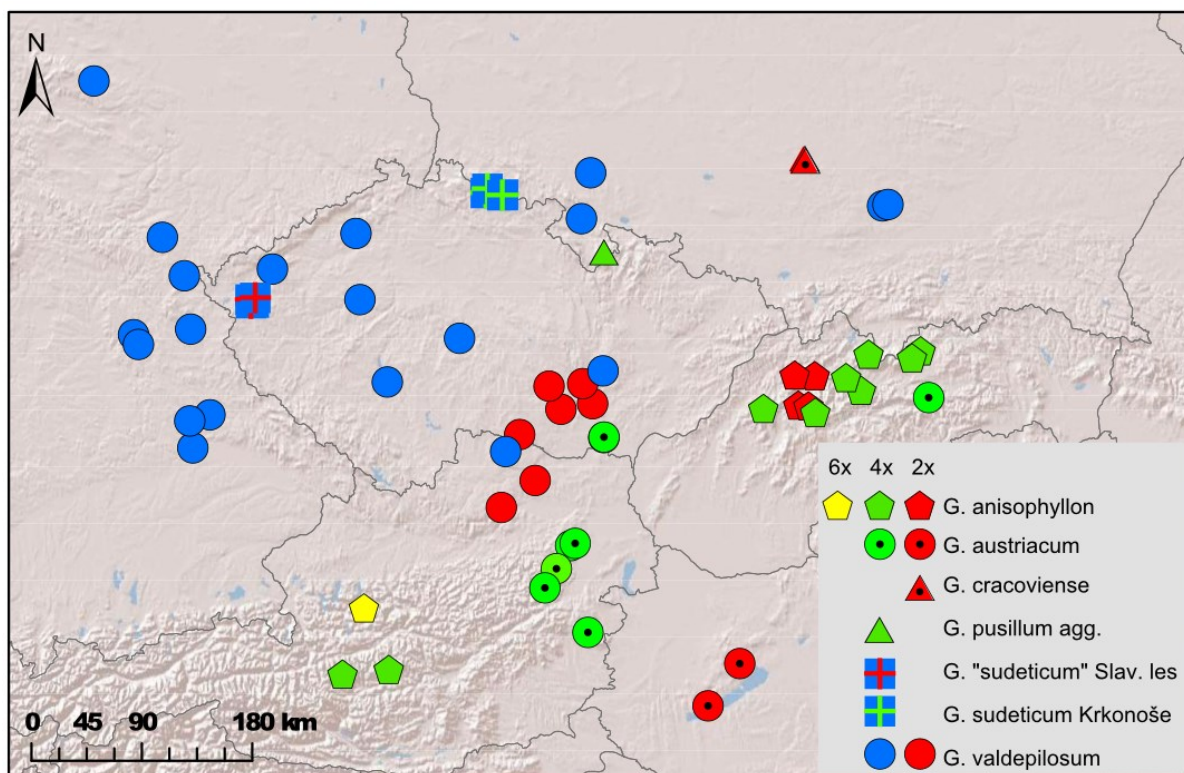
Obrázek 23: Ilustrační fotografie plodů z vybraných populací. *G. sudeticum* z Krkonoš (G171, G172); *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa (G032, G136), *G. anisophyllon* (G139, G175, G176, G264), *G. valdepilosum* (G043, G050, G151) a potenciálního hybridu *G. pumilum* × *G. sudeticum* (G294). Zvětšeno 100x, modrá autofluorescence vyvolaná UV zářením.

4.4 Sekvence chloroplastové DNA

Alignment spojených úseků *trnc-psbM* (1572 bp) a *trnL-ndhJ* (1590 bp) na celkem 87 jedincích, byl dlouhý celkem 3162 bazí. Celkem se v tomto datasetu na těchto dvou úsecích nacházelo 45 míst s nukleotidovým polymorfismem a 8 indelů. Tyto úseky jsem spojil a vytvořil z nich fylogenetický strom v programu MrBayes. Z tohoto stromu jsem pak definoval celkem 9 základních haplotypových skupin (obr. 24) s *G. saxatile* jako outgroup.

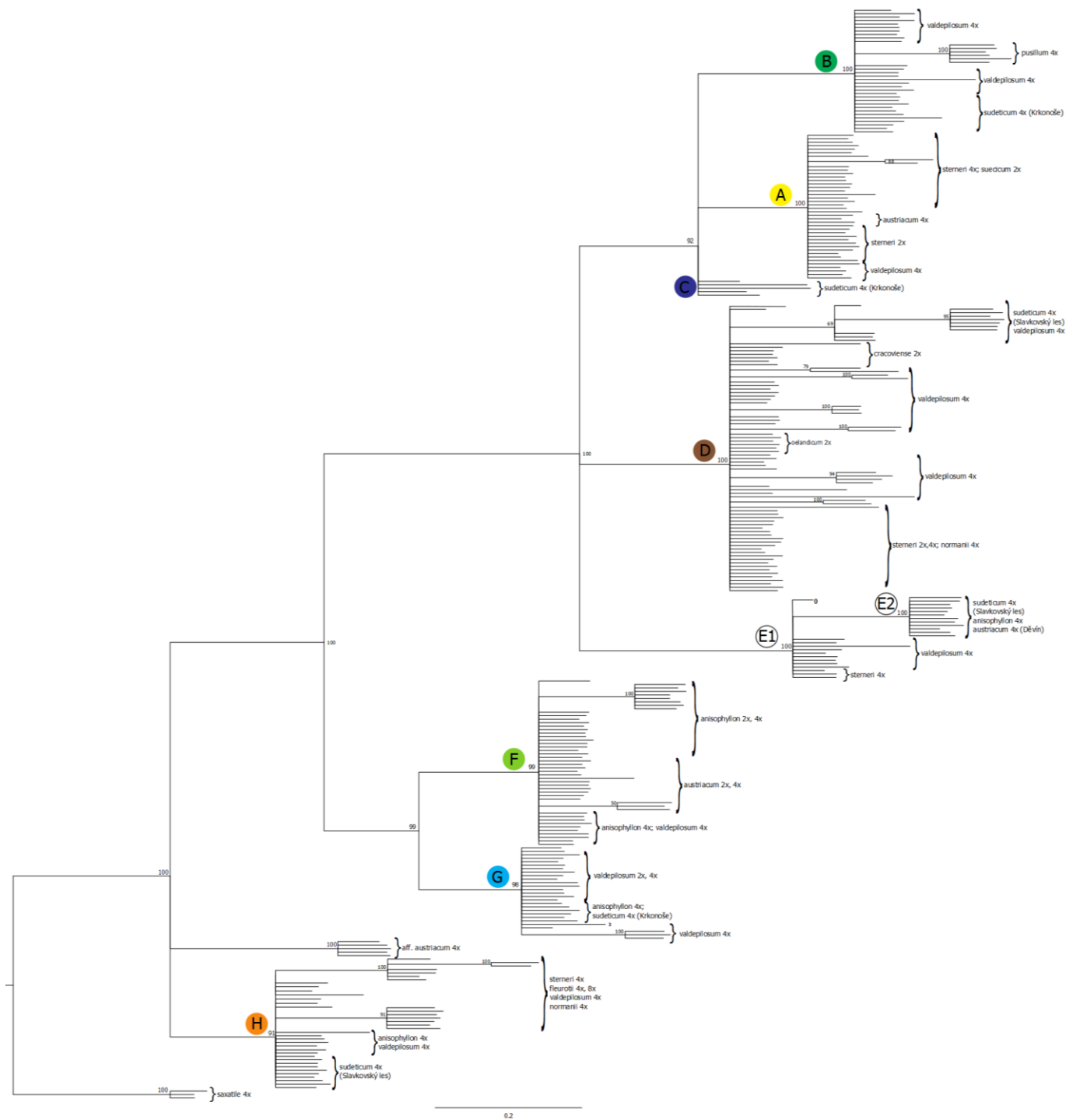


Obrázek 24: Fylogenetický strom vytvořený na základě bayesovské analýzy dvou úseků cpDNA *trnc-psbM*, *trnL-ndhJ* z 87 jedinců *agg. G. pusillum* v programu MrBayes (1mil.; burn-in 100tis.; general model distribution) s vypsanými posteriorními pravděpodobnostmi. Velká písmena značí vymezení základních haplotypových skupin.



Obrázek 25: Poloha populací zařazených do analýzy cpDNA z území ČR a okolních států vyznačující jednotlivé studované druhy z okruhu *Galium pusillum* agg. (pojetí podle Kolář et al. 2014). Taxonomicky nejasná populace G135 byla označena jako *G. pusillum* agg.

Dále jsem pro zjištění variability haplotypových skupin na populační úrovni osekvenoval dalších 213 jedinců jen pro úsek trnC-psbM. Z tohoto úseku jsem také vytvořil fylogenetický strom v programu MrBayes. Alignment tohoto úseku byl dlouhý 1487-1590 bp. Zahrnoval celkem 46 polymorfních míst, z toho na 20 místech se vyskytovaly polymorfismy vzácné, nalezené jen u několika jedinců. Dále se zde nacházely tři kratší polyA/polyT úseky; 10 vícenukleotidových insercí, z toho 3, které se nacházely jen u několika jedinců. Jednonukleotidových insercí jsem v tomto úseku našel 7.



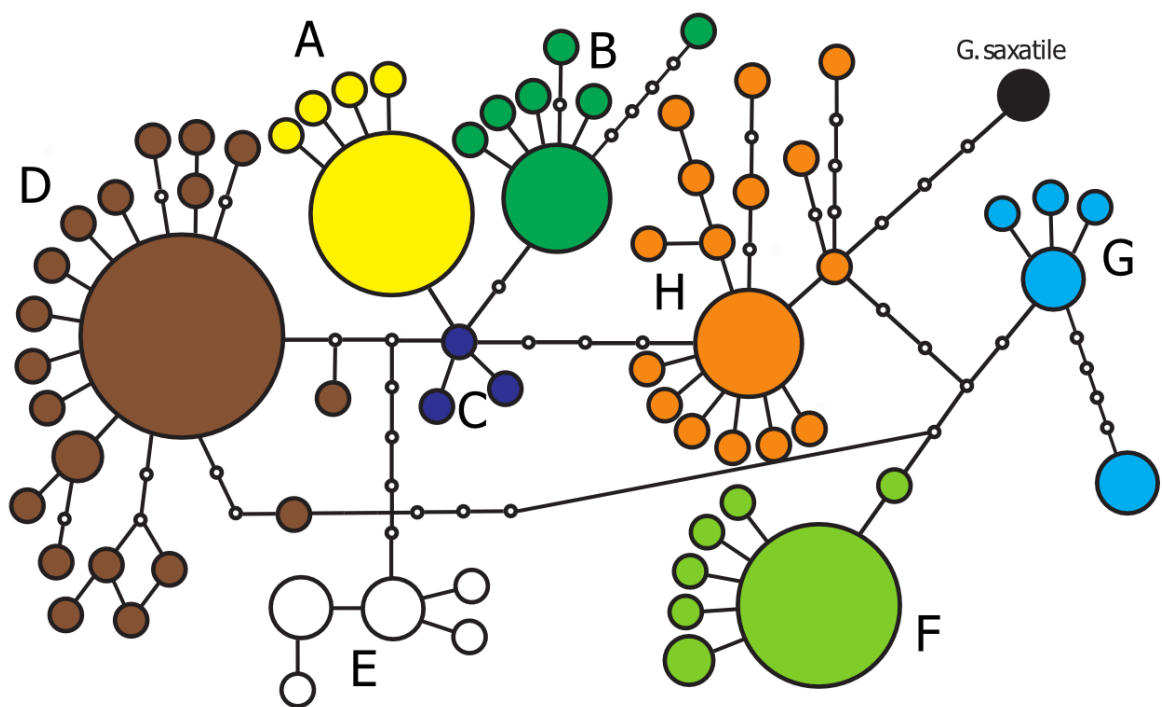
Obrázek 26: Fylogenetický strom chloroplastového úseku trnC-psbM vytvořený na základě bayesovské analýzy z 318 jedinců ze 100 populací v agg. *G. pusillum* s posteriorními pravděpodobnostmi uvedenými nad jednotlivými větvemi. Velká písmena značí vymezení základních haplotypových skupin. Strom s označením jedinců na listu A3 na konci práce.

V programu TCS jsem provedl na celkovém datasetu v úseku trnC-spbM dvě analýzy jednu bez zahrnutí indelů a druhou se zahrnutím indelů. Výsledné sítě nemají žádný centrální haplotyp (viz obr. 27 a 28).

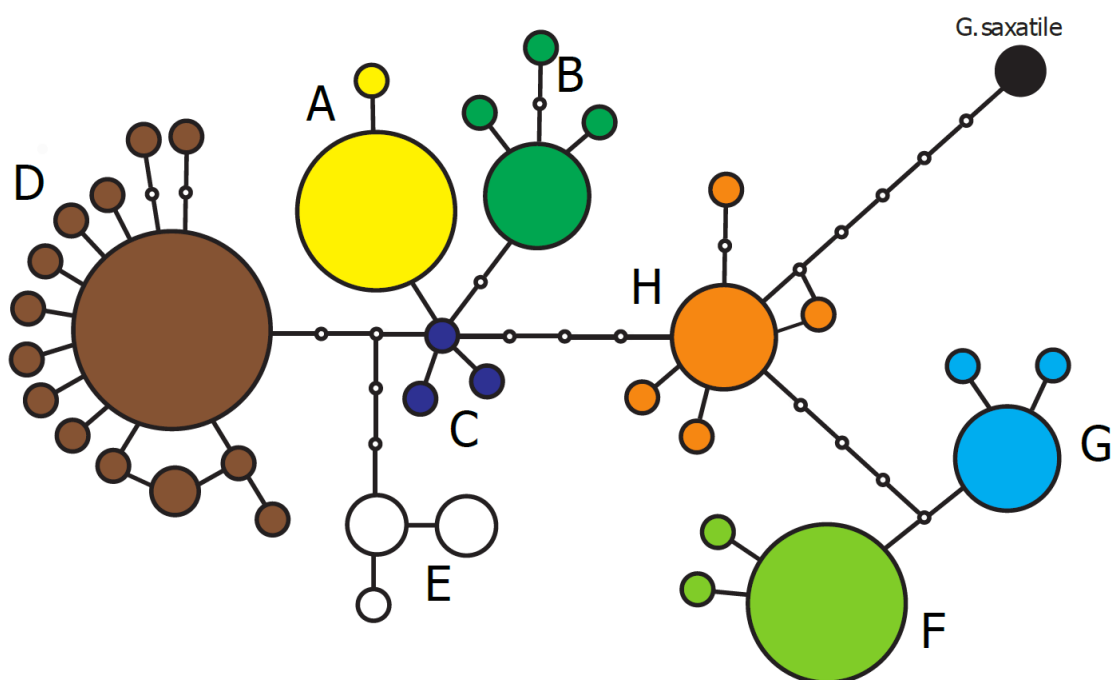
Haplotypová diverzita v rámci druhů i v rámci populací je vysoká. Jednotlivé haplotypové skupiny vytvářejí spíše geografický než druhový pattern. Haplotypová skupina A zahrnuje severské druhy z Dánska, Skandinávie a Velké Británie a na území střední Evropy byl nalezen pouze v populaci *G. austriacum* v Dolním Rakousku a u *G. valdepiosum* v pohoří Harz. Haplotypová skupina B zahrnuje především populace *G. sudeticum* z Krkonoš a k nim přilehlé populace *G. valdepiosum* z Polska včetně populaci G135 určenou pouze do agg. *G. pusillum*. Haplotypová skupina C je blízká skupině A a B, ale jasně specifická pro *G. sudeticum* z Krkonoš. Haplotypová skupina D je široce rozšířená, nachází se jak v severní tak střední Evropě. Zahrnuje populace reliktních diploidů *G. cracoviense* a *G. oleandicum*, dále pak *G. valdepiosum* v jižním Polsku a Bavorsku a Dolním Rakousku a *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa. Haplotypová skupina E je vzácnější, ale můžeme ji nalézt jak v severní tak ve střední Evropě. Je jediným haplotypem nalezeným u populace *G. austriacum* (G154) na pálavském Děvině (jediná populace tohoto druhu v ČR), dále se vyskytuje spíše u *G. valdepiosum* v Bavorsku a u *G. „sudeticum“* ve Slavkovském lese. Haplotypová skupina F je specifická pro *G. anisophyllon* a *G. austriacum* (obojí 2x i 4x) v Rakousku, Slovensku a Maďarsku, ale překvapivě i s jednou populací *G. valdepiosum* (G213) ze středních Čech. Haplotypová skupina G se až na výjimky soustředí v *G. valdepiosum* (2x, 4x) na jižní Moravě. Haplotypová skupina H se nejhojněji vyskytuje v severní Evropě, ve střední Evropě nejvíce u *G. valdepiosum* v Bavorsku a *G. „sudeticum“* ve Slavkovském lese, ale v několika případech taky u *G. anisophyllon* v Alpách a Vysokách Tatrách.

Populace *G. sudeticum* z Krkonoš jsou haplotypově poměrně bohaté (haplotypová skupina C, B, G) a sdílejí haplotypové sekvence s okolními populacemi *G. valdepiosum* a taky s nezařazenou populací *G. pusillum* agg. od Králického sněžníku (G135). S populacemi ze Slavkovského lesa až na výjimky nesdílely žádný haplotyp. Ty byly taktéž haplotypově bohaté (D, E, G, H), sdílející haplotypy především s populacemi *G. valdepiosum* z Bavorska.

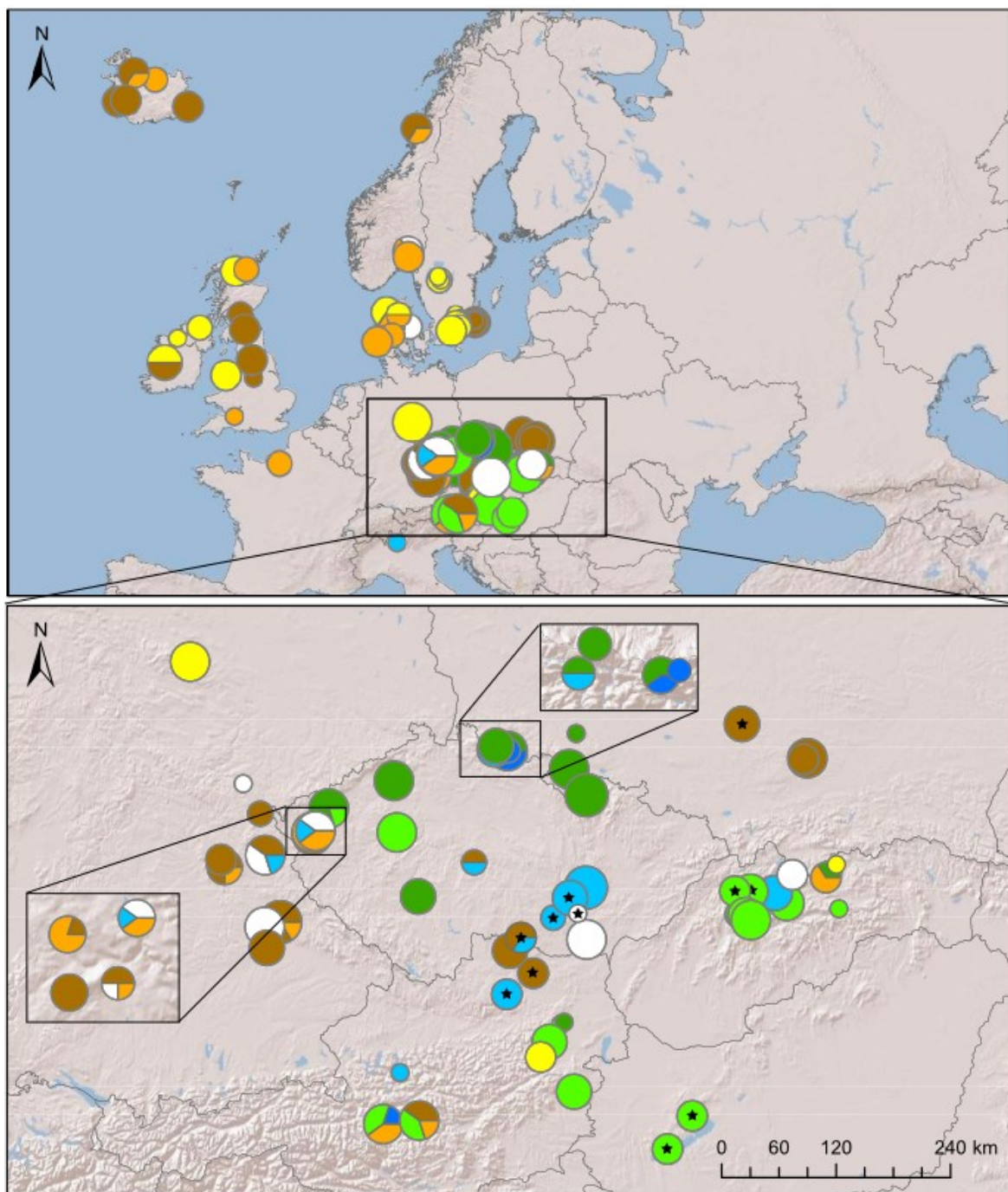
Při zahrnutí indelů se struktura haplotypové sítě až na několik výjimek zásadně nezměnila. Od haplotypu D se oddělila populace *G. sudeticum* ze Slavkovského lesa (G136, část G032) a *G. valdepiosum* (G040) dvěmi unikátními 7 nukleotidovými insercemi. V haplotypu G pak dvě populace *G. valdepiosum* (G059 a G065). Haplotyp H se více rozpadl.



Obrázek 27: Haplotypová síť plastidového úseku trnC-psbM vytvořená z 318 jedinců *Galium pusillum* agg. ze střední a severní Evropy se zahrnutím indelů (kódovány jako pátý stav). Hlavní haplotypové skupiny jsou označeny písmeny a barvami stejně jako v obr. 25.



Obrázek 28: Haplotypová síť plastidového úseku trnC-psbM vytvořená z 318 jedinců *Galium pusillum* agg. ze střední a severní Evropy. Indely a délkové polymorfismy nebyly do analýzy zahrnuty (kódovány jako chybějící data). Hlavní haplotypové skupiny jsou označeny písmeny a barvami stejně jako v obr. 25.



Obrázek 29: Mapa zastoupení chloroplastových haplotypových skupin v úseku trnC-psbM u studované skupiny *G. pusillum* agg. Barvy haplotypů odpovídají barvám v obr. 25. Velikost koláče odpovídá množství osekvenovaných jedinců (1-6). Diploidní populace jsou označeny hvězdičkou. Dvě zvětšené oblasti Krkonoše a Slavkovský les.

4.5 AFLP data/výsledky

Celkem analyzovaných 303 jedinců ze 46 populací zahrnující druhy *G. sudeticum*, *G. valdepilosum*, *G. austriacum* a *G. anisophyllon* poskytlo celkem 163 reproducibilních a variabilních lokusů. Reproducibilita daného datasetu byla 94,6 %. Jednotlivé fragmenty byly široce sdíleny mezi druhy, pouze u druhu *G. valdepilosum* jsem našel dva lokusy s proužky unikátními pro tento druh.

4.5.1 Indexy variability, AMOVA

Rozdíly genetické diversity (Nei's genetic diversity) mezi populacemi byly malé, maximálně zhruba trojnásobné (minimum 0.12 (G046), maximum 0.30 (G136), podrobnosti tab. 20).

Pro výpočet DW indexu jsme vzhledem k různým počtům jedinců v populacích použil průměrnou hodnotu na jedince v populaci. Rozdíly byly maximálně dva a půl násobné s maximem 1.00 (G143) a minimem 0.38 (G150). Všechny populace *G. sudeticum* z Krkonoš se nacházely nad mediánem, viz tab. 20.

Tabulka 20: Souhrnná tabulka populací *G. pusillum* agg. použitých v AFLP analýzách. Pět nejvyšších hodnot je vyznačeno tučně, pět nejmenších je podtrženo, n značí počet analyzovaných jedinců.

Č. pop.	Taxon	n	Průměrný DW index na jedince	Podíl variabilních markerů	Index diversity (Nei)
G032	<i>G. „sudeticum“</i> (Slav. les)	9	0.56	0.62	0.24
G136	<i>G. „sudeticum“</i> (Slav. les)	8	<u>0.43</u>	0.73	0.3
G277	<i>G. „sudeticum“</i> (Slav. les)	9	0.51	0.48	0.19
G278	<i>G. „sudeticum“</i> (Slav. les)	6	0.67	0.5	0.22
G121	<i>G. anisophyllon</i>	3	0.9	<u>0.32</u>	0.21
G122	<i>G. anisophyllon</i>	4	0.52	<u>0.26</u>	<u>0.14</u>
G130	<i>G. anisophyllon</i>	5	0.6	0.39	0.19
G139	<i>G. anisophyllon</i>	10	0.54	0.52	0.21
G175	<i>G. anisophyllon</i>	9	0.69	0.6	0.23
G176	<i>G. anisophyllon</i>	8	<u>0.4</u>	0.64	0.26
G210	<i>G. anisophyllon</i>	5	0.53	<u>0.35</u>	<u>0.17</u>
G264	<i>G. anisophyllon</i>	4	0.47	<u>0.35</u>	0.2
G140	<i>G. austriacum</i>	4	0.48	0.41	0.23
G141	<i>G. austriacum</i>	4	<u>0.42</u>	0.51	0.28
G142	<i>G. austriacum</i>	6	0.6	0.62	0.28
G143	<i>G. austriacum</i>	4	1	0.45	0.24
G146	<i>G. austriacum</i>	5	0.66	0.55	0.26
G154	<i>G. austriacum</i>	8	0.46	0.45	0.19
G135	<i>G. pusillum</i> agg.	8	0.47	0.55	0.23
G171	<i>G. sudeticum</i> (Krkonoše)	9	0.61	0.66	0.26
G172	<i>G. sudeticum</i> (Krkonoše)	7	0.69	0.59	0.26

G260	<i>G. sudeticum</i> (Krkonoše)	8	0.58	0.5	0.2
G017	<i>G. valdepiosum</i>	6	0.46	0.47	0.22
G023	<i>G. valdepiosum</i>	6	0.47	0.48	0.21
G036	<i>G. valdepiosum</i>	10	0.5	0.51	0.2
G040	<i>G. valdepiosum</i>	10	0.51	0.48	0.18
G042	<i>G. valdepiosum</i>	8	0.68	0.55	0.24
G043	<i>G. valdepiosum</i>	9	<u>0.42</u>	0.62	0.25
G044	<i>G. valdepiosum</i>	5	0.46	<u>0.31</u>	<u>0.14</u>
G045	<i>G. valdepiosum</i>	4	0.67	0.45	0.24
G046	<i>G. valdepiosum</i>	4	0.68	<u>0.23</u>	<u>0.12</u>
G047	<i>G. valdepiosum</i>	9	0.51	0.51	0.19
G050	<i>G. valdepiosum</i>	8	0.55	0.6	0.24
G051	<i>G. valdepiosum</i>	9	0.72	0.53	0.21
G058	<i>G. valdepiosum</i>	4	0.61	0.43	0.24
G059	<i>G. valdepiosum</i>	7	0.61	0.51	0.22
G106	<i>G. valdepiosum</i>	8	0.59	0.55	0.21
G134	<i>G. valdepiosum</i>	7	0.48	0.4	<u>0.16</u>
G150	<i>G. valdepiosum</i>	9	<u>0.38</u>	0.51	0.19
G151	<i>G. valdepiosum</i>	10	0.46	0.52	0.19
G213	<i>G. valdepiosum</i>	11	0.5	0.75	0.28
G247	<i>G. valdepiosum</i>	9	0.62	0.55	0.22

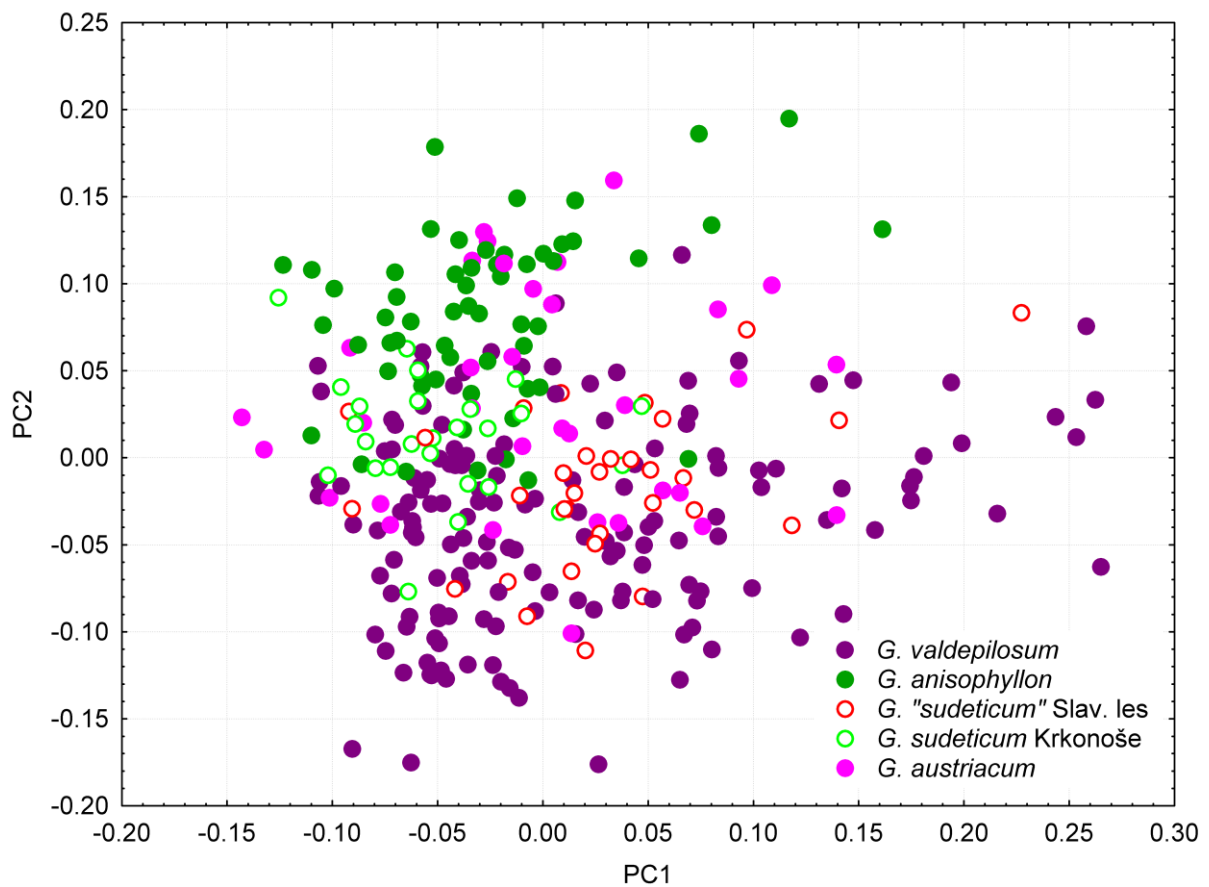
Celková analýza molekulární variance (AMOVA) mezi 4 geografickými skupinami (populace *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa byly v celkové analýze přiřazeny ke *G. valdepiosum*) odhalila největší podíl variability v rámci populací (77,57 %) následovaná variabilitou mezipopulační (18,56 %) a s jen mizivým podílem variability mezi stanovenými druhy (3,87 %). Při dílčích AMOVA analýzách je mezidruhová variabilita mezi *G. anisophyllon* a *G. valdepiosum* 5,35 %. *G. „sudeticum“* má největší meziskupinový rozdíl s *G. anisophyllon* (7,69 %) nejmenší pak s *G. valdepiosum* (0,62 %). Zásadní rozdíly v mezipopulační variabilitě u *G. anisophyllon* (18,47 %) a *G. valdepiosum* (22,18 %) jsem nenašel. Celkový přehled AMOVA výsledků je v tabulce 21.

Tabulka 21: Výsledky analýzy molekulární variance AMOVA s rozdělním na druhy *G. anisophyllon*, *G. austriacum*, *G. sudeticum* (Krkonoše), *G. valdepilosum*, populace *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa byly v celkové AMOVě zařazeny ke *G. valdepilosum*, v dílčích AMOVách byly definovány jako vlastní skupina.

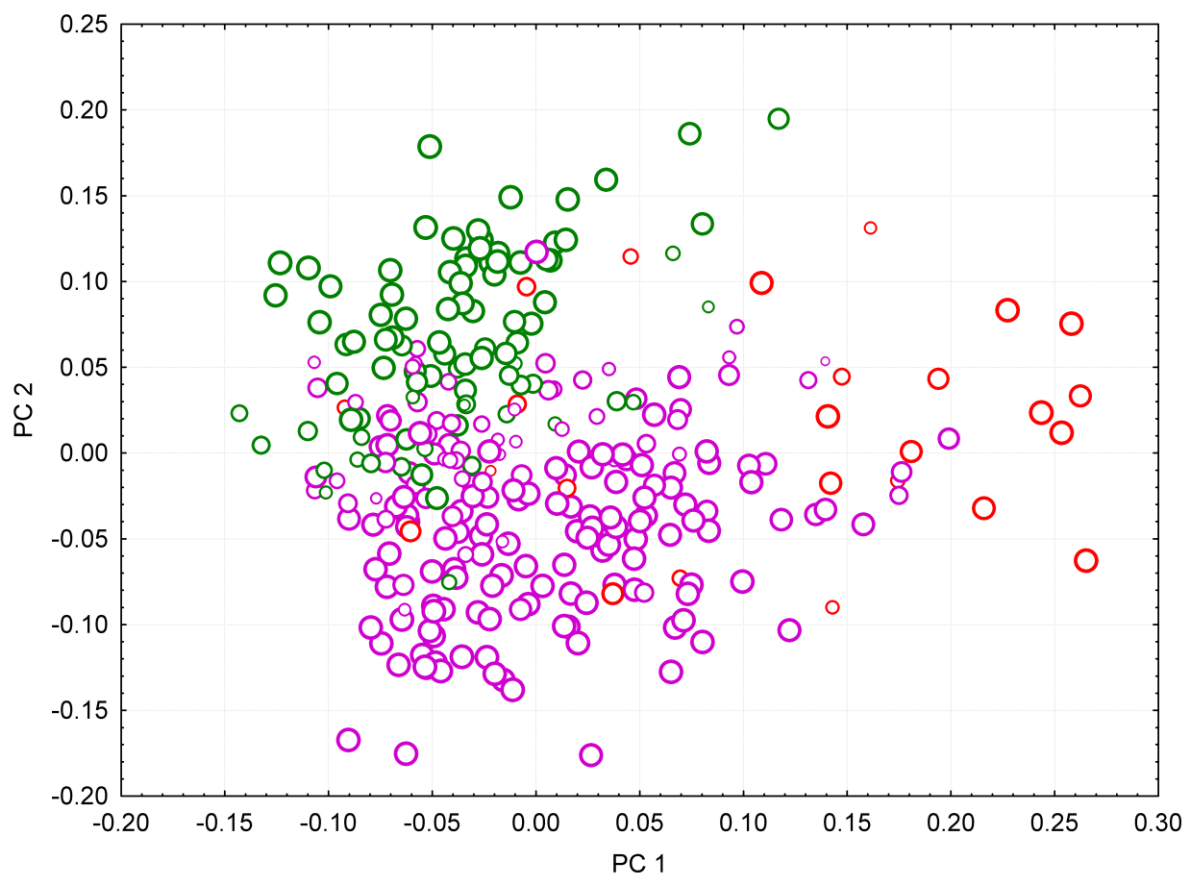
Celý dataset	d. f.	% variability
Mezi druhy	3	3,87
Mezi populacemi	38	18,56
V rámci populací	254	77,57
<i>G. anisophyllon</i> + <i>G. valdepilosum</i>		
Mezi druhy	1	5,35
Mezi populacemi	27	20,13
V rámci populací	180	74,52
<i>G. anisophyllon</i> + <i>G. sudeticum</i>		
Mezi druhy	1	3,38
Mezi populacemi	10	15,36
V rámci populací	68	81,25
<i>G. anisophyllon</i> + <i>G. "sudeticum"</i> Slav. les		
Mezi druhy	1	7,69
Mezi populacemi	11	14,79
V rámci populací	75	77,52
<i>G. valdepilosum</i> + <i>G. sudeticum</i>		
Mezi druhy	1	2,06
Mezi populacemi	21	20,36
V rámci populací	154	77,58
<i>G. valdepilosum</i> + <i>G. "sudeticum"</i> Slav. les		
Mezi druhy	1	0,62
Mezi populacemi	22	20,47
V rámci populací	161	78,9
<i>G. sudeticum</i> + <i>G. "sudeticum"</i> Slav. les		
Mezi druhy	1	5,31
Mezi populacemi	5	10,03
V rámci populací	49	84,66
Jen <i>G. anisophyllon</i>		
Mezi populacemi	8	18,47
V rámci populací	47	81,53
Jen <i>G. valdepilosum</i>		
Mezi populacemi	19	22,18
V rámci populací	133	77,82
Jen <i>G. sudeticum</i>		
Mezi populacemi	2	8,95
V rámci populací	21	91,05

4.5.2 Analýza hlavních koordinát (PCoA)

Pro přehled ve struktuře dat jsem zvolil analýzu hlavních koordinát PCoA s použitím Jaccardova koeficientu. Procento vysvětlené variability na prvních dvou osách bylo 4.48 % a 3.82 %. Viz obrázky 30 a 31. Z promítnutí příslušnosti k jednotlivým druhům je zřejmé, že přestože analýza nevytváří oddělené shluky, lze podle druhé osy vysledovat jasný trend oddělující *G. valdepilosum* (překrývající se i s populacemi *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa) a *G. anisophyllum* (překrývající se i s populacemi *G. austriacum* a *G. sudeticum* z Krkonoš).



Obrázek 30: Analýza hlavních koordinát (PCoA) AFLP multilokusových profilů 303 jedinců středoevropských zástupců skupiny *Galium pusillum* agg. s body obarvenými podle přiřazení k tradičně chápaným druhům (u *G. sudeticum* jsou odděleně zobrazeny populace z Krkonoš a ze Slavkovského lesa). První dvě osy vysvětlují 4.48 % a 3.82 %.



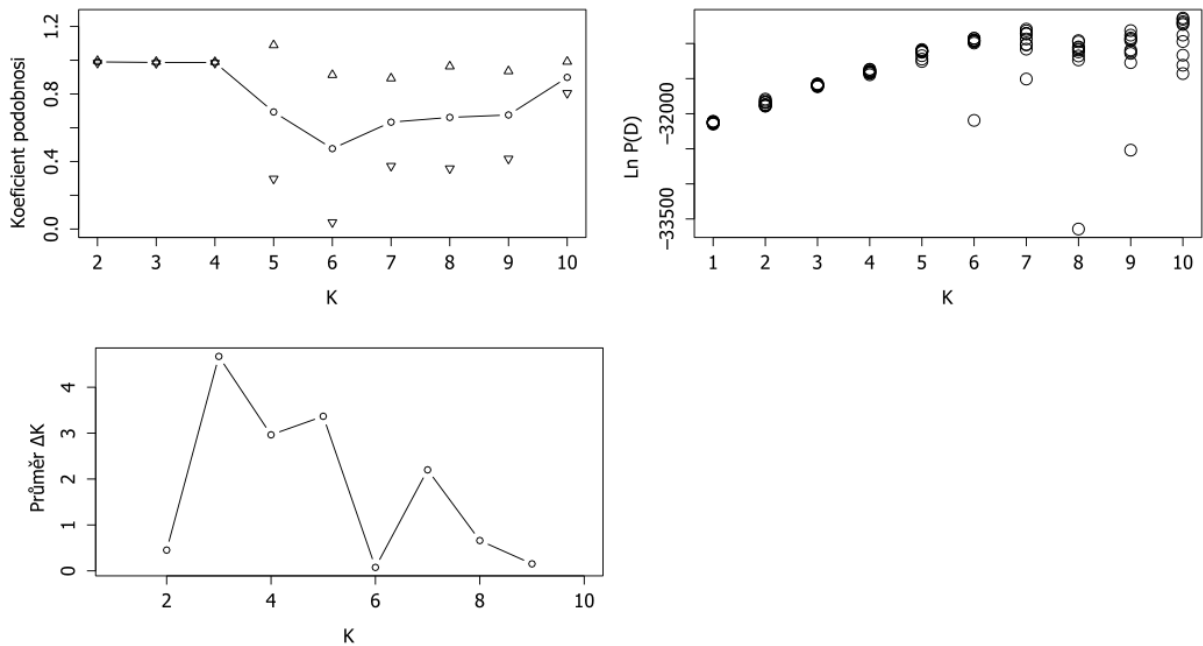
Obrázek 31: Analýza hlavních koordinát (PCoA) AFLP dat 303 jedinců rodu *Galium* s body obarvenými podle skupin v analýze programu Structure (K=3) s body škálovanými podle míry promíšenosti (admixture) skupin. Menší body = větší míra promíšenosti a tím i méně jednoznačné přiřazení k jedné skupině. Zelená barva značí skupinu *G. anisophyllum*, *G. austriacum*; fialová a červená *G. valdepilosum* (barvy se shodují s obr. 35). První dvě osy vysvětlují 4.48 % a 3.82 %.

4.5.3 Klastrovací analýzy Structure

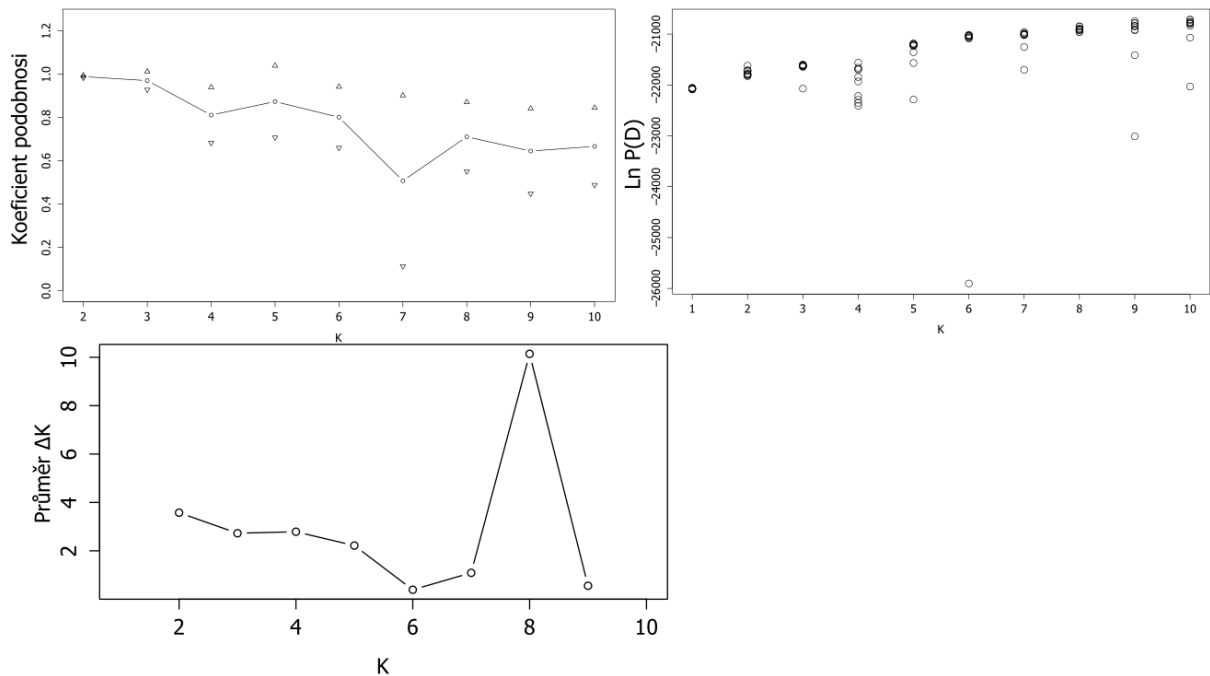
Pro zjištění promíchání genetické informace mezi sledovanými populacemi a pro odhalení vztahů *G. sudeticum* s horskými populacemi *G. anisophyllum* z Alp a Karpat a nížinnými populacemi *G. valdepilosum* jsem využil klastrovací analýzu programu Structure 2.3.4.

Při analýze celého datasetu nebyl optimální počet skupin (K) jednoznačný. Dle podobnosti jednotlivých runů pro dané K, vycházel jako nejlepší („nejstabilnější“) počet skupin 2, 3 a 4. V ΔK nebyly žádné výrazné rozdíly (pouze v řádu jednotek, viz obr 32, proto toto kritérium bylo dále využito pouze jako pomocné. V práci je dále prezentováno rozdělení do skupin při stabilním K (koeficient podobnosti mezi všemi deseti běhy pro dané K blízky 1) s relativně nejvyšším ΔK , tzn. K=3 (viz. obr. 32). Při K=2 se dvě základní velké skupiny *G. anisophyllum* a *G. valdepilosum* sloučí do jedné a k nim zůstane skupina (na obrázku 35 červená) skládající se především z populací G136

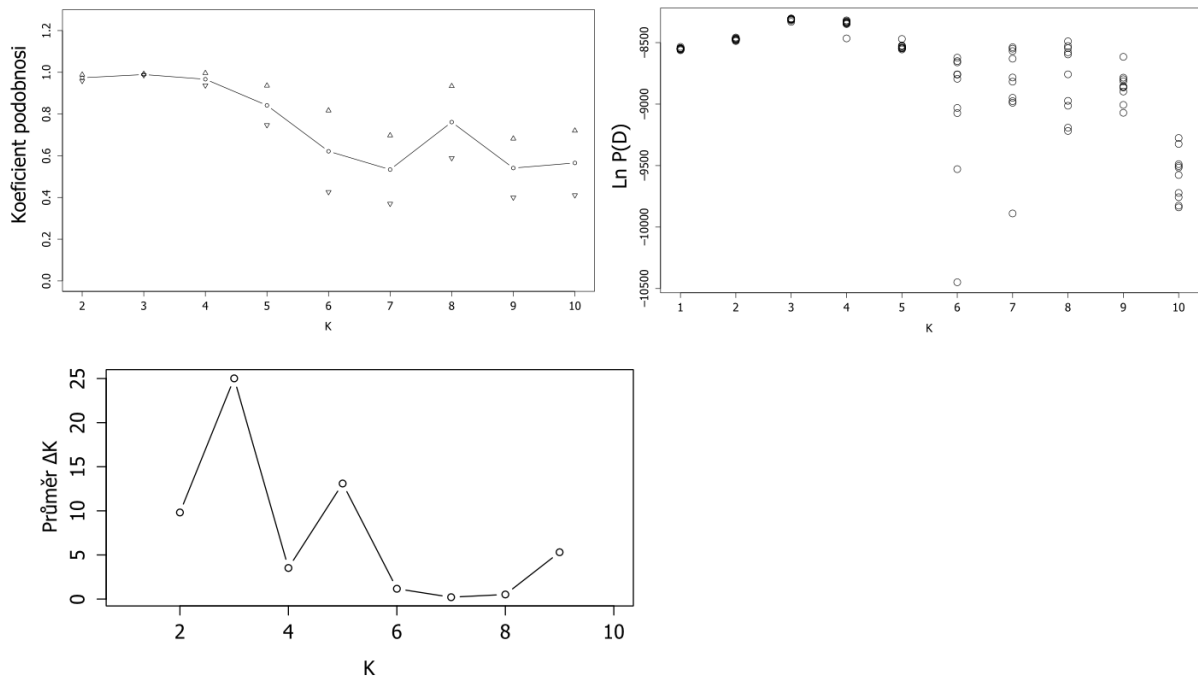
(Vlček, *G. „sudeticum“*) a G43, G044 (*G. valdepilosum* z Bavorska). Při K=4 se od červené skupiny odštěpí několik jedinců z různých populací, nejvíc (5) z populace G136.



Obrázek 32: Analýza výsledků jednotlivých „runů“ pro celý dataset při K=1-10. Vlevo nahoře: Koefficient podobnosti jednotlivých „runů“; Vpravo nahoře: Pravděpodobnost modelu; Vlevo dole: koeficient rozdílnost mezi skupinami ΔK .



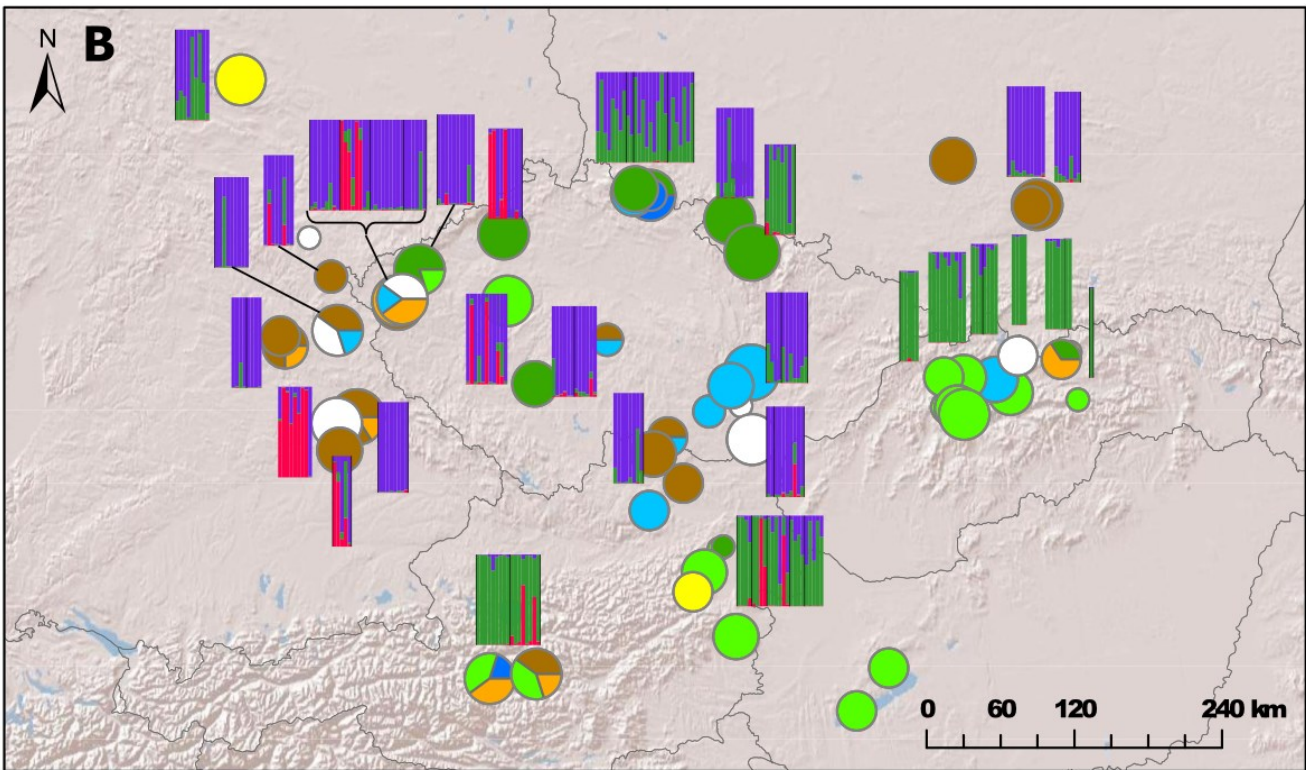
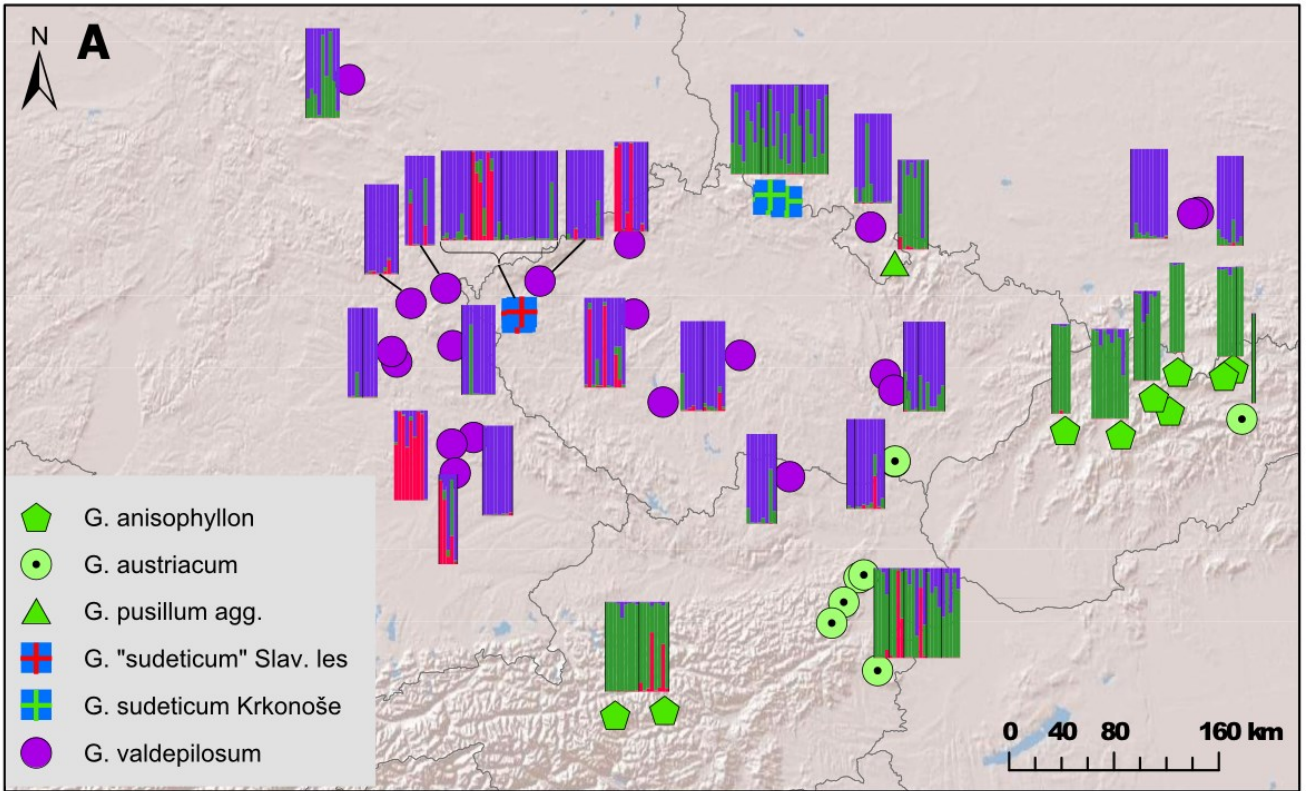
Obrázek 33: Analýza výsledků jednotlivých „runů“ pro skupinu *G. valdepilosum* definovanou při structure analýze celého AFLP datasetu se zahrnutím *G. sudeticum* z Krkonoš (K=1-10). Vlevo nahoře: Koefficient podobnosti jednotlivých „runů“; Vpravo nahoře: Pravděpodobnost modelu; Vlevo dole: koeficient rozdílnost mezi skupinami ΔK .



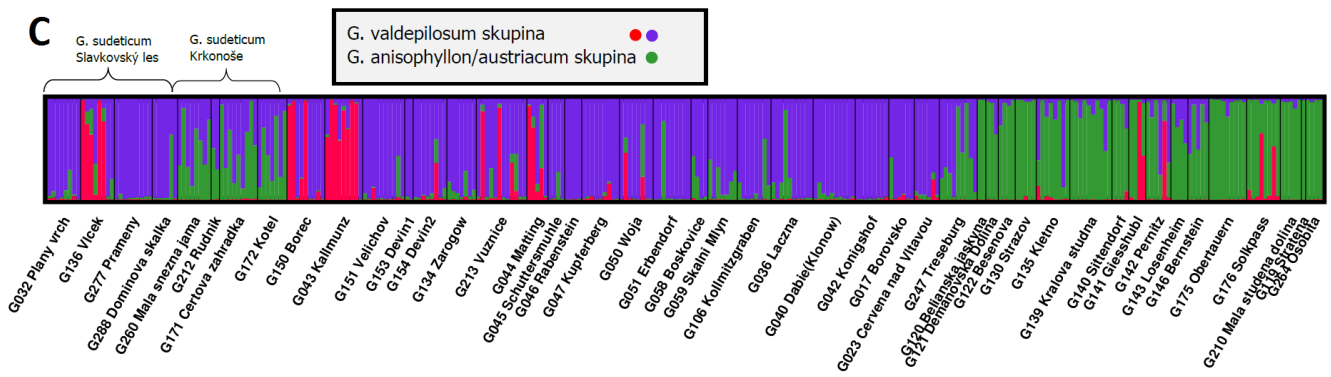
Obrazek 34: Analýza výsledků jednotlivých „runů“ pro skupinu *G. anisophyllon* definovanou při structure analýze celého AFLP datasetu se zahrnutím *G. sudeticum* z Krkonoš (K=1-10). Vlevo nahoře: Koefficient podobnosti jednotlivých „runů“; Vpravo nahoře: Pravděpodobnost modelu; Vlevo dole: koeficient rozdílnost mezi skupinami ΔK .

Při separátní analýze skupiny *G. valdepilosum* (fialová, červená) se potvrdil výsledek z celkové analýzy s jednoznačně nejlepším $K=2$ (obr. 33, nejstabilnější výsledek mezi jednotlivými běhy). V analýze skupiny *G. valdepilosum* společně s jedinci *G. sudeticum* z Krkonoš tyto populace připadly dovnitř větší (fialové) skupiny *G. valdepilosum* (srovnej obr. 35 a 36).

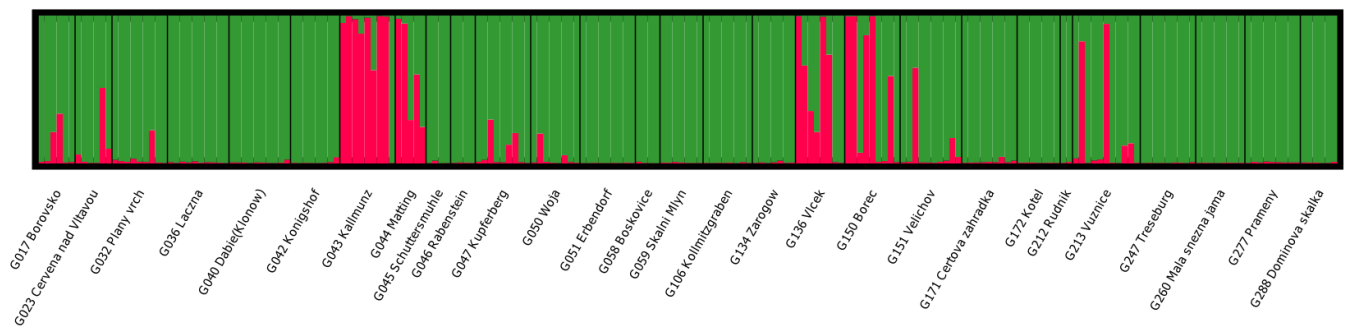
Při separátní analýze *G. anisophyllon* mi jako ideální vyšlo $K=2$, kdy se jediné dvě alpské populace zahrnuté v datasetu *G. anisophyllon* (G175, G176) oddělily od zbytku karpatských populací (výsledky nejsou zobrazeny). Při analýze téhož datasetu pouze s přidáním *G. sudeticum* z Krkonoš vzrostl ideální počet skupin na $K=3$ (obr 34, nejvyšší ΔK a stabilní výsledek mezi jednotlivými běhy), ale kromě populací *G. sudeticum* se k této třetí skupina přidala i jedna populace ze slovenských Vysokých Tater (G210, Malá studená dolina; obr. 37). Při $K=2$ (nižší koeficient podobnosti, nižší ΔK) se populace G176, G175 z Alp sloučily se skupinou s *G. sudeticum*.



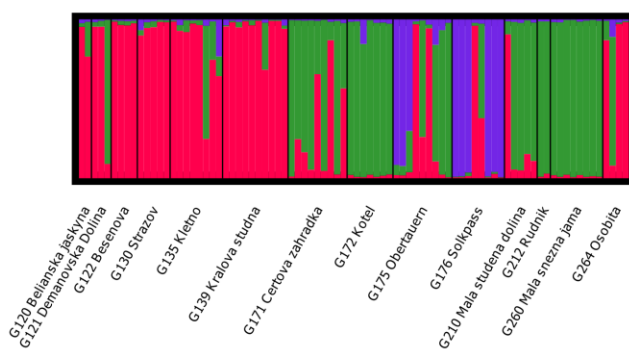
Vysvětlivka k mapám na následující straně.



Obrázek 35: Příslušnost jedinců ke skupinám určené pomocí AFLP multilokusových fenotypů v programu Structure pro K=3, provedený na 303 jedincích s druhy *G. sudeticum*, *G. valdepilosum*, *G. anisophyllon* a *G. austriacum*, pouze tetraploidní cytotypy. A: Geografická poloha a genetická příslušnost ke Structure skupinám u jednotlivých studovaných jedinců sružených podle populací (sloupcové diagramy) a příslušnost k tradičně rozlišovaným taxonům (barevné symboly); B: Totéž jako v části A s promítnutím výskytu haplotypových skupin v daných populacích (barvy haplotypových skupin podle obr. 25); C: Celkový přehled všech analyzovaných populací při tomtéž K.



Obrázek 36: Příslušnost jedinců ke skupinám určené pomocí AFLP multilokusových fenotypů v programu Structure K=2, provedený pouze na skupině *G. valdepilosum* definované apriorně na základě geografie a ekologie s přihlédnutím k výsledkům celého datasetu + populace *G. sudeticum* (G171, G172, G212, G260) včetně populací ze Slavkovského lesa (G032, G136, G277, G278).



Obrázek 37: Příslušnost jedinců ke skupinám určené pomocí AFLP multilokusových fenotypů v programu Structure pro K=3, provedený pouze na druhu *G. anisophyllon* + populace *G. sudeticum* z Krkonoš (G171, G172, G212, G260). Populace G175 a G176 jsou z Alp. Zbytek je ze slovenských pohoří Karpat. Při K=2 se fialová Alpská skupina sloučí se zelenou.

5. Diskuze

5.1 Evoluční historie tetraploidních populací komplexu *G. pusillum* agg. ve střední Evropě

Studované druhy *G. pusillum* agg. jsou celkově málo geneticky diferencované. To ukazují jednak nízké rozdíly při srovnání jednotlivých druhů v analýzách AMOVA, kdy při zadání dvou nejjasněji odlišitelných druhů *G. valdepilosum* a *G. anisophyllon* byl mezidruhový rozdíl pouze 5,35 %, ale také poměrně malé rozdíly v proporcích vzácných fragmentů (DW index; max. 1; medián 0,535; min. 0,38). Tři nejvyšší hodnoty DW indexu patřily populacím *G. austriacum* z Dolního Rakouska, *G. anisophyllon* ze slovenských Tater a *G. valdepilosum* z Bavorska. Vyšší DW index obvykle značí reliktní oblasti, kde rostliny přetrvávají po delší dobu a mohly být například zdrojovými populacemi při změnách vegetace a otevírání nových nik (Schönswetter & Tribsch 2005). V našem případě jsou ale rozdíly příliš malé. Též rozdíly v populačních diverzitách jsou poměrně zanedbatelné. Ty se dají interpretovat tak, že pozorované v současnosti izolované populace představují fragmenty většího spojitého areálu a izolace populací zatlačených do holocénních refugií se u těchto dlouhověkých cizosprašných rostlin (Ehrendorfer et al. 1996, Štěpánková 2000) ještě nestihla projevit (ještě nedošlo k ochuzení diverzity u malých populací), podobně jako v (*Gentiana*, Ekrťová et al. 2012). Na druhou stranu poměrně vysoká míra mezipopulační diferenciace v rámci druhů (viz AMOVA tabulka 21) ukazuje na již pokračující odlišování jednotlivých populací, které jsou v krajině izolovány do příhodných otevřených biotopů (stanoviště v blízkosti skal v říčních kaňonech, na vršcích kopců nebo v horských oblastech).

Na pozůstatky velkého fragmentovaného areálu ukazují i výsledky chloroplastové DNA, kde jsou jednotlivé haplotypy široce sdíleny a v některých populacích nacházíme až tři různé haplotypové skupiny. Podobné výsledky můžeme nalézt například u rozchodníků (*Saxifraga*, Winkler et al. 2013) nebo u chrastavců (*Knautia*, Kolář et al. 2012a), jinak je ale tento výsledek v kontrastu s podobnými studiemi (*Rosa*, Fér et al. 2007; *Lonicera*, Daneck et al. 2011), kdy pozorovaná haplotypová diverzita byla v území střední Evropy poměrně chudá, vysvětlovaná spíše rychlou disperzí v postglaciálu. Z hlediska celkové struktury jsem pomocí klastrovacích analýz odhalil tři skupiny.

Do jedné spadá horský druh *G. anisophyllon* spolu se spíše nížinným *G. austriacum*. Tento výsledek podpořil dosavadní teorie o hybridním vzniku tetraploidního cytotypu *G. austriacum* z jeho diploidního cytotypu a tetraploidního cytotypu *G. anisophyllon* (isosymové analýzy, Ehrendorfer et al. 1996). Mezi populacemi *G. anisophyllon* ze Slovenska a z rakouských Alp jsem nenalezl výrazné rozdělení. Tuto situaci si vysvětlují právě křížením s nížinnými populacemi *G. austriacum*, který mohl

tvořit genetický most spojující tyto dvě horské oblasti. *G. anisophyllum* totiž roste spíše v subalpinském pásmu a měl tak v době ledové své optimum v nižších nadmořských výškách podobně jako koniklec (*Pulsatilla vernalis*, Ronikier et al. 2008b), na rozdíl od téměř obligátně horských druhů, na které se zaměřuje většina studií vztahů vysokohorských flór (*Ranunculus*, Schönswetter et al. 2004b; *Campanula*, Ronikier et al. 2008a), a které vykazují mezi hlavními pohořími jasně oddělené skupiny. Nutno přiznat, že pro obecnější závěry by bylo nutné sebrat populace i mimo oblast východních Alp a západních Karpat, což jsou regiony geneticky často velmi blízké (*Comastoma*, Schönswetter et al. 2004a; *Ranunculus* Paun et al. 2008; Winkler et al. 2013).

Výsledky AFLP pak podporují také výsledky cpDNA, kdy je haplotyp F v této skupině téměř majoritní a vyskytuje se také u diploidních zástupců. Z tohoto obecného schématu se vyčleňuje jediná populace *G. austriacum* udávaná z území České republiky z Pavlovských vrchů (Krauhlová & Štěpánková 1998). V analýzách připadla do skupiny *G. valdepilosum* (Structure barplot obr. 35). Krauhlová & Štěpánková (1998) rostliny z této populace určila patrně i na základě ekologie, jelikož rostou na vápenci v pěchavových trávnicích s řadou jiných reliktních druhů (např. písečnice velkokvětá, *Arenaria grandiflora*), avšak podle současných poznatků může *G. valdepilosum* růst v seslerietech na vápenci i jinde na jižní Moravě (Kolář et al. 2014). Proto se domnívám, že se jedná o druh *G. valdepilosum* a *G. austriacum* se na našem území nevyskytuje.

Do zbylých dvou skupin odlišených při klastrovacích analýzách v programu Structure spadal druh *G. valdepilosum* včetně populací ze Slavkovského lesa, tradičně přiřazovaným ke *G. sudeticum*. Menší ze dvou skupin (ve výsledkových diagramech červená) zahrnuje především populace G43 a G44 z Bavorska a G136 z hadců ve Slavkovském lese. Nalezení takového, i když velmi poměrně málo diferencované skupiny je pozoruhodný výsledek. Původní teorie totiž předpokládala (Ehrendorfer 1962) osídlení této oblasti jednou migrační vlnou představující druh *G. valdepilosum*. Nalezená podskupina může představovat pozůstatek jiné migrační vlny např. z předchozího meziledového období. Podobný genetický pattern byl nalezen i u rozchodníku (*Saxifraga paniculata*), kdy se rostliny ze střední Evropy dělily na dvě skupiny (Reisch 2008), autor předkládá podobnou teorii o dvou migračních vlnách. Druhou možností je samotné působení lokální polyploidizace z odlišného diploidního předka. Podobnou substrukturu můžeme nalézt u druhu *Knautia arvensis*, který zahrnuje diploidní rostliny rostoucích na hadcích a z nich vzniklé tetraploidní rostliny, které se rozšířily dál a křížily se s jinými liniemi tetraploidních rostlin stejného druhu (Kolář et al. 2012a). Z této oblasti však nebyli diploidi udáváni (Krauhlová & Štěpánková 1998) a ani já jsem žádné diploidy nenalezl, takže vznik této skupiny rostlin tímto způsobem nemohu podložit.

Poslední „skupinou“ je populace z Králického sněžníku (G135) představující zatím neurčenou populaci rostlin patřící do *G. pusillum* agg, dále populace z Krkonoš představující druh *G. sudeticum* podrobněji probírané v následující kapitole a jedna populace *G. valdepilosum* z německého pohoří Harz. Všechny tyto populace vykazují na základě klastrovací bayesovské analýzy hybridní charakter dvou největších rozlišených skupin (*G. valdepilosum*, fialová; *G. anisophyllon*, zelená, viz obrázek 35). Jedná se tak s největší pravděpodobností o pozůstatky kdysi spojitého areálu *G. anisophyllon*, který se v podhůří sudetských hor stýkal mezi obdobím vrcholného glaciálu a lesem uzavřené krajiny s *G. valdepilosum*, který tou dobou obsazoval volné niky směrem na sever (Ehrendorfer 1962). Oba dva druhy jsou totiž kompetičně poměrně slabé a světlomilné, ale zároveň vyžadují určitou míru vegetačního zápoje. *G. valdepilosum* se s otevřenou krajinou šířil, zatímco *G. anisophyllon* se vyskytoval i v podhůří a do vyšších poloh byl zatlačen až s nástupem lesa. V tomto vegetačně otevřeném okně se pak tyto druhy mohly potkat.

Z výsledků AFLP analýz není možné rozlišit, zda tyto populace jsou migranti z alpské nebo karpatské oblasti, pouze jedna rostlina z Alp (G175) sdílí stejný haplotyp (C) typický pouze pro *G. sudeticum* z Krkonoš, avšak u *G. valdepilosum* v Čechách nebyl nalezen žádný náznak hybridizace s *G. anisophyllon*, ke kterému by při výskytu mezi pohořími Alp a Krkonoš nejspíše docházelo. Na druhou stranu při lokalitě u Králického Sněžníku (G135, Kletno) spolu se studovanými rostlinami rostla i pěchava karpatská (*Sesleria tatrae*), což je endemit Karpat (Fabiszewski 1989). Podobné vztahy, předkládající afinitu sudetských pohoří spíše ke Karpatům můžeme najít u řady jiných druhů (*Rosa*, Fér et al. 2007; *Melampyrum*, Těšitel et al. 2009; *Hordelymus* Dvořáková et al. 2010). Zajímavým dílem do této skládačky by bylo zahrnutí nově objevené podivné populace z Velké kotliny (více v kap. 5.2.2), do molekulárních analýz, která by mohla představovat další fragment východo-západní cesty.

5.2 Taxonomická revize *G. sudeticum*

5.2.1 Vztahy Krkonoš a Slavkovského lesa

Druh *G. sudeticum* tradičně udávaný z Krkonoš a hadců ve více jak 200 km vzdáleném Slavkovském lese vykazuje mezi těmito arealami určité morfologické rozdíly (Štěpánková 2000). Proto jsem se rozhodl provést morfologické, cytologické a genetické srovnání těchto populací včetně srovnání s blízkce příbuznými a geograficky i ekologicky nejbližšími druhy *G. valdepilosum* a *G. anisophyllon*. Pracoval jsem pouze s fertilmími lodyhami, které jsou, na rozdíl od lodyh sterilních, pro určení zásadní (Štěpánková 2000). Plody jsem do statistického zpracování nezahrnul (pořídil jsem z každé populace mikrofotografie jednoho plodu), protože jsem neměl dostatečné množství

materiálu a sledované znaky jsou na plodech velmi malé a obtížně kvantifikovatelné. Přesto se mi podařilo nalézt znaky, které poměrně jasně odlišují druhy *G. valdepiosum* a *G. anisophyllon*. Podle diskriminačních analýz se jako nejlepší znaky jeví chlupatost (rostliny *G. anisophyllon* jsou spíše lysé) a poměr délky listu a internodia, především v horní části lodyhy (rostliny *G. valdepiosum* se v horní části květenství výrazně protahují). Při pasivním promítnutí druhu *G. sudeticum* nelze populace ze Slavkovského lesa odlišit od *G. valdepiosum*, zatímco populace z Krkonoš jsou v rozlišovacích znacích spíše intermediární. Jednoduché vizuální porovnání povrchu plodů naznačuje, že *G. valdepiosum* má plody pokryté kuželovitými papilkami, zatímco *G. anisophyllon* má plody spíše hladké nebo s polokulovitými papilkami. I zde lze pak vysledovat intermediární trend, kdy *G. sudeticum* z Krkonoš má plody méně papilnaté (Zahradníková 1985, Štěpánková 2000), k zásadnějším závěrům o použitelnosti tohoto znaku by však bylo nutné zpracování více plodů.

Hadec působí na morfologii rostlin, které jsou pak obvykle zakrslé (Brady et al. 2005) a srovnání populací z rozdílných stanovišť ztěžuje. Do mých analýz jsem však pro srovnání zahrnul populace jak z hadců, tak i mimo něj. Určující znak (délka internodia) by byl hadcem ovlivněn spíše negativně a posunoval by populace *G. „sudeticum“* ze Slavkovského lesa spíše k horským typům s kratšími internodii, to se však nestalo. I když jsou skupiny poměrně dobře odlišené, stále nelze vyloučit vliv nadmořské výšky, rostliny jsou de facto sbírané na taxonomicky korelovaném výškovém gradientu. Tento problém by vyřešil kultivační pokus se stejnými podmínkami pro všechny rostliny, který byl v plánu práce, ale nakonec jsem jej nezahrnul, protože tento rok pěstované rostliny téměř nekvetly.

Přestože jsem do morfologické analýzy zahrnul pouze 12 populací, její výsledky jsou podporovány genetickými daty, konkrétně analýzami AFLP profilů, které zahrnovaly 46 populací. AFLP data podporují především oddělení populací z Krkonoš a Slavkovského lesa. Populace z Krkonoš vykazují kombinaci skupiny *G. valdepiosum* a *G. anisophyllon*, zatímco ty ze Slavkovského lesa spadají do skupiny *G. valdepiosum*. Navíc je zajímavé, že každá ze dvou studovaných populací ze Slavkovského lesa spadá k jiné skupině v rámci *G. valdepiosum*. Populace G136 Vlček spadá do vlastní (třetí) skupiny ještě s populacemi G43 a G44 z Bavorska plus několika dalšími jedinci.

Při sekvenování cpDNA jsem sice u několika rostlin z obou arelů našel společný haplotyp. Z celkového hlediska, byl ovšem haplotypový profil populací naprosto jiný. Tyto údaje však nemohu v rozřešení vztahu populací v rámci *G. sudeticum* použít, neboť jednotlivé haplotypy vykazovaly spíše geografický než druhový pattern a většina z nich se vyskytovala napříč studovanými druhy, podobně jako při studiu rozhodníků (*Saxifraga*), kde byly haplotypy sdíleny napříč druhy občasnou hybridizací (Winkler et al. 2013). Populace v Krkonoších sdílí stejný haplotyp B s geograficky blízkými populacemi

G. valdepilosum, který je pro tuto oblast typický. To poukazuje na možný hybridní původ krkonošských rostlin. Dále se v Krkonoších u *G. sudeticum* ještě vyskytuje haplotyp C, který se fylogeneticky nachází mezi haplotypy A a B. U populací *G. „sudeticum“* ve Slavkovském lese (G136, G032) je pozoruhodná přítomnost dvou unikátních sedmi-nukleotidových insercí (v rámci haplotypu D).

Z hlediska haplotypové diverzity se v případě obou arel *G. sudeticum* tedy jedná o populace nebývale bohaté. Obdobné výsledky poskytují také AFLP markery. Ve srovnání genetické variability se zbytkem datasetu nejsou populace *G. sudeticum* v Krkonoších ani populace ze Slavkovského lesa ochuzené. Obdobná situace platí i pro zastoupení vzácných fragmentů (DW) v těchto populacích. Dokonce u populace v Kotelních jamách (G172) byl DW index jedním z pěti nejvyšších (0,69). Nejedná se tedy o populace, které by byly ohrožené z hlediska nízké genetické diverzity více, než jiné populace blízké příbuzných druhů. Vysoká zachovaná diverzita zřejmě odráží cizosprašnost a dlouhověkost těchto rostlin spojenou se schopností se vegetativně množit (Štěpánková 2000), takže za dobu izolace ještě nestihly dostatečně ochudit.

Při srovnání relativní velikosti genomu (Kolář et al. 2014) mají populace z Krkonoš v průměru o 3.8 % větší obsah jaderné DNA oproti těm ze Slavkovského lesa a *G. valdepilosum*. Přestože je tento rozdíl relativně malý na mezidruhové úrovni je velikost genomu poměrně stabilní (Loureiro et al. 2010) a je tedy vhodným znakem k odlišení těchto populací. Při současné analýze rostlin z obou arel (obr. 12) se mi tento rozdíl podařilo potvrdit a nejedná se tedy o artefakt způsobený přítomností některých sekundárních metabolitů.

Z hlediska stanovištních nároků jsou populace ze Slavkovského lesa totožné s těmi z Bavorska, které jsem zahrnul do morfologických analýz, a které byly zpracovávány také Noackem (1983). Ten došel na základě morfologických analýz k závěru, že se *G. sudeticum* v Bavorsku nevyskytuje a rostliny pracovníčně pojmenoval jako *G. valdepilosum* subsp. *pseudosudeticum*. Pro rostliny z Čech neměl dostatek materiálu. Tato diplomová práce jeho studii doplňuje a dochází ke stejnému závěru. Populace ze Slavkovského lesa považuji za druh *G. valdepilosum*. Rostliny ze dvou zmiňovaných arel z Krkonoš a Slavkovského lesa mají zcela rozdílnou historii vzniku.

Krkonošské populace jsou vzhledem k výsledkům AFLP, morfologie (intermediární postavení) a cpDNA (sdílení stejného haplotypu s *G. valdepilosum*) zřejmě nejsevernější enklávou *G. anisophyllon*, které však v minulosti zřejmě hybridizovalo s *G. valdepilosum*. Stalo se tak nejspíše počátkem holocénu při posunech vegetačních zón, předtím, než byly populace těchto dvou druhů zatlačeny a fragmentovány do vyšších poloh a do níže položených refugií přirozeného bezlesí. Na rozdíl od *G. valdepilosum* se v případě krkonošských populací jedná o lysé rostliny, občas na kraji listů

s k bázi směřujícími sklovitými chlupy. Vzácně jsem našel jeden atypicky draslavý exemplář v Čertově zahrádce. Najít morfologické znaky specifické pro tento druh je však obtížné, jelikož nalezené rostliny svým habitem pokrývali variabilitu obou svých možných rodičů, zvláště rostliny z Čertovy zahrádky (G171), viz výsledky diskriminační analýzy (kap.4.3.3), kdy skupiny rozdělila právě chlupatost a až s násobně menším příspěvkem poměr délky listu a internodia a počet plodných stopek (*G. sudeticum* z Krkonoš má internodia kratší a více plodných stopek). Dalším vhodným znakem by mohla být papilnatost plodů, kterou jsem v práci statisticky nezhodnotil, z vlastních pozorování však očekávám, že bude variabilita papilnatosti plodů podobná celkové variabilitě rostlin.

Z hlediska fylogeografie představuje taxon *G. sudeticum* unikátní příklad postglaciální fragmentace areálu a alopatrické hybridní diferenciace. Relativní velikosti genomu je větší než u obou předpokládaných rodičů a poukazuje na probíhající diferenciaci. Jednotlivé populace jsou zcela izolované od svých rodičů, a proto doporučuji zanechat původní taxonomickou úroveň druhu *G. sudeticum* TAUSCH, nicméně s novým vymezením pouze pro krkonošské populace. Podobným způsobem vznikl i další z krkonošských endemitů *Sorbus sudetica*, který je podle současných znalostí výsledkem křížení *S. aria* L. CRANTZ a *S. chamamespilus* (L.) CRANTZ (Kovanda 1965). Podobně jako u *G. sudeticum* se ani jeden z jeho rodičů v dané oblasti již nevyskytuje a daný endemit tak představuje cenný doklad dávných změn krajiny a s nimi spojených evolučních procesů utvářející mladou postglaciální flóru střední Evropy.

5.2.2 Revize lokality *G. sudeticum* ve Velké kotlině

Z Velké kotliny v NPR Praděd v Jeseníkách je historicky udávané *G. sudeticum* (Laus 1933, OLM) avšak v posledních desetiletích zde nalezen nebyl. Údaj z mapování v sedmdesátých letech (Bureš & Burešová 1983) byl později přehodnocen jako *G. pumilum* (Bureš L., ústní sdělení). Při revizi této lokality jsem našel zmiňované jedince *G. pumilum*, které vykazovaly některé typické znaky tohoto druhu (okraje listu s chrupavčitými chlupy směřujícími ke špičce listu) avšak plody byly spíše bradavičnaté jako u *G. valdepilosum* nebo *G. sudeticum*. Cytometrické analýzy podaly překvapivý výsledek, když s relativní velikosti genomu 0,738 by tyto rostliny měly představovat DNA hexaploidy. Mohlo by se tedy jednat buď o hexaploidní cytotyp *G. pumilum*, to se v ČR se nevyskytuje, nejbližší roste na Slovensku a v severním Rakousku (Ehrendorfer 1949, Šípošová 1987), nebo o hybrida *G. pumilum* s *G. sudeticum*, v úvahu by přicházelo i *G. valdepilosum*, ani jeden z posledně dvou jmenovaných druhů se však nikde v Jeseníkách nenachází. *G. pumilum* se vyskytuje nejbližší v Malé kotlině. Vzhledem k neobvyklé velikosti genomu jsem se rozhodl u těchto rostlin spočítat chromozomy z kořenových špiček naklíčených semen, k mému překvapení jsem ale napočítal pouze

cca 44 chromozomů, což odpovídá tetraploidní, nikoli hexaploidní konstituci. Tak velký rozdíl ve velikosti genomu nabízí několik možných vysvětlení. Pokud by se opravdu jednalo o hybrida dvou ze tří výše zmiňovaných druhů, mohlo dojít k fúzi chromozomů k zajištění životaschopnosti hybrida. Avšak chromozomy jsou u tohoto druhu poměrně malé a toto nelze z roztlakových preparátů opticky zjistit. Ačkoliv asymetrie mitózy a s tím spojené problémy s dělením buněk mohly zapříčinit tuto fúzi, druhy v tomto komplexu si jsou blízce příbuzné a chromozomy nejsou výrazně diferencované. Např. tetraploidní cytotyp *G. austriacum* vzniklý hybridizací diploidního *G. austriacum* a tetraploidního *G. anisophyllon* a přitom vykazuje volné párování chromozomů (tetrasomickou dědičností, (Ehrendorfer et al. 1996). Druhou možností je nárůst velikosti genomu při zachování chromozomového počtu např. nahromaděním „transpozonových repetitiv“ (Grover & Wendel 2010) potenciálně urychlený v důsledku hybridizace a následného „genomického šoku“. Tak velký rozdíl ve velikosti genomu, by však vyžadoval velmi dlouhou izolaci populace (minimálně několik ledových dob). Tuto hypotézu však nelze zcela vyloučit, jelikož na našem území byly i v období glaciálu dostatečně vlhká a chráněná stanoviště, umožňující přežít jak lesním fragmentům, tak i teplomilnější vegetaci (Jankovská & Pokorný 2008, Rejzková et al. 2008) a vzhledem k výsledkům chloroplastových analýz (vysoká variabilita haplotypů) lze předpokládat, že rostliny tohoto komplexu byly schopné přežít i v době maximálního zalednění na území ČR v periglaciální oblasti/podhůří sudetských pohoří.

Odpověď na možnosti vzniku těchto rostlin by mohlo poskytnout např. sekvenování cpDNA a ITS v porovnání s *G. pumilum* a ostatními možnými rodiči. V rámci této práce jsem však rostliny z této lokality ani *G. pumilum* nesekvenoval a v době nalezení těchto rostlin byly analýzy AFLP už hotové a z metodického hlediska nebylo možné tyto rostliny do analýz přidat. Úsek ITS je pro severní Evropu nedostatečně variabilní (Kolář unpubl.), avšak v tomto případě by mohl poskytnout dostatečné rozlišení.

6. Závěr/Shrnutí

Cílem této práce bylo taxonomické zhodnocení populací českého kriticky ohroženého druhu *G. sudeticum* a odhalení jeho vztahů k blízkce příbuzným nížinným a horským druhům. Dosavadní práce zabývající se vztahy jednotlivých cytotypů a druhů na území ČR (Štěpánková 1997, Krahulcová & Štěpánková 1998) či v širším kontextu (Krendl 1993, Šípošová 1987) byly založeny především na znalosti chorologie, ekologie a morfologie studovaných taxonů, avšak zhodnocení v kombinaci klasických a molekulárních metod doposud chybělo.

V souladu s pochybnostmi dosavadních prací (Krahulcová & Štěpánková 1998) se mi podařilo potvrdit rozdílný původ populací ze dvou izolovaných arelů tradičně zahrnovaných pod *G. sudeticum* v Krkonoších a Slavkovském lese. Při revizi historické lokality *G. sudeticum* v Jeseníkách ve Velké kotlině se mi zde tento druh nepodařilo najít. Nalezl jsem však rostliny se zcela unikátní kombinací morfologických znaků a neobvyklou velikostí genomu.

Přestože metoda AFLP poskytuje dobré rozlišení i na velmi nízké taxonomické úrovni, variabilita mezi studovanými druhy byla minimální (cca 3-7% podle stanovených skupin).

Ačkoli je zde jasná molekulární i morfologická tendence k odlišení horských a nížinných populací (*G. anisophyllon*, *G. valdepilosum*), sdílení chloroplastových haplotypů a malá differencovanost značí relativní mladost tohoto komplexu a častou hybridizaci, jež probíhala s opakovanými migracemi a kontrakcemi areálu v období čtvrtohor. Horské rostliny mají své blízkce příbuzné populace v podhůří a v období dob ledových zřejmě sestupovaly níže, kde se s nimi křížily. Všechny nížinné populace dnes přežívají v holocénních refugíích a vykazují genetické stopy naznačující, že se jedná o pozůstatky větších areálů.

7. Seznam použité literatury

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Walter P. (2002):** The genetic systems of mitochondria and plastids. In Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Walter P. (eds.), *Molecular Biology of the Cell*, s. 767–831. – Garland Science.
- Bennett M. D., Price H. J., & Johnston J. S. (2008):** Anthocyanin inhibits propidium iodide DNA fluorescence in *Euphorbia pulcherrima*: Implications for genome size variation and flow cytometry. – *Annals of Botany*, 101: 777–790.
- Bonin A., Bellemain E., Eidesen P. B., Pompanon F., Brochmann C., & Taberlet P. (2004):** How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. – *Molecular Ecology*, 13: 3261–3273.
- Bonin A., Ehrich D., & Manel S. (2007):** Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. – *Molecular Ecology*, 16: 3737–3758.
- Brady K. U., Kruckeberg A. R., & Bradshaw H. D. (2005):** Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. In *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, s. 243–266. – Annual Reviews, Palo Alto.
- Bremer B., Bremer K., Chase M. W., Fay M. F., Reveal J. L., Soltis D. E., Soltis P. S., Stevens P. F., Anderberg A. A., Moore M. J., Olmstead R. G., Rudall P. J., Sytsma K. J., Tank D. C., Wurdack K., Xiang J. Q.-Y., & Zmarzty S. (2009):** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. – *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161: 105–121.
- Bureš L. & Burešová Z. (1983):** Revised flora of Velka Kotlina Cirque, the Sudeten. Mountains, vol. 1 & 2. – *Preslia*, 55: 25-61 & 123-142.
- Cieslak E. & Szlag Z. (2010):** Genetic Diversity of *Galium Cracoviense*, *G. Oelandicum* and *G. Sudeticum* (rubiceae) - Narrow Endemic Species of Galium Sect. *Leptogalium* in Northeastern Europe. – *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 79: 269–275.
- Clement M., Posada D., & Crandall K. A. (2000):** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. – *Molecular Ecology*, 9: 1657–1659.
- Daneck H., Abrahám V., Fér T., & Marhold K. (2011):** Phylogeography of *Lonicera nigra* in Central Europe inferred from molecular and pollen evidence. – *Preslia*, 83: 237–257.
- Darriba D., Taboada G. L., Doallo R., & Posada D. (2012):** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. – *Nature Methods*, 9: 772–772.

- Després L., Gielly L., Redoutet B., & Taberlet P. (2003):** Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27: 185–196.
- Dobeš C., Lueckl A., Huelber 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. (2007a):** Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – *Nature Protocols*, 2: 2233–2244.
- Doležel J., Greilhuber J., & Suda J. (2007b):** Flow Cytometry with Plants: An Overview. In Doležel J., Greilhuber J., & Suda J. (eds.), *Flow Cytometry with Plant Cells*, s. 41–65. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Doležel J., Sgorbati S., & Lucretti S. (1992):** Comparison of 3 Dna Fluorochromes for Flow Cytometric Estimation of Nuclear-Dna Content in Plants. – *Physiologia Plantarum*, 85: 625–631.
- Dvořáková H., Fér T., & Marhold K. (2010):** Phylogeographic pattern of the European forest grass species *Hordelymus europaeus*: cpDNA evidence. – *Flora*, 205: 418–423.
- Ehlers J., Gibbard P. L., & Hughes P. D. (2011):** Quaternary glaciations – extent and chronology. A closer look. – Elsevier, Amsterdam.
- Ehrendorfer F. (1949):** Zur Phylogenie der Gattung *Galium* I. Polyploidie und geographisch-ökologische Einheiten in der Gruppe des *Galium pumillum* MURRAY (Sekt. *Leptogalium* LANGE sensu ROUY) im österreichischen Alpenraum. – *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 96: 109–138.
- Ehrendorfer F. (1956):** Struktur, Verbreitung und Geschichte der Sippen von *Lepto-Galium* in Bayern. – *Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft*, 31: 5–12.
- Ehrendorfer F. (1958):** Die geographische und ökologische Entfaltung des europäisch-alpinen Polyploidkomplexes *Galium anisophyllum* VILL. Seit Beginn des Quartars. – *Uppsala Universitets Årsskrift*, 6: 176–181.
- Ehrendorfer F. (1962):** Cytotaxonomische Betiräge zur Genese der mittel-europäischen Flora und Vegetation. – *Berichte der Deutschen Botanischen Gessellschaft*, 75: 137–152.
- Ehrendorfer F. (1965):** Dispersal mechanisms, genetic systems, and colonizing abilities in some flowering plant families. In Baker H.G. & Stebbins G.L. (eds.), *The genetics of colonizing species*, s. 331–352. – Academic Press, New Yourk, London.
- Ehrendorfer F. (1975):** Further taxonomic notes on Rubiaceae in Europe. – *Plant systematics and evolution*, 124: 173–178.

Ehrendorfer F. (1976): *Galium* L. In Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Valentine D.H., Walters S.M., & Webb D.A. (eds.), *Flore Europaea* 4, s. 14–36. – Cambridge University Press, Cambridge.

Ehrendorfer F., Samuel R., & Pinsker W. (1996): Enzyme analysis of genetic variation and relationships in diploid and polyploid taxa of *Galium* (Rubiaceae). – *Plant Systematics and Evolution*, 202: 121–135.

Ehrich D. (2006): AFLPDAT: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. – *Molecular Ecology Notes*, 6: 603–604.

Ekrťová E., Štech M., & Fér T. (2012): Pattern of genetic differentiation in *Gentiana pannonica* Scop.: did subalpine plants survive glacial events at low altitudes in Central Europe? – *Plant Systematics and Evolution*, 298: 1383–1397.

Elder J. F. & Turner B. J. (1995): Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. – *The Quarterly Review of Biology*, 70: 297–320.

Evanno G., Regnaut S., & Goudet J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. – *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620.

Excoffier L., Laval G., & Schneider S. (2005): Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. – *Evolutionary Bioinformatics*, 1: 47–50.

Fabiszewski J. (1989): Szata roślinna w sąsiedztwie jaskini [Plants in the vicinity of the cave]. In Jahn A., Kozłowski S., & Wiszniewska T. (eds.), *Jaskinia Niedźwiedzia w Kletnie* [Niedźwiedzia cave in Kletno], s. 287–305. – Wydawnictwo Polskiej Akademii Nauk, Wrocław.

Falush D., Stephens M., & Pritchard J. K. (2007): Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. – *Molecular Ecology Notes*, 7: 574–578.

Fér T. (2011): Dominantní (binární) molekulární markery a jejich využití v populační a systematické biologii (B. Mandák, F. Krahulec, & Z. Hroudová, Eds.). – *Zprávy České Botanické Společnosti*, 46: 61–78.

Fér T., Vašák P., Vojta J., & Marhold K. (2007): Out of the Alps or Carpathians? Origin of Central European populations of *Rosa pendulina*. – *Preslia*, 79: 367–376.

Fuertes Aguilar J., Rosselló J. A., & Nieto Feliner G. (1999): Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae). – *Molecular Ecology*, 8: 1341–1346.

Galbraith D. W., Harkins K. R., Maddox J. M., Ayres N. M., Sharma D. P., & Firoozabady E. (1983): Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. – *Science*, 220: 1049–1051.

Goodway K. M. (1957): The species problem in *Galium pumilum*. In Lousley J. E. (ed.), *Progress in the study of the British flora*, s. 116–118. – The Botanical Society of the British Isles, London.

- Grover C. E. & Wendel J. F. (2010):** Recent Insights into Mechanisms of Genome Size Change in Plants. – *Journal of Botany*, 2010: 1–8.
- Gulich V. (2012):** Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. – *Preslia*, 84: 631–645.
- Guo Y. P., Vogl C., Loo M. Van, & Ehrendorfer F. (2006):** Hybrid origin and differentiation of two tetraploid *Achillea* species in East Asia: molecular, morphological and ecogeographical evidence. – *Molecular Ecology*, 15: 133–144.
- Hammer Ø., Harper D. A. T., & Ryan P. D. (2001):** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. – *Palaeontologia Electronica*, 4: 9.
- Harris S. & Ingram R. (1991):** Chloroplast Dna and Biosystematics - the Effects of Intraspecific Diversity and Plastid Transmission. – *Taxon*, 40: 393–412.
- Hegarty M. J. & Hiscock S. J. (2008):** Genomic clues to the evolutionary success of review polyploid plants. – *Current Biology*. 18: 435–444.
- Jakobsson M. & Rosenberg N. A. (2007):** CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. – *Bioinformatics*, 23: 1801–1806.
- Jankovská V. & Pokorný P. (2008):** Forest vegetation of the last full-glacial period in the Western Carpathians (Slovakia and Czech Republic). – *Preslia* 80: 307–324.
- Jiao Y., Wickett N. J., Ayyampalayam S., Chanderbali A. S., Landherr L., Ralph P. E., Tomsho L. P., Hu Y., Liang H., Soltis P. S., Soltis D. E., Clifton S. W., Schlarbaum S. E., Schuster S. C., Ma H., Leebens-Mack J., & dePamphilis C. W. (2011):** Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. – *Nature*, 473: 97–U113.
- Kapuscinski J. (1995):** Dapi - a Dna-Specific Fluorescent-Probe. – *Biotechnic & Histochemistry*, 70: 220–233.
- Katoh K. & Standley D. M. (2013):** MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. – *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772–780.
- Knotek A. (2012):** Evoluční historie polyploidního komplexu *Galium pumilum* agg, Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, 33 s.
- Kolář F., Fér T., Štech M., Trávníček P., Dušková E., Schoenswetter P., & Suda J. (2012a):** Bringing Together Evolution on Serpentine and Polyploidy: Spatiotemporal History of the Diploid-Tetraploid Complex of *Knautia arvensis* (Dipsacaceae). – *PLoS One*, 7: e39988.
- Kolář F., Lučanová M., Koutecký P., Dortová M., Knotek A., & Suda J. (2014):** Spatio-ecological segregation of diploid and tetraploid cytotypes of *Galium valdepiosum* in central Europe. *Preslia*, 86: 155–178.

- Kolář F., Lučanová M., Těšitel J., Loureiro J., & Suda J. (2012b):** Glycerol-treated nuclear suspensions-an efficient preservation method for flow cytometric analysis of plant samples. – *Chromosome Research*, 20: 303–315.
- Kolář F., Lučanová M., Vít P., Urfus T., Chrtěk J., Fér 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: 1095–1108.
- Kovanda M. (1965):** Taxonomie jeřábu sudetského [*Sorbus sudetica* (Tausch) Hedl.] a otázka jeho endemismu. – *Československá ochrana přírody*, 2: 47–62.
- Kovanda M. (1992):** *Corthusa* L. - kruhatka. In Slavík B. & Hejný S. (eds.), *Květena České republiky* 3, s. 254–255. – Academia, Praha.
- Krahulcová A. & Rotreklová O. (2010):** Use of flow cytometry in research on apomictic plants. – *Preslia*, 82: 23–39.
- Krahulcová A. & Štěpánková J. (1998):** Serpentine and polyploid differentiation within *Galium pumilum* agg. (Rubiaceae) in Eastern C Europe. – *Folia Geobotanica*, 33: 87–102.
- Krak K. (2011):** Využití sekvence DNA při studiu evoluce rostlin (B. Mandák, F. Krahulec, & Z. Hroudová, Eds.). – *Zprávy České Botanické Společnosti*, 46: 95–126.
- Krendl F. (1993):** Chromosomenzahlen und geographische Verbreitung in der Gattung *Galium* (Sect. *Leptogalium* – Rubiaceae). – *Biosystematics and ecology series*, 4:51–112.
- Kron P., Kwok A., & Husband B. C. (2014):** Flow cytometric analysis of pollen grains collected from individual bees provides information about pollen load composition and foraging behaviour. – *Annals of Botany*, 113: 191–197.
- Kucowa I. (1962):** Gatunki rodzaju *Galium* L. sekcji *Leptogalium* LANGE z Polski i ziem ościennych – Species of the genus *Galium* L. of the section *Leptogalium* LANGE found in Poland and neighbouring territories. – *Fragmenta floristica et geobotanica*, 8: 414–442.
- Kucowa I. & Madalski J. (1964):** Nowe stanowiska *Galium valdepilosum* HEINR. BRAUN w Polsce (New localities of *Galium valdepilosum* HEINR. BRAUN in Poland). – *Fragmenta floristica et geobotanica*, 10: 3–8.
- 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: 3–21.
- Mabberley D. J. (2008):** *Mabberley's plant-book: A portable dictionary of plants, their classification and uses.* 3rd ed., completely rev. – Cambridge University Press, Cambridge.

- Matzk F., Meister A., & Schubert I. (2000):** An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. – *the Plant Journal*, 21: 97–108.
- McCauley D. E., Sundby A. K., Bailey M. F., & Welch M. E. (2007):** Inheritance of chloroplast DNA is not strictly maternal in *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae): evidence from experimental crosses and natural populations. – *American Journal of Botany*, 94: 1333–1337.
- Meudt H. M. & Clarke A. C. (2007):** Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. – *Trends in Plant Science*, 12: 106–117.
- Mueller U. G. & Wolfenbarger L. L. (1999):** AFLP genotyping and fingerprinting. – *Trends in Ecology & Evolution*, 14: 389–394.
- Natali A., Manen J., & Ehrendorfer F. (1995):** Phylogeny of the Rubiaceae Rubioideae, in Particular the Tribe Rubieae - Evidence from a Noncoding Chloroplast Dna-Sequence. – *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82: 428–439.
- Neale D. B., Marshall K. A., & Sederoff R. R. (1989):** Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens* D. Don Endl. – *PNAS*, 86: 9347–9349.
- Nei M. (1987):** *Molecular Evolutionary Genetics*. – Columbia University Press, New York.
- Noack M. (1983):** Untersuchungen an ausseralpinen Sippen von Galium Sektion Lepto-Galium in Bayern, Diplomová práce, Universität München
- Novák F. A. (1960):** Fylogeneze serpentinových typů. – *Preslia*, 32: 1–8.
- Oksanen J., Blanchet F. G., Kindt R., Legendre P., Minchin P. R., O'Hara R. B., Simpson G. L., Solymos P., Stevens M. H. H., & Wagner H. (2013):** *vegan: community ecology package*. Version 2.0-10.
- Otto F. (1990):** DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. – *Methods in cell biology*, 33: 105–110.
- Paun O., Schoenswetter P., Winkler M., & Tribsch A. (2008):** Historical divergence vs. contemporary gene flow: evolutionary history of the calcicole *Ranunculus alpestris* group (Ranunculaceae) in the European Alps and the Carpathians. – *Molecular Ecology*, 17: 4263–4275.
- Paun O., Stuessy T. F., & Horandl E. (2006):** The role of hybridization, polyploidization and glaciation in the origin and evolution of the apomictic *Ranunculus cassubicus* complex. – *New Phytologist*, 171: 223–236.
- Piotrowicz M. (1958):** Caryological studies in some species of the genus *Galium* L. – *Acta Biologica Cracoviensia*, 1: 159–159.

Pritchard J. K., Stephens M., & Donnelly P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. – *Genetics*, 155: 945–959.

Qiu Y.-L., Li L., Wang B., Xue J.-Y., Hendry T. A., Li R.-Q., Brown J. W., Liu Y., Hudson G. T., & Chen Z.-D. (2010): Angiosperm phylogeny inferred from sequences of four mitochondrial genes. – *Journal of Systematics and Evolution*, 48: 391–425.

R Core Team. (2013): R: A language and environment for statistical computing. – R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>. – R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Reisch C. (2008): Glacial history of *Saxifraga paniculata* (Saxifragaceae): molecular biogeography of a disjunct arctic-alpine species from Europe and North America. – *Botanical Journal of the Linnean Society*, 93: 385–398.

Rejzková E., Fér T., Vojta J., & Marhold K. (2008): Phylogeography of the forest herb *Carex pilosa* (Cyperaceae). – *Botanical Journal of the Linnean Society*, 158: 115–130.

Robbrecht E. & Manen J. F. (2006): The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and supertree construction based on *rbcl*, *rps16*, *trnL-trnF* and *atpB-rbcL* data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae. – *Systematics and Geography of Plants*, 76: 85–146.

Ronikier M., Cieslak E., & Korbecka G. (2008a): High genetic differentiation in the alpine plant *Campanula alpina* Jacq. (Campanulaceae): evidence for glacial survival in several Carpathian regions and long-term isolation between the Carpathians and the Alps. – *Molecular Ecology*, 17: 1763–1775.

Ronikier M., Costa A., Aguilar J. F., Feliner G. N., Kuepfer P., & Mirek Z. (2008b): Phylogeography of *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. (Ranunculaceae): chloroplast DNA reveals two evolutionary lineages across central Europe and Scandinavia. – *Journal of Biogeography*, 35: 1650–1664.

Ronquist F. & Huelsenbeck J. P. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. – *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.

Rosenberg N. A. (2004): DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. – *Molecular Ecology Notes*, 4: 137–138.

Rybka V., Rybková R., & Pohlová R. (2004): Rostliny ve svitu evropských hvězd. Rostliny soustavy Natura 2000 v České republice. – *Sagittaria*, Olomouc, Praha.

Samuel R., Pinsker W., & Ehrendorfer F. (1990): Allozyme Polymorphism in Diploid and Polyploid Populations of *Galium*. – *Heredity*, 65: 369–378.

- Sanger F. (1988):** Sequences, Sequences, and Sequences. – Annual Review of Biochemistry, 57: 1–28.
- Schlueter P. M. & Harris S. A. (2006):** Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. – Molecular Ecology Notes, 6: 569–572.
- Schneider C. A., Rasband W. S., & Eliceiri K. W. (2012):** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. – Nature Methods, 9: 671–675.
- Schönswetter P., Suda J., Popp M., Weiss-Schneeweiss H., & Brochmann C. (2007):** Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (Juncaceae) inferred from AFLP fingerprints, cpDNA sequences, nuclear DNA content and chromosome numbers. – Molecular Phylogenetics and Evolution, 42: 92–103.
- Schönswetter P. & Tribsch A. (2005):** Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). – Taxon, 54: 725–732.
- Schönswetter P., Tribsch A., & Niklfeld H. (2004a):** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) suggests old and recent immigration into the Alps by the arctic-alpine annual *Comastoma tenellum* (Gentianaceae). – Journal of Biogeography, 31: 1673–1681.
- Schönswetter P., Tribsch A., Stehlik I., & Niklfeld H. (2004b):** Glacial history of high alpine *Ranunculus glacialis* (Ranunculaceae) in the European Alps in a comparative phylogeographical context. – Biological Journal of the Linnean Society, 81: 183–195.
- Shapiro H. M. (2005):** Practical Flow Cytometry. – John Wiley & Sons, New York.
- Shaw J., Lickey E. B., Beck J. T., Farmer S. B., Liu W. S., 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.
- Skálinska M., Piotrowicz M., & Sokołowska-Kulczycka A. (1961):** Further additions to chromosome numbers of Polish Angiosperms. – Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 30: 463–489.
- Soltis D. E., Soltis P. S., Pires J. C., Kovarik A., Tate J. A., & Mavrodiev E. (2004):** Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. – Biological Journal of the Linnean Society, 82: 485–501.
- Soltis D. E., Soltis P. S., & Zanis M. J. (2002):** Phylogeny of seed plants based on evidence from eight genes. – American Journal of Botany, 89: 1670–1681.

- Soza V. L. & Olmstead R. G. (2010a):** Evolution of Breeding Systems and Fruits in New World Galium and Relatives (rubiceae). – American Journal of Botany, 97: 1630–1646.
- Soza V. L. & Olmstead R. G. (2010b):** Molecular systematics of tribe Rubieae (Rubiaceae): Evolution of major clades, development of leaf-like whorls, and biogeography. – Taxon, 59: 755–771.
- Sterner R. (1944):** Galium pumilum Murr. i nordvästra Europa. – Meddelanden Goteborgs Botaniska Trädgård, 15: 187–223.
- Suda J. (2011):** Průtoková cytometrie a její využití v botanice (B. Mandák, F. Krahulec, & Z. Hroudová, Eds.). – Zprávy České Botanické Společnosti, 46: 21–42.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P., & Krahulec F. (2006):** Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. – Taxon, 55: 447–450.
- Suda J. & Trávníček P. (2006):** Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry - New prospects for plant research. – Cytom. Part A, 69A: 273–280.
- Suh Y., Thien L., Reeve H., & Zimmer E. (1993):** Molecular Evolution and Phylogenetic Implications of Internal Transcribed Spacer Sequences of Ribosomal Dna in Winteraceae. – American Journal of Botany, 80: 1042–1055.
- Sutton B. C. S., Flanagan D. J., Gawley J. R., Newton C. H., Lester D. T., & El-Kassaby Y. A. (1991):** Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in Picea and composition of hybrids from introgression zones. – Theoretical and Applied Genetics, 82: 242–248.
- Šípošová H. (1987):** Taxonomicko-chorologické štúdium Galium pumilum MURRAY s.l. na Slovensku (A taxonomic-chorological study of the Galium pumilum MURRAY s.l. in Slovakia). – Acta Botanica Slovaca, Academiae scientiarum slovacae, Série A, 10: 97–169.
- Španiel S., Marhold K., Fílová B., & Zozomová-Lihová J. (2011):** Genetic and morphological variation in the diploid-polyploid Alyssum montanum in Central Europe: taxonomic and evolutionary considerations. – Plant Systematics and Evolution, 294: 1–25.
- Štěpánková J. (1997):** The effect of serpentine on morphological variation in the Galium pumilum group (Rubiaceae). – Thaiszia, 7: 29–40.
- Štěpánková J. (2000):** Galium L. - svízel. In Slavík B. (ed.), Květena České republiky 6, s. 122–156. – Academia, Praha.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., & Bouvet J. (1991):** Universal Primers for Amplification of 3 Noncoding Regions of Chloroplast Dna. – Plant Molecular Biology, 17: 1105–1109.

- Tájek P. (2003):** Hadcové výchozy ve Slavkovském lese z pohledu ostrovní biogeografie, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha, s. 17.
- Tausch I. F. (1835):** Bemerkungen über Galium und einige verwandte Gattungen. – Flora Regensburg, 18: 337–351.
- Těšitel J., Malinová T., Štech M., & Herbstová M. (2009):** Variation in the *Melampyrum sylvaticum* group in the Carpathian and Hercynian region: two lineages with different evolutionary histories. – Preslia, 81: 1–22.
- Tribsch A., Schönswetter P., & Stuessy T. F. (2002):** *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the Ice Age in the European Alps. – American Journal of Botany, 89: 2024–2033.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Vandelee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., & Zabeau M. (1995):** Aflp - a New Technique for Dna-Fingerprinting. – Nucleic Acids Research, 23: 4407–4414.
- Watson J. V. (1991):** Introduction to Flow Cytometry. – Cambridge University Press, Cambridge.
- Winkler M., Tribsch A., Schneeweiss G. M., Brodbeck S., Gugerli F., Holderegger R., & Schoenswetter P. (2013):** Strong nuclear differentiation contrasts with widespread sharing of plastid DNA haplotypes across taxa in European purple saxifrages (*Saxifraga* section *Porphyrium* subsection *Oppositifoliae*). – Botanical Journal of the Linnean Society, 173: 622–636.
- Wissemann V. (2007):** Plant evolution by means of hybridization. – Systematics And Biodiversity, 5: 243–253.
- Wörz A. (1995):** Über die Arten der Sektion *Leptogalium* LANGE sensu Ehrendorfer der Gattung *Galium* (Rubiaceae) auf der Schwäbischen Alb. – Gesellschaft für Naturkunde in Württemberg, 151: 439–450.
- Zahradníková K. (1985):** *Galium anisophyllum* VILL. In Bertová L. (ed.), Flóra Slovenska IV/2, s. 48–50. – VEDA, Bratislava.
- Zhang L. B., Simmons M. P., Kocyan A., & Renner S. S. (2006):** Phylogeny of the Cucurbitales based on DNA sequences of nine loci from three genomes: Implications for morphological and sexual system evolution. – Molecular Phylogenetics and Evolution, 39: 305–322.

8. Přílohy

Celá práce i s přílohami a primárními daty je také na přiloženém CD.

8.1. Laboratorní protokoly

8.1.1 Izolace DNA (Qiagen DNeasy 96 Plant kit) s modifikacemi

- 0) Pozor na pořadí zkumavek, před přepipetováním si pečlivě popište nové zkumavky!
- 1) Do zkumavek si navážíme si 40 (50) mg vysušeného rostlinného materiálu, přidáme jednu karbido-wolframovou kuličku, zkumavky zavřeme.
- 2) V mlýnku drtíme 3 minuty, frekvence 27 Hz (TissueLyser; Qiagen); opakujeme, pokud materiál není rozdrcen
- 3) Do zkumavek přidáme 400 μ l pufru AP1, 1 μ l RNase A, 1 μ l Reagent DX (ve všech krocích můžeme pipetovat ze žlábků multipipetou); zavřeme zkumavky
- 4) Zvortexujeme a přidáme 130 μ l pufru AP2; opět zvortexujeme a necháme stéci po stěnách na dno zkumavky
- 5) Inkubujeme 10 minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 6) Centrujeme 5 minut při 6000 ot./min.
- 7) Přepipetujeme supernatant do nových zkumavek (cca 400 μ l)
- 8) Přidáme 600 μ l pufru AP3
- 9) Promícháme 15 sekund v ruce; přepipetovat/přelít vše do kolonek + S blok a přelepit fólií
- 10) Centrifugujeme 4 minuty při 6000 ot./min.; vylejeme proteklou frakci (předehejte si potřebné množství AE pufru!)
- 11) Přidáme do kolonek 800 μ l pufru AW naředěný ethanolem
- 12) Centrifugujeme 15 minut při 6000 ot./min.
- 13) Vylejeme proteklou frakci (krok 11-13 můžeme zopakovat)
- 14) Kolonky přemístíme do Elution zkumavek
- 15) Přidáme 50 μ l AE pufru
- 16) Inkubujeme při pokojové teplotě 30-45 minut
- 17) Centrujeme 2 minuty při 6000 ot./min. (kroky 15-17 lze zopakovat pro získání druhé eluce)

8.1.2 Přečišťování kitem GENE AID

- 0) Pozor na pořadí zkumavek, před přepipetováním si pečlivě popište nové zkumavky!
- 1) Přidáme *BF Buffer* k PCR produktu v poměru 5:1; protřepeme a stočíme
- 2) Nachystáme si kolonky do zkumavek; předehejeme si sterilní destilovanou vodu na 65 °C
- 3) Přeneseme si roztok z PCR zkumavek do kolonek a stočíme na max. otáčky (příruční centrifuga Eppendorf Mini Spin) po dobu 30 s
- 4) Slejeme proteklou frakci
- 5) Nanese na kolonku 600 µl *Wash Bufferu* (s přidaným ethanolem), necháme stát 1 minutu
- 6) Stočíme na max po dobu 30 s
- 7) Slejeme proteklou frakci a opět stočíme na max po dobu 3 minut. Necháme kolonky chvíli otevřené, abychom se zbavili možných výparů ethanolu
- 8) Předáme kolonky do nových 1,5 ml zkumavek
- 9) Přidáme 15 µl sterilní destilované vody ohřáté na 60 °C a necháme stát 10-15 minut.
- 10) Stočíme po dobu 2 minut na max otáčky. V proteklé frakci se nachází náš PCR produkt.

8.1.3 Přesražování octanem sodným

- 0) Používáte ethanol, pozor na smazání popisů vzorků.
- 1) Ke každému PCR produktu přidáme dispenzorem 2 µl 3M octanu sodného a 50 µl 96 % ethanolu.
- 2) Zkumavky uzavřeme, protřepeme, stočíme při 40 RCF po dobu 1 minuty a necháme stát při pokojové teplotě 10-15 minut (ne víc)
- 3) Stočíme 30 minut při 3700 rpm
- 4) Zkumavky otevřeme (plato), opatrně překloupíme na buničinu a takto i s buničinou vložíme do vyvážené centrifugy a stočíme při 40 RCF; DNA je sražená na dně zkumavek a nejde vidět, ethanol vytekl ven.
- 5) Dispenzorem přidáme 100 µl 70 % ethanolu. Centrifugujeme 10 minut při 3700 rpm.
- 6) Slejeme jako v kroku 4) a stočíme při 40 rcf
- 7) Dosušíme na termobloku při 65 °C po dobu 5 minut.
- 8) Peletku DNA rozpustíme v 20 µl sterilní destilované vody (nerozpuštěnou peletku skladovat při -20 °C bez obav i několik týdnů).

8.1.4 Přečištění a příprava na sekvenátor AFLP vzorků

- 0) Používáte ethanol, pozor na smazání popisů vzorků.
- 1) Ke 4 μ l smíchaného PCR produktu přidáme dispenzorem 1 μ l 3M octanu sodného a 25 μ l 96 % ethanolu.
- 2) Zkumavky uzavřeme a necháme inkubovat 20 minut při -20 °C.
- 3) Stočíme 30 minut při 3700 rpm a 4 °C.
- 4) Zkumavky otevřeme (plato), opatrně překloupíme na buničinu a takto i s buničinou vložíme do vyvážené centrifugy a stočíme při 40 RCF; DNA je sražená na dně zkumavek a nejde vidět, ethanol vytekl ven.
- 5) Dispenzorem přidáme 100 μ l 70 % ethanolu. Centrifugujeme 5 minut při 3700 rpm.
- 6) Slejeme jako v kroku 4) a stočíme při 40 rcf
- 7) Dосуšíme na termobloku při 65 °C po dobu 10 minut.
- 8) Peletku DNA rozpustíme v 10 μ l deinizovaného formamidu a 0,25 standardu GeneScan-LIZ-600
- 9) Vzorky protřepeme 3 min na termomixéru při 95 °C a 300 rpm; přeneseme na fragmentační analýzu.

8.2 Výsledky analýz

8.2.1 Pearsonův korelační koeficient

	Pearson	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10	v11	v12	v13	v14	v15	v16	v17	v18	v19	v20
v1	leaf_le		0.68	0.50	0.36	0.32	0.19	0.24	0.17	0.29	0.21	0.05	0.24	0.04	0.09	0.04	0.12	0.08	0.20	0.06	0.00
v2	leaf_wi	0.68		0.30	0.31	0.36	0.14	0.25	0.16	0.10	0.17	0.01	-	-	0.00	0.08	0.00	-	0.04	0.05	0.08
v3	inter_le	0.50	0.30		-0.17	0.42	-0.34	0.33	0.08	0.17	0.18	0.07	0.17	0.80	0.51	0.52	0.33	0.47	0.43	0.45	0.17
v4	midle_leaf	0.36	0.31	-		0.48	0.82	0.25	0.32	0.11	0.02	0.12	0.03	-	0.40	0.56	-	0.37	0.26	0.32	0.21
v5	midle_inter	0.32	0.36	0.42	0.48		0.31	0.72	0.45	0.01	0.15	0.04	0.11	0.35	0.42	0.31	0.08	0.01	0.11	0.02	0.01
v6	up_leaf	0.19	0.14	0.34	0.82	0.31		0.19	0.38	0.06	0.04	0.06	0.07	-	0.48	0.65	0.27	0.46	0.30	0.42	0.21
v7	up_inter	0.24	0.25	0.33	0.25	0.72	0.19		0.41	0.02	0.16	0.08	0.03	0.28	0.39	0.63	0.10	0.18	0.04	0.14	0.07
v8	stem	0.17	0.16	0.08	0.32	0.45	0.38	0.41		0.04	0.02	0.05	0.01	0.02	0.13	0.02	0.13	0.20	0.11	0.18	0.04
v9	nb_infl_branch	0.29	0.10	0.17	0.11	0.01	0.06	-0.02	0.04		0.24	0.10	0.22	0.02	0.14	0.06	0.01	0.14	0.07	0.09	0.00
v10	bract_infl	0.21	0.17	0.18	0.02	0.15	0.04	0.16	0.02	0.24		0.75	0.03	0.10	0.11	0.09	0.02	0.07	0.06	0.02	0.13
v11	bract_part	0.05	0.01	0.07	-0.12	0.04	-0.06	0.08	0.05	0.10	0.75		0.07	0.05	0.09	0.12	0.04	0.02	0.07	0.03	0.15
v12	leaf_lg_wi	0.24	-0.51	0.17	0.03	0.11	0.07	-0.03	0.01	0.22	0.03	0.07		0.06	0.11	0.08	0.14	0.11	0.17	0.02	0.09
v13	leaf_inter	-0.04	-0.01	0.80	-0.40	0.35	-0.50	0.28	0.02	0.02	0.10	0.05	0.06		0.68	0.61	0.27	0.46	0.31	0.46	0.18
v14	leaf_inter_mid	-0.09	0.00	0.51	-0.56	0.42	-0.48	0.39	0.13	0.14	0.11	0.09	0.11	0.68		0.69	0.15	0.34	0.16	0.30	0.28
v15	leaf_inter_up	0.04	0.08	0.52	-0.45	0.31	-0.65	0.63	0.02	0.06	0.09	0.12	0.08	0.61	0.69		0.29	0.51	0.27	0.44	0.22
v16	hair_stem_down	0.12	0.00	0.33	-0.23	0.08	-0.27	0.10	0.13	0.01	0.02	0.04	0.14	0.27	0.15	0.29		0.80	0.79	0.58	0.30
v17	hair_leaf_down	0.08	-0.01	0.47	-0.37	0.01	-0.46	0.18	0.20	0.14	0.07	0.02	0.11	0.46	0.34	0.51	0.80		0.67	0.74	0.28
v18	hair_stem_mid	0.20	0.04	0.43	-0.26	0.11	-0.30	0.04	0.11	0.07	0.06	0.07	0.17	0.31	0.16	0.27	0.79	0.67		0.54	0.45
v19	hair_leaf_mid	0.06	0.05	0.45	-0.32	0.02	-0.42	0.14	0.18	0.09	0.02	0.03	0.02	0.46	0.30	0.44	0.58	0.74	0.54		0.17
v20	hair_stem_up	0.00	-0.08	0.17	-0.21	0.01	-0.21	0.07	0.04	0.00	0.13	0.15	0.09	0.18	0.28	0.22	0.30	0.28	0.45	0.17	
v21	hair_leaf_up	0.06	-0.02	0.39	-0.22	0.03	-0.25	0.10	0.18	0.04	0.09	0.01	0.05	0.37	0.24	0.28	0.52	0.51	0.56	0.64	0.26

8.2.2 Spearmanův korelační koeficient

	Spearman	v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10	v11	v12	v13	v14	v15	v16	v17	v18	v19	v20
v1	leaf_le		0.69	0.51	0.34	0.31	0.13	0.23	0.14	0.24	0.23	0.09	0.22	-	0.01	0.07	0.09	0.09	0.20	0.09	-
v2	leaf_wi	0.69		0.37	0.29	0.36	0.09	0.25	0.15	0.07	0.19	0.02	0.49	0.01	0.10	0.13	0.08	0.01	0.01	0.09	0.06
v3	inter_le	0.51	0.37		0.15	0.47	0.36	0.36	0.10	0.12	0.17	0.09	0.10	0.83	0.63	0.59	0.22	0.45	0.40	0.44	0.20
v4	midle_leaf	0.34	0.29	0.15		0.48	0.82	0.24	0.35	0.14	0.02	0.10	0.04	0.39	0.48	0.44	0.18	0.32	0.26	0.32	0.17
v5	midle_inter	0.31	0.36	0.47	0.48		0.30	0.69	0.45	0.06	0.15	0.04	0.11	0.34	0.49	0.30	0.11	0.00	0.13	0.05	0.02
v6	up_leaf	0.13	0.09	0.36	0.82	0.30		0.16	0.38	0.10	0.05	0.05	0.07	0.51	0.50	0.64	0.20	0.45	0.31	0.42	0.21
v7	up_inter	0.23	0.25	0.36	0.24	0.69	0.16		0.38	0.02	0.17	0.11	0.05	0.27	0.43	0.60	0.04	0.16	0.03	0.15	0.06
v8	stem	0.14	0.15	0.10	0.35	0.45	0.38	0.38		0.12	0.05	0.04	0.03	0.01	0.10	0.01	0.13	0.21	0.12	0.18	0.04
v9	nb_infl_branch	0.24	0.07	0.12	0.14	0.06	0.10	0.02	0.12		0.30	0.11	0.18	0.01	0.04	0.03	0.01	0.15	0.01	0.13	0.01
v10	bract_infl	0.23	0.19	0.17	0.02	0.15	0.05	0.17	0.05	0.30		0.77	0.02	0.08	0.15	0.10	0.03	0.11	0.01	0.05	0.09
v11	bract_part	0.09	0.02	0.09	0.10	0.04	0.05	0.11	0.04	0.11	0.77		0.06	0.06	0.08	0.12	0.05	0.00	0.07	0.01	0.06
v12	leaf_lg_wi	0.22	0.49	0.10	0.04	0.11	0.07	0.05	0.03	0.18	0.02	0.06		0.03	0.14	0.11	0.21	0.11	0.19	0.06	0.07
v13	leaf_inter	0.01	0.01	0.83	0.39	0.34	0.51	0.27	0.01	0.01	0.08	0.06	0.03		0.75	0.64	0.20	0.48	0.34	0.48	0.22
v14	leaf_inter_mid	0.01	0.10	0.63	0.48	0.49	0.50	0.43	0.10	0.04	0.15	0.08	0.14	0.75		0.76	0.07	0.37	0.14	0.40	0.14
v15	leaf_inter_up	0.07	0.13	0.59	0.44	0.30	0.64	0.60	0.01	0.03	0.10	0.12	0.11	0.64	0.76		0.18	0.51	0.28	0.47	0.19
v16	hair_stem_down	0.09	0.08	0.22	0.18	0.11	0.20	0.04	0.13	0.01	0.03	0.05	0.21	0.20	0.07	0.18		0.66	0.73	0.44	0.30
v17	hair_leaf_down	0.09	0.01	0.45	0.32	0.00	0.45	0.16	0.21	0.15	0.11	0.00	0.11	0.48	0.37	0.51	0.66		0.62	0.77	0.26
v18	hair_stem_mid	0.20	0.01	0.40	0.26	0.13	0.31	0.03	0.12	0.01	0.01	0.07	0.19	0.34	0.14	0.28	0.73	0.62		0.51	0.43
v19	hair_leaf_mid	0.09	0.09	0.44	0.32	0.05	0.42	0.15	0.18	0.13	0.05	0.01	0.06	0.48	0.40	0.47	0.44	0.77	0.51		0.19
v20	hair_stem_up	0.02	0.06	0.20	0.17	0.02	0.21	0.06	0.04	0.01	0.09	0.06	0.07	0.22	0.14	0.19	0.30	0.26	0.43	0.19	
v21	hair_leaf_up	0.07	0.02	0.39	0.23	0.05	0.30	0.13	0.16	0.06	0.01	0.01	0.06	0.40	0.27	0.32	0.46	0.50	0.56	0.59	0.35

8.2.3 Deskriptivní statistika pro jednotlivé skupiny

Statistiky znaků jsou rozděleny pro skupiny, *G. sudeticum* z Krkonoš; *G. valdepilosum* (dříve *G. sudeticum*) ze Slavkovského lesa, *G. valdepilosum* a *G. anisophyllon*; SD = směrodatná odchylka; znaky byly měřeny v milimetrech.

Číslo znaku	Znak	Zkratka znaku
v1	Délka listu v části lodyhy pod květenstvím	leaf_le
v2	Šířka listu v části lodyhy pod květenstvím	leaf_wi
v3	Délka internodia nad měřeným listem	inter_le
v4	Délka listu ve střední části květenství	midle_leaf
v5	Délka navazujícího internodia ve střední části květenství	midle_inter
v6	Délka listu v horní části květenství	up_leaf
v7	Délka navazujícího internodia ve horní části květenství	up_inter
v8	Délka plodní stopky	stem
v9	Počet větví květenství	nb_infl_branch
v10	Počet plodných stopek ve větvi květenství	bract_infl
v11	Počet plodných stopek vycházejících z jednoho místa	bract_part
v12	Poměr délky a šířky listu (1/2)	leaf_lg_wi
v13	Poměr délky internodia a listu (3/1)	leaf_inter
v14	Poměr délky internodia a listu ve střední části lodyhy (5/4)	leaf_inter_mid
v15	Poměr délky internodia a listu v horní části lodyhy (7/6)	leaf_inter_up
v16	Chlupatost stonku v dolní části lodyhy	hair_stem_down
v17	Chlupatost listu v dolní části lodyhy	hair_leaf_down
v18	Chlupatost stonku ve střední části lodyhy	hair_stem_mid
v19	Chlupatost listu ve střední části lodyhy	hair_leaf_mid
v20	Chlupatost stonku v horní části lodyhy	hair_stem_up
v21	Chlupatost listu v horní části lodyhy	hair_leaf_up

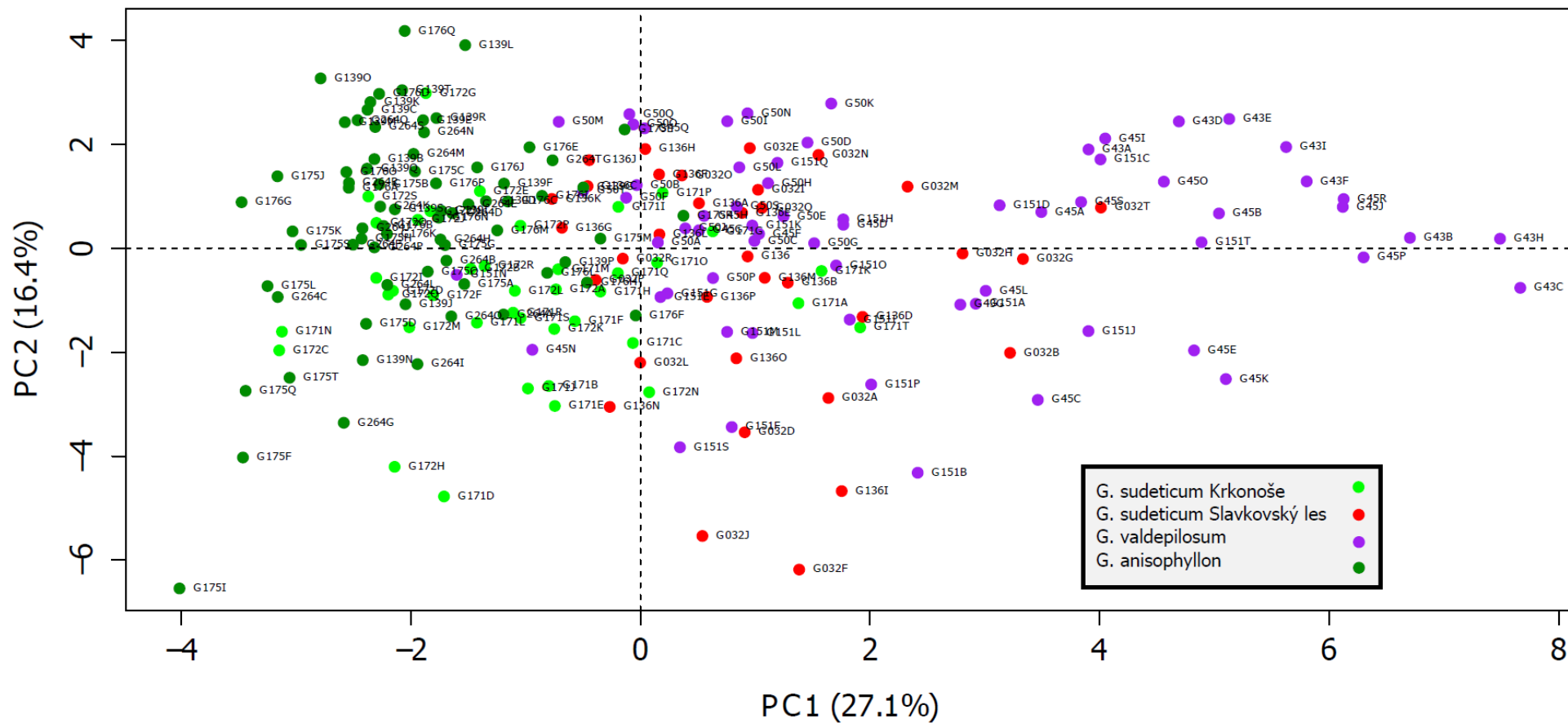
Znak	Skupina	Mean	SD	Min	5%	25%	Median	75%	95%	Max
leaf_le	G. sud, Krko.	10.71	2.14	6.53	7.76	9.37	10.38	12.22	14.05	14.88
leaf_le	G. vald, Slav	9.93	2.35	5.17	6.15	8.50	9.86	11.29	13.73	15.05
leaf_le	G. vald	11.06	2.56	4.45	7.07	9.62	11.25	12.55	14.68	18.35
leaf_le	G. aniso	9.51	2.47	4.55	5.83	8.14	9.20	10.33	14.36	16.88
leaf_wi	G. sud, Krko.	1.44	0.36	0.87	1.07	1.23	1.39	1.54	2.10	2.59
leaf_wi	G. vald, Slav	1.29	0.32	0.77	0.82	1.06	1.25	1.52	1.82	1.85
leaf_wi	G. vald	1.28	0.32	0.71	0.82	1.06	1.23	1.44	1.86	2.10
leaf_wi	G. aniso	1.06	0.29	0.44	0.67	0.83	1.06	1.21	1.61	1.84
inter_le	G. sud, Krko.	25.34	6.20	13.84	15.15	21.53	25.40	30.43	35.44	35.59
inter_le	G. vald, Slav	31.26	8.61	11.41	18.94	26.46	30.37	35.96	45.37	47.99
inter_le	G. vald	33.67	11.41	11.90	15.11	26.98	32.40	39.29	54.60	66.73
inter_le	G. aniso	17.47	6.22	6.59	9.24	13.13	16.85	21.27	26.78	39.47
midle_leaf	G. sud, Krko.	5.95	1.94	2.45	3.22	4.90	5.59	7.00	10.32	10.78
midle_leaf	G. vald, Slav	5.28	1.92	2.13	2.31	4.00	4.97	6.88	8.11	9.29
midle_leaf	G. vald	4.43	1.79	1.88	2.22	3.26	3.79	5.07	8.02	10.40
midle_leaf	G. aniso	6.52	2.37	2.82	3.63	4.83	6.17	7.69	10.87	15.96
midle_inter	G. sud, Krko.	14.45	3.73	5.30	9.04	11.75	14.23	18.09	20.02	21.52

Znak	Skupina	Mean	SD	Min	5%	25%	Median	75%	95%	Max
midle_inter	G. vald, Slav	16.17	5.83	6.88	8.45	12.23	15.24	20.47	27.33	28.01
midle_inter	G. vald	12.36	4.71	4.25	6.82	8.73	11.56	14.38	22.07	25.30
midle_inter	G. aniso	10.92	3.65	4.42	6.19	8.46	10.33	12.75	17.20	22.87
up_leaf	G. sud, Krko.	3.04	1.00	1.38	1.57	2.41	2.94	3.32	4.85	5.92
up_leaf	G. vald, Slav	2.40	0.75	1.36	1.43	1.78	2.32	2.78	3.62	4.19
up_leaf	G. vald	2.14	0.71	0.95	1.37	1.77	1.95	2.40	3.55	4.83
up_leaf	G. aniso	3.80	1.32	1.50	2.09	2.87	3.74	4.36	5.86	9.05
up_inter	G. sud, Krko.	5.98	1.80	2.88	3.70	4.59	5.78	7.49	8.82	9.85
up_inter	G. vald, Slav	7.03	3.35	2.59	3.55	4.85	5.96	8.25	14.28	16.78
up_inter	G. vald	6.24	2.83	2.05	3.09	4.35	5.59	7.10	11.35	18.93
up_inter	G. aniso	4.88	1.58	2.08	2.58	3.63	4.72	6.22	7.46	8.76
stem	G. sud, Krko.	2.44	0.56	1.40	1.52	1.93	2.58	2.80	3.19	3.63
stem	G. vald, Slav	2.39	0.80	1.28	1.39	1.79	2.26	2.65	4.05	4.25
stem	G. vald	2.01	0.58	0.77	1.17	1.57	1.92	2.51	2.95	3.26
stem	G. aniso	2.26	0.58	1.14	1.32	1.81	2.29	2.57	3.30	4.08
nb_infl_branch	G. sud, Krko.	2.93	0.22	2.11	2.56	2.89	3.00	3.00	3.12	3.44
nb_infl_branch	G. vald, Slav	2.32	0.63	1.00	1.14	2.00	2.53	2.97	3.00	3.11
nb_infl_branch	G. vald	2.61	0.47	1.00	1.91	2.33	2.75	3.00	3.00	3.33
nb_infl_branch	G. aniso	2.67	0.45	1.25	2.00	2.33	3.00	3.00	3.00	3.89
bract_infl	G. sud, Krko.	10.89	3.00	3.11	6.61	8.95	10.84	12.67	14.79	18.44
bract_infl	G. vald, Slav	8.60	2.78	4.25	5.10	6.76	7.78	10.72	13.33	14.89
bract_infl	G. vald	9.94	3.19	4.89	5.76	8.00	9.00	11.22	17.29	19.00
bract_infl	G. aniso	9.48	3.23	4.22	5.96	7.25	8.75	10.33	16.44	20.22
bract_part	G. sud, Krko.	3.75	1.06	2.00	2.42	3.08	3.56	4.17	5.48	7.11
bract_part	G. vald, Slav	3.04	0.94	1.89	2.00	2.15	3.00	3.75	4.76	5.44
bract_part	G. vald	3.85	1.07	2.00	2.58	3.00	3.78	4.44	5.55	8.00
bract_part	G. aniso	3.60	1.17	2.00	2.18	2.75	3.44	4.00	5.96	7.44
leaf_lg_wi	G. sud, Krko.	7.59	1.24	4.93	5.59	6.88	7.70	8.33	9.62	9.66
leaf_lg_wi	G. vald, Slav	7.88	1.53	5.12	5.50	6.85	7.86	8.49	10.46	11.92
leaf_lg_wi	G. vald	8.83	1.81	4.77	5.81	7.60	8.94	9.87	11.46	15.08
leaf_lg_wi	G. aniso	9.15	1.68	5.92	6.39	7.87	9.07	10.40	11.61	13.31
leaf_inter	G. sud, Krko.	2.42	0.63	1.24	1.56	1.97	2.33	2.92	3.35	4.22
leaf_inter	G. vald, Slav	3.23	0.98	1.94	2.19	2.62	2.95	3.55	4.76	7.03
leaf_inter	G. vald	3.07	0.89	1.44	1.92	2.42	3.00	3.58	4.44	6.48
leaf_inter	G. aniso	1.87	0.62	0.87	1.08	1.43	1.87	2.14	2.90	4.73
leaf_inter_mid	G. sud, Krko.	2.59	0.84	1.33	1.50	1.91	2.56	3.14	3.75	4.87
leaf_inter_mid	G. vald, Slav	3.30	1.37	1.60	1.98	2.34	3.12	3.64	6.09	8.21
leaf_inter_mid	G. vald	2.95	1.03	1.75	1.91	2.24	2.63	3.45	4.92	7.13
leaf_inter_mid	G. aniso	1.74	0.45	0.86	1.08	1.44	1.68	1.98	2.54	3.02
leaf_inter_up	G. sud, Krko.	2.13	0.82	0.79	1.06	1.46	2.09	2.54	3.78	4.35
leaf_inter_up	G. vald, Slav	2.94	1.00	1.35	1.75	2.29	2.79	3.44	4.29	6.42
leaf_inter_up	G. vald	3.06	1.37	1.51	1.67	1.97	2.76	3.69	5.34	7.76
leaf_inter_up	G. aniso	1.35	0.44	0.55	0.81	1.05	1.25	1.61	2.04	3.08
hair_stem_down	G. sud, Krko.	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Znak	Skupina	Mean	SD	Min	5%	25%	Median	75%	95%	Max
hair_stem_down	G. vald, Slav	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
hair_stem_down	G. vald	2.11	1.03	1.00	1.00	1.00	2.33	3.00	3.67	4.00
hair_stem_down	G. aniso	1.22	0.37	1.00	1.00	1.00	1.00	1.33	2.00	2.33
hair_leaf_down	G. sud, Krko.	1.16	0.31	1.00	1.00	1.00	1.00	1.08	2.00	2.00
hair_leaf_down	G. vald, Slav	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
hair_leaf_down	G. vald	2.50	0.64	1.00	1.67	2.00	2.33	3.00	3.60	3.67
hair_leaf_down	G. aniso	1.40	0.43	1.00	1.00	1.00	1.33	1.67	2.00	2.33
hair_stem_mid	G. sud, Krko.	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
hair_stem_mid	G. vald, Slav	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
hair_stem_mid	G. vald	1.41	0.52	1.00	1.00	1.00	1.00	1.67	2.33	3.00
hair_stem_mid	G. aniso	1.01	0.05	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.33
hair_leaf_mid	G. sud, Krko.	1.06	0.20	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.35	2.00
hair_leaf_mid	G. vald, Slav	1.61	0.36	1.00	1.00	1.33	1.67	2.00	2.00	2.00
hair_leaf_mid	G. vald	1.76	0.52	1.00	1.00	1.33	1.67	2.00	2.67	3.00
hair_leaf_mid	G. aniso	1.07	0.20	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.67	2.00
hair_stem_up	G. sud, Krko.	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
hair_stem_up	G. vald, Slav	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
hair_stem_up	G. vald	1.05	0.17	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.33	2.00
hair_stem_up	G. aniso	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
hair_leaf_up	G. sud, Krko.	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
hair_leaf_up	G. vald, Slav	1.13	0.27	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.67	2.00
hair_leaf_up	G. vald	1.21	0.33	1.00	1.00	1.00	1.00	1.33	2.00	2.00
hair_leaf_up	G. aniso	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

8.2.4: PCA analýza morfológických dat

PCA analýza 21 morfológických znakov na 12 studovaných populáciách z okruhu *Galium pusillum* agg.



8.2.5: Seznam použitých lokalit/ List of sampled localities

Tabulka je psaná anglicky, protože je připravovaná pro pro plánovaný anglicky psaný článek, zároveň tím usnadním excerpci lokalit pro budoucí badatele, kteří neumí česky. Rozšířená tabulka s počty analyzovaných jedinců pro jednotlivé analýzy a výskytem haplotypů na přiloženém CD:

Explanations: An. = used analyses, C = chloroplast, A = AFLP, G = genome size, M = morphology; G-size = relative genome size; Pl. = ploidy; Cn. = country; Coll. = collector; Abbrev. Of collectors: AK = A. Knotek, CP = C. Pachschwöll, EZ = E. Záveská, FK = F. Kolář, GMS = G. M. Schneeweiss, JCH = J. Chrtek, JS = J. Suda, KKa = K. Kabátová, KKm = K. Kmecová, LF = L. Flašková, MD = M. Dortová, MH = M. Hanzl, ML = M. Lučanová, PV = P. Vít, TF = T. Fér, TU = T. Urfus, ZD = Z. Dočkalová; Coordinates in WGS 1984.

Species	No	Name	An.	G-size	Pl.	Date	Cn.	Locality	Coll.	GPS Coordinates
G. anisophyllon	G004	Offensee	C		6x	20.6.2009	AT	Ebensee, along tourist path Offensee - Wildensee, 1 km s. from the southern margin of Offensee lake, 9.5 km s. of Ebensee , scree, open vegetation, limestone	FK	47 43 55 N 13 50 51 E
G. anisophyllon	G120	Belianská jaskyňa	C, A, G	0.525	4x	14.5.2011	SK	Tatranská kotlina, rocks next to the entrance to Belianská jaskyňa cave, shady limestone rocks, limestone	FK	49 13 44.5 N 20 18 42.1 E
G. anisophyllon	G121	Demanovská Dolina	C, A, G	0.538	4x	14.5.2011	SK	Demanovská Dolina, rocks above a road approx. 50 m N from the entrance to Demanoévská jaskyňa slobody cave, shady limestone rocks and screes, limestone	FK	48 59 59.1 N 19 34 58.2 E
G. anisophyllon	G122	Bešeňová	C, A, G	0.536	4x	14.5.2011	SK	Bešeňová, travertine rock 1 km NNE from the church in the village, limestone rocks, limestone	FK	49 06 26.1 N 19 26 04.8 E
G. anisophyllon	G123	Šútovo	C		2x	14.5.2011	SK	Šútovo, small limestone hill at the NE end of the village, open limestone grassland, limestone	FK	49 09 09.1 N 19 05 04.6 E
G. anisophyllon	G124	Socovce	C		2x	14.5.2011	SK	Socovce, rocks on the W side of Stráž hill (539 m), 0.5 km WSW of the church in the village, open limestone grassland and screes, limestone	FK	48 57 00.3 N 18 51 33.6 E
G. anisophyllon	G125	Strečno	C		2x	15.5.2011	SK	Strečno, limestone rocks above museum building below the castle, shady limestone rocks and screes, limestone	FK	49 10 30 N 18 51 42 E
G. anisophyllon	G128	Horná Poruba	G	0.523	4x	7.6.2011	SK	Horná Poruba, about 3 km SW, ,	FK	48 55 17.9 N 18 19 37.3 E
G. anisophyllon	G130	Strážov	C, A		4x	8.6.2011	SK	Strážov, top of the hill, about 8 km SE from Dubnica nad Váhom, ,	FK	48 57 19.4 N 18 27 53.5 E
G. anisophyllon	G138	Tlštá	C, G	0.262	2x	24.6.2011	SK	Blatnica, rocks at top of Tlská mountain, 2.5 km E of the village, limestone rocks,	FK	48 56 02.7 N 18 58 14.5 E

Species	No	Name	An.	G-size	Pl.	Date	Cn.	Locality	Coll.	GPS Coordinates
G. anisophyllon	G139	Králova studňa	C, A, G, M	0.521	4x	24.6.2011	SK	Harmanec, limestone rocks 500 m N of the hotel Králova Studňa approx 10 km NNW of Harmanec, supalpine grasslands, limestone	FK	48 52 53.4 N 19 02 24.4 E
G. anisophyllon	G175	Obertauern	C, A, G, M	0.519	4x	18.7.2011	AT	Obertauern, pastures 1.2 km E of the pass, small rocks in an alpine grassland, silicate	FK, TF	47 15 01.3 N 13 34 29.4 E
G. anisophyllon	G176	Sölkpass	C, A, G, M	0.522	4x	19.7.2011	AT	Sankt Nikolai im Sölkatal, in Sölkpass mountain pass, small rocks in an alpine grassland, silicate	FK, TF	47 15 57.2 N 14 04 49.7 E
G. anisophyllon	G177	Grüner See	C, G	0.521	4x	19.7.2011	AT	Grüner See, slopes N of the lake, small rocks in an alpine grassland,	FK, TF	47 32 39.0 N 15 03 29.6 E
G. anisophyllon	G178	Stoderzirken	C, G	0.507	4x	19.7.2011	AT	Grössming, around the Stoderzirken viuepoint and parking site, rocks and alpine grassland, limestone	FK, TF	47 27 33.2 N 13 48 53.0 E
G. anisophyllon	G210	Malá studená dolina	C, A, G	0.518	4x	22.7.2011	SK	Vysoké Tatry Mts.: Malá Studená dolina valley, 5.7 km NNW of the village of Starý Smokovec (Vysoké Tatry), alpine grassland,	JCH, ZD	49 11 12.1 N 20 12 07.3 E
G. anisophyllon	G263	Velická dolina	G	0.505	4x	30.7.2012	SK	Vysoké Tatry, open grassland in Velická Dolina, along the path from Sliezsky dom to Dlhé pleso, open grassland,	FK	49 09 34.9 N 20 09 26.9 E
G. anisophyllon	G264	Osobitá	C, A, G, M	0.526	4x	31.7.2012	SK	Zuberec, Zverovka, limestone rocks at the top of Osobitá mountain, limestone rocks,	FK	49 15 33.3 N 19 43 18.6 E
G. anisophyllon	G265	Vyšné kopské sadlo	G	0.51	4x	1.8.2012	SK	Ždiar, the ridge of Belianske Tatry Mts., along the path from Široké sadlo to Vyšné kopské sadlo, open grasland and gravelly soil,	FK	49 14 10.6 N 20 12 59.5 E
G. anisophyllon	G285	Velka Stozka	G	0.513	4x	22.6.2013	SK	Velka Stozka, 5 km NW of Muráň, rock in open pineforest,	AK	48 46 40.48 N 19 56 50.04 E
G. anisophyllon	G287	Hrdzavá	G	0.508	4x	22.6.2013	SK	Hrdzavá valley, 1 km NW of Muráň, rock in open pineforest,	FK	48 45 30.57 N 19 58 46.66 E
G. anisophyllon	G302	Mt. Baldo	G	0.498	4x	8.8.2013	I	top of Mt Baldo, rocky grassland, limestone	AK, KKa, FH	45 46 52.32 N 10 51 59.62 E
G. austriacum	G119	Stratená	C, A, G		4x	13.5.2011	SK	Stratená, limestone rocks in Hnilec canyon 1 km WNW of the church in the village, shady limestone rocks, limestone	FK	48 52 30.3 N 20 19 31.2 E
G. austriacum	G140	Sittendorf	C, A		4x	25.6.2011	AT	Sittendorf bei Wien, about 0.5 km to the N, torn slope in the road bank,	TF, SP, LF	48 5 11.94 N 16 10 5.7 E
G. austriacum	G141	Giesshubl	C, A		4x	25.6.2011	AT	Giesshubl, about 200 m W of Höhenstrasse, road bank in forest,	TF, SP, LF	48 6 7.02 N 16 13 11.46 E
G. austriacum	G142	Pernitz	C, A		2x+4x	25.6.2011	AT	Pernitz, about 5 km NE, near the cross of Waxeneck and Schärfthal, open pine/spruce forest, serpentine	TF, SP, LF	47 55 33.54 N 15 59 23.04 E
G. austriacum	G143	Losenheim	C, A		4x	26.6.2011	AT	Losenheim, 3.5 km W of Puchberg am Schneeberg, rocks under Pinus nigra,	TF, SP, LF	47 47 20.94 N 15 50 47.76 E
G. austriacum	G146	Bernstein	C, A		4x	26.6.2011	AT	Bernstein, 3 km N, E side of the road, serpentine pine forest, serpentine	TF, SP, LF	47 26 4.98 N 16 16 26.64 E
G. austriacum	G147	Badacsony	C		2x	26.6.2011	HU	Badacsony, top of the hill Kisfaludy, scree, scree forest,	TF, SP, LF	46 48 22.8 N 17 29 42.06 E
G. austriacum	G148	Veszprém	C		2x	26.6.2011	HU	Veszprém, about 0.5 km E of road E66, small forets meadow, flat open forest,	TF, SP, LF	47 5 36.96 N 17 53 8.76 E

Species	No	Name	An.	G-size	Pl.	Date	Cn.	Locality	Coll.	GPS Coordinates
<i>G. baldense</i>	G223	Passo Corna Piana	C		2x	20.7.2011	I	Bergamo: Prealpi Bergamasche Centrali: southern slope of Corna Piana, near Passo Corna Piana, South-exposed, stony alpine meadows and snowbeds on dolomite, together with <i>Carex firma</i> , <i>Petrocallis pyrenaica</i> , <i>Phyteuma orbiculare</i> , <i>Salix retusa</i> and others,	CP, GMS	45 56 29 N 09 48 41 E
<i>G. cracoviense</i>	G038	Kusieta	C		2x	21.7.2010	PL	Kusieta near Czenstochowa, limestone rocks at the southern end of the village, cracks in limestone rocks, limestone	FK	50 45 59.5 N 19 16 16.5 E
<i>G. cracoviense</i>	G039	Olsztyn	C		2x	21.7.2010	PL	Olsztyn near Czenstochowa, rocks around the ruins of the castle, cracks in limestone rocks, limestone	FK	50 44 58.9 N 19 16 32.7 E
<i>G. fleurotii</i>	G030	Cheddar	C		8x	5.12.2008	UK	Cheddar, southern edge of the Cheddar Gorge, 2 km ENE of the town, limestone rock crevices, limestone	FK	51 17 4.49 N 2 45 25.34 W
<i>G. fleurotii</i>	G280	Saint Adrien	C		4x	18.10.2012	F	Rouen, calcareous slope 500 m N of St Adrien at the turn to Belbeuf, S of the city, open calcareous slope, limestone	ML	49 22 24.6 N 01 07 33.1 E
<i>G. megalospermum</i>	G011	Col D'Izoard	C		2x	22.7.2009	FR	Col D'Izoard pass, scree, limestone	FK	44 49 12.5 N 6 44 10 E
<i>G. normanii</i>	G203	Vega	C		4x	12.8.2011	N	Vega island, Gladstad, Holandsosen limestone outcrops 4.7 km NW of the town, crevices in limestone flatland,	FK	65 42 06.7 N 11 52 45.0 E
<i>G. normanii</i>	G255	Hveragerði	C		4x	4.7.2012	IS	Hveragerði, along the path to the thermal brook, N of the town, open gravely soil in tundra, vulcanite	FK	64 03 25.5 N 21 13 07.0 W
<i>G. normanii</i>	G256	Eskifjörður	C		4x	7.7.2012	IS	Eskifjörður, along the road to Neskaupstaður, close to the pass, open gravely soil, vulcanite	FK	65 03 51.8 N 13 54 57.4 W
<i>G. normanii</i>	G257	Akureyri	C		4x	9.7.2012	IS	Akureyri, gravely river bed next to the bridge of the road 715, W of the town, open gravely soil, vulcanite	FK	65 41 11.5 N 18 25 20.7 W
<i>G. normanii</i>	G258	Hvammstangi	C		4x	10.7.2012	IS	Hvammstangi, along the road 711, N of the town, open gravely soil, vulcanite	FK	65 34 57.3 N 20 55 25.5 W
<i>G. normanii</i>	G259	Laugarvatn	C		4x	11.7.2012	IS	Laugarvatn, along the side road turning from the road 37, E of the town, open pces in shrubby tundra, vulcanite	FK	64 15 35.7 N 20 28 15.6 W
<i>G. oleandicum</i>	G077	Resmo	C		2x	17.8.2010	S	Öland, Resmo, alvar next to the road Resmo - Stenåsa, 2 km E of the vllage, alvar (slightly wet parts), limestone	FK, TF, EZ	56 20 54.03 N 16 28 53.19 E
<i>G. oleandicum</i>	G078	Solberga	C		2x	17.8.2010	S	Öland, Solberga, alvar next to the road Solberga - Degerhamn, 1 km E of the village, alvar (slightly wet parts), limestone	FK, TF, EZ	56 20 54.0 N 16 28 53.2 E
<i>G. oleandicum</i>	G079	Kastlösa	C		2x	17.8.2010	S	Öland, Kastlösa, alvar next to the road to Skärlov, ca 3 km ESE of the village, alvar (slightly wet parts), limestone	FK, TF, EZ	56 26 45.51 N 16 27 35.05 E
<i>G. pumilum</i>	G262	Malá Kotlina			8x	19.7.2012	CZ	Malá Morávka, grasslands in the bottom of Malá kotelní jáma glacial cirque, open grassland	FK, AK, TU	50 2 19.261 N 17 12 43.528 E
<i>G. pumilum</i> x <i>G. sudeticum</i>	G296	Velka Kotlina	G	0.738	4x	27.6.2013	CZ	NE part of Velka Kotlina glacial cirque, also at 50°03'26,3"N17°13'13,5"E; 50°02'42,6"N17°12'53,7"E, grassland with <i>nardus stricta</i> ,	AK, Kkm	50 03 34.4 N 017 14 29.2 E
<i>G. pusillum</i> agg.	G135	Kletno	C, A, G	0.5	4x	15.6.2011	PL	Kletno by Stronie Slaskie, limestone rocks opposite (N of) Jaskynia Niedzwiedzia, limestone scree, rocks, limestone	FK, JCH	50 14 19.0 N 16 50 33.2 E
<i>G. saxatile</i>	G066	Løjt Kirkeby	C		4x	11.8.2010	DK	Løjt Kirkeby, top of a sand dune at the N end of the village, open patches in pasture on the sand dune, acidic sand	FK, TF, EZ	55 05 53.07 N 09 27 18.73 E

Species	No	Name	An.	G-size	Pl.	Date	Cn.	Locality	Coll.	GPS Coordinates
G. saxatile	G137	Vlček	C		4x	21.6.2011	CZ	Prameny, Vlčí Hřbet hill 1.9 km S of the village, open pine forest on serpentine,	FK	50 01 55.2 N 12 44 33.0 E
G. saxatile	G235	Bridge of Cally	C		4x	14.10.2011	UK	5 km N Bridge of Cally, W side of the road, ,	FK, TF	56 41 26.0 N 3 24 31.3 W
G. sternerii	G067	Glatved	C		4x	12.8.2010	DK	Glatved, overgrown pasture next to the farm Niemandsgård, on the margin of a chalk quarry, 3 km S of Glatved, open parts in an old pasture, chalk	FK, TF, EZ	56 17 57.10 N 10 50 41.10 E
G. sternerii	G068	Mønsted	C		4x	13.8.2010	DK	Mønsted, old chalk pit Kalkgruber, 2 km NW of the village, old chalk pit , chalk	FK, TF, EZ	56 27 19.26 N 09 09 57.96 E
G. sternerii	G069	Hov Daas	C		4x	13.8.2010	DK	Sennels, open wet pasture on a steep north-facing slope of Hov Daas hill, 3 km NNE of the church in the village , open wet pasture (to fen) on a steep north-facing slope , chalk	FK, TF, EZ	56 59 34.11 N 08 48 50.62 E
G. sternerii	G073	Skindbjerg	C		4x	14.8.2010	DK	Skindbjerg, open patches in a pasture in a small valley 1 km WNW of the village, open patches in a pasture, chalk	FK, TF, EZ	56 52 49.63 N 09 54 14.99 E
G. sternerii	G087	Vestby	C		4x	24.8.2010	N	Vestby, road bank 1 km NE of Hvidsten, 4.5 km W of Vestby, road bank,	JS	59 36 23.6 N 10 40 01.4 E
G. sternerii	G180	Alva	C		4x	22.7.2011	UK	Alva, slopes of a gorge 1 km N of the town, grassy and mossy rocks,	FK, TU, PV	56 09 43.1 N 3 47 51.2 W
G. sternerii	G183	Inchnadamph	C		2x	23.7.2011	UK	Inchnadamph, rocky pastures 800 m E of the village, limestone rock crevices, limestone	FK, TU, PV	58 09 04.4 N 4 57 34.9 W
G. sternerii	G186	Ben Griam More	C		4x	24.7.2011	UK	NW slopes of Ben Griam More hill, open exposed gravel and sparse grassland,	FK, TU, PV	58 19 23.1 N 4 02 54.4 W
G. sternerii	G188	Binevenagh	C		2x	26.7.2011	IRL	Limavady, NW slopes of Binevenagh table mountain, mossy scree, basalt	FK, TU, PV	55 07 29.4 N 6 55 04.7 W
G. sternerii	G190	Ben Bulben	C		2x	28.7.2011	IRL	Cashelgarran, slopes at the NW tip of Ben Bulben mountain, rock crevices, vulcanite	FK, TU, PV	54 21 51.6 N 8 29 17.2 W
G. sternerii	G191	Slievecarran	C		2x	28.7.2011	IRL	Cappaghmore, limestone flatlands Slievecarran, 2.5 km SW of the village, crevices and shallow soil on limestone flatlands, limestone	FK, TU, PV	53 04 56.5 N 9 00 01.8 W
G. sternerii	G194	Bethesda	C		2x	31.7.2011	UK	Bethesda, rocks in an entrance to a glacial cirque on the slopes of Carned Llewelyn massif, 5 km SE of the town, rock crevices, basalt	FK, TU, PV	53 09 11.0 N 3 59 45.6 W
G. sternerii	G195	Priestcliffe	C		4x	31.7.2011	UK	Priestcliffe, pastures at the N facing slopes of small valley, 1.2 km NE of the village, pastures and scattered limestone rocks, limestone	FK, TU, PV	53 15 12.3 N 1 46 51.2 W
G. sternerii	G196	Malham	C		4x	1.8.2011	UK	Malham, slopes above NE corner of Malham Tarn lake, pastures and scattered limestone rocks, limestone	FK, TU, PV	54 05 55.5 N 2 09 27.2 W
G. sternerii	G200	St Marys Loch	C		4x	2.8.2011	UK	Cappercleuch, N shore of St Marys Loch, 1 km E of the village, gravelly slope above road,	FK, TU, PV	55 29 50.3 N 3 11 10.8 W
G. sternerii	G206	Oslo Ekeberg	C		4x	17.8.2011	N	Oslo, Ekeberg hill in the city, open mixed forest margin,	FK	59 53 59.9 N 10 46 03.9 E
G. sternerii	G207	Ås	C		4x	17.8.2011	N	Ås, wood next to a farm 2.8 km S of the town, margin of a small woodland,	FK	59 38 14.5 N 10 47 35.5 E
G. sternerii	G209	Blåvland	C		4x	19.8.2011	DK	Blåvland, sand dunes around the lighthouse W of the town, depressions between coastal dunes,	FK	55 33 32.4 N 8 05 00.7 E
G. sudeticum	G171	Čertova zahrádka	C, A, G, M	0.524, 0.529	4x	13.7.2011	CZ	Pec pod Sněžkou, Čertova zahrádka, 3,6 km N of the town, rocks and scree, erlan	FK, AK, MH	50 43 37.8 N 15 43 27.3 E

Species	No	Name	An.	G-size	Pl.	Date	Cn.	Locality	Coll.	GPS Coordinates
G. sudeticum	G172	Kotel	C, A, G, M	0.534	4x	13.7.2011	CZ	Horní Mísečky, ridge between Malá and Velká Kotelná jáma glacial cirque, subalpine grassland, erlan	FK, AK, MH	50 45 08.7 N 15 31 56.7 E
G. sudeticum	G212	Rudník	C, A, G	0.528	4x	13.8.2011	CZ	Pec pod Sněžkou, Rudník, 3.8 km N of the town, scree, erlan	AK, MH	50 43 50.2 N 15 43 53.1 E
G. sudeticum	G260	Mały Śnieżny Kocioł	C, A, G	0.515	4x	18.7.2012	PL	Szklarska Poręba, basaltic outcrop in Mały Śnieżny Kocioł glacial cirque, basaltic rocks and talus slope, basalt	FK, AK, TU	50 46 58.4 N 15 33 24.7 E
G. sudeticum	G261	Wielki Śnieżny Kocioł	C, G	0.537	4x	18.7.2012	PL	Szklarska Poręba, upper edge of the Wielki Śnieżny Kocioł glacial cirque in Kryształowy żleb, open gravelly soil, silicate	FK, AK, TU	50 46 45.8 N 15 33 27.3 E
G. suecicum	G074	Vattlösa	C		2x	15.8.2010	S	Vattlösa, road bank S of the farm Hultet, road bank and overgrown pasture, granite	FK, TF, EZ	58 28 49.80 N 13 35 35.76 E
G. suecicum	G075	Lerdala	C		2x	15.8.2010	S	Lerdala, spruce forest clearing, 500 m E of the village, 500 m N of Stålkvamesjön lake, spruce forest clearing, sediment / granite	FK, TF, EZ	58 28 33.91 N 13 43 11.67 E
G. suecicum	G076	Stora Rundröjan	C		2x	16.8.2010	S	Hällekis, road bank in an open pine forest next to Stora Rundröjan settlement, 5 km NE of the town, road bank in an open pine forest, granite	FK, TF, EZ	58 39 19.36 N 13 30 01.84 E
G. suecicum	G080	Sjöamellan	C		2x	18.8.2010	S	Växjö, bank of a forest road 300 m SSE of the settlement Sjöamellan, road bank in an open pine forest, granite	FK, TF, EZ	56 47 33.30 N 14 53 02.74 E
G. suecicum	G081	Älmeboda	C		2x	18.8.2010	S	Älmeboda, around the bellfry next to the ruins of the old church in the village, open grassland and road bank, granite	FK, TF, EZ	56 35 40.92 N 15 15 13.62 E
G. suecicum	G082	Mosjölund	C		2x	18.8.2010	S	Tingsryd, bank of the road 100 m NW of Mosjölund settlement, 3 km NE of the town, road bank in an open pine forest, granite	FK, TF, EZ	56 32 18.36 N 15 00 46.89 E
G. suecicum	G084	Sodra Hoka	C		2x	18.8.2010	S	Sodra Hoka, open patches in the pasture 100 m N of the village, open patches in the pasture, gneiss	FK, TF, EZ	56 15 33.52 N 14 50 43.87 E
G. suecicum	G085	Järnavik	C		2x	19.8.2010	S	Järnavik, pasture and granite boulders 200 m S of the car-camping, pasture and granite boulders, granite	FK, TF, EZ	56 10 24.34 N 15 04 47.38 E
G. suecicum	G086	Gualow	C		2x	19.8.2010	S	Gualow, bank of the road to Vanneberga, 1 km SSW of the village, bank of the road in pine forest, sandstone	FK, TF, EZ	56 02 10.71 N 14 25 13.30 E
G. valdepilosum	G017	Borovsko	C, A, G	0.512	4x	1.8.2009	CZ	Bernartice, serpentine pine forest on w. slope of Sedlický potok, n. of highway bridge, 2.5 km nw. of Bernartice, open pine forest on serpentine, serpentine	FK, MD	49 41 18.09 N 15 6 14.28 E
G. valdepilosum	G021	Mohelno	C		2x	3.8.2009	CZ	Mohelno, pine forest along the road Dukovany - Mohelno, 1.1 km s. of the church in Mohelno, open pine forest on serpentine, serpentine	FK, MD	49 6 13.37 N 16 11 29.11 E
G. valdepilosum	G022	Dub	C		2x	1.8.2009	CZ	Tasov, ruins of the Dub castle, 1.4 km sw. of Tasov, rocky stands at castle ruins, silicate	FK, MD	49 16 53.21 N 16 4 42.93 E
G. valdepilosum	G023	Červená n. Vltavou	C, A		4x	15.8.2009	CZ	Červená n. Vltavou, pine-oak wood on the top of the rock above the right bank of Hrejkovický potok brook, 0.5 km e. of the church in Červená, mixed forest at the rocky slope, silicate	FK	49 23 59.2 N 14 14 59.8 E
G. valdepilosum	G036	Laczna	C, A, G	0.512	4x	20.7.2010	PL	Laczna near Klodzko, limestone quarry 500 m N of the NW end of the village, exposed limestone scree, slopes of an open pine forest above the quarry, limestone	FK	50 30 07.8 N 16 37 12.4 E

Species	No	Name	An.	G-size	Pl.	Date	Cn.	Locality	Coll.	GPS Coordinates
G. valdepilosum	G037	Radunia	C		4x	20.7.2010	PL	Tapadla near Dzierzcionow, open forest with serpentine rocks on south facing slope approx. 100 m south of the top of Radunia mountain, open oak-pine forest, serpentine	FK	50 50 10.7 N 16 46 37.9 E
G. valdepilosum	G040	Dabie (Klonow)	C, A, G	0.509	4x	21.7.2010	PL	Klonow near Miechow, slope above the road to Dale, approx. 100 m N of old limestone quarry, in the village, open parts of basiphilous steppe (bilá stráň), limestone	FK	50 20 28.0 N 20 10 46.2 E
G. valdepilosum	G042	Königshof	C, A, G	0.509	4x	25.7.2010	D	Königshof near Stefling, wester slopes of a side valley north of Regen river, 100 m N of Königshof, exposed limestone screes, slopes of an open pine forest above the quarry, granite	FK, PV	49 12 51.3 N 12 13 17.4 E
G. valdepilosum	G043	Kallmünz	C, A, G, M	0.51	4x	25.7.2010	D	Fischbach near Kallmünz, limestone rocks at the top of Hutberg hill, east of the village, limestone rocks in open pine forest, limestone	FK, PV	49 10 21.2 N 11 59 29.4 E
G. valdepilosum	G044	Matting	C, A		4x	26.7.2010	D	Matting near Regensburg, south facing slope above Danube river, approx. 1.4 km NE of the village, limestone rocks in open pine forest, limestone	FK, PV	48 58 16.5 N 12 01 05.6 E
G. valdepilosum	G045	Schuttersmühle	C, A, G, M	0.502	4x	26.7.2010	D	Schuttersmühle near Pottenstein, forest next to limestone rocks on right bank of Weiher brook, approx 100 m N of the mill, limestone rocks in open spruce forest (close to open pine forest on the rocks), dolomite	FK, PV	49 45 06.0 N 11 25 40.5 E
G. valdepilosum	G046	Rabenstein	C, A, G	0.508	4x	26.7.2010	D	Rabenstein, slopes and rocks above left bank of Allsbach brook, approx. 300 m NE of the castle Rabenstein, open pine forest, dolomite	FK, PV	49 49 27.6 N 11 22 29.2 E
G. valdepilosum	G047	Kupferberg	A, G	0.507	4x	27.7.2010	D	Kupferberg, serpentine rocks near to the top of Peterlenstein, 1.5 km NE of the town, serpentine rocks and screes in open pine forest, serpentine	FK, PV	50 09 25.3 N 11 35 45.7 E
G. valdepilosum	G049	Burgk	C		4x	27.7.2010	D	Burgk a. d. Saale, rock next to a pathway approx 400 m SE of bridge of the road from Schleiz to Remptendorf, 1 km SE of the castle, cracks in schist rock, schist	FK, PV	50 32 44.3 N 11 43 51.9 E
G. valdepilosum	G050	Woja	C, A, G, M	0.5	4x	27.7.2010	D	Woja near Wurlitz, open pine forest next to western margin of a serpentine quarry, 600 m south of the village, serpentine rocks in open pine forest, serpentine	FK, PV	50 15 14.4 N 11 58 30.4 E
G. valdepilosum	G051	Erbendorf	C, A, G	0.504	4x	27.7.2010	D	Erbendorf, serpentine rocks in pine forest 2 km NNW of the village, serpentine rocks in open pine forest, serpentine	FK, PV	49 51 24.3 N 12 01 53.7 E
G. valdepilosum	G058	Boskovice	A, G	0.505	4x	3.8.2010	CZ	Boskovice, open oak forest on steep slope above Bělá river, 2 km SW of the Boskovice castle, open oak forest on steep slope, basic conglomerate	FK, MD	49 28 27.0 N 16 37 57.2 E
G. valdepilosum	G059	Skalní Mlýn	C, A, G	0.516	4x	4.8.2010	CZ	Blansko - Skalní Mlýn, open north-facing limestone rocks, 300 m SW of the Skalní Mlýn mill, open north-facing limestone rocks, limestone	FK, MD	49 21 38.2 N 16 42 22.0 E
G. valdepilosum	G060	Stránská skála	G	0.504	4x	4.8.2010	CZ	Brno-Slatina, open Sesleria-grassland on north-facing slope of Stránská skála hill (310 m), open Sesleria-grassland on north-facing slope, limestone	FK, MD	49 11 28.4 N 16 40 35.8 E
G. valdepilosum	G061	Želešice	C		2x	4.8.2010	CZ	Želešice, rocks in open forest on the stepp slope above right bank of Bobrava river at the W edge of the quarry, 1.7 km NW of the church in the village, rocks in open forest, amphibolite	FK, MD	49 07 26.9 N 16 33 15.8 E
G. valdepilosum	G065	Chudčice	C		2x	5.8.2010	CZ	Chudčice, slope above forest road at the "U Tří křížů" crossing, 1 km SSE of the church in the village, slope above road in the open oak forest, basic conglomerate	FK, MD	49 16 41.9 N 16 27 43.5 E

Species	No	Name	An.	G-size	Pl.	Date	Cn.	Locality	Coll.	GPS Coordinates
G. valdepilosum	G093	Bítov	C		2x	22.7.2010	CZ	Bítov, Pinus nigra-Quercus forest on the rocky slope skalnatý above Vranovská přehrada dam, close to the castle , Pinus nigra-Quercus forest on the rocky slope, silicate	ML, JS	48 56 26.3 N 15 42 13.5 E
G. valdepilosum	G099	Grossheinrichschlag	C		2x	23.7.2010	AT	Grossheinrichschlag, sunny river bank 2 km E of the village, sunny river bank, silicate	ML, JS	48 24 38.6 N 15 26 09.4 E
G. valdepilosum	G104	Limberg	C		2x	24.7.2010	AT	Limberg, clearing in the oak forest SW of the village, clearing in the oak forest, silicate	ML, JS	48 35 32.4 N 15 50 07.0 E
G. valdepilosum	G106	Kollnitzgraben	C, A, G	0.508	4x	25.7.2010	AT	Kollnitzgraben, pine forest next to the ruine, pine forest , silicate	ML, JS	48 49 21.8 N 15 31 54.1 E
G. valdepilosum	G134	Zarogow	C, A, G	0.502	4x	14.6.2011	PL	Zarogow (distr. Miechow), old quarry 40 m NE of the village, chalk rocks in an old quarry, chalk	FK, JCH	50 20 09.0 N 20 06 59.2 E
G. valdepilosum	G150	Boreč	C, A, G	0.51	4x	28.6.2011	CZ	Boreč, screes on the NNE slope, scree, basalt	ML, JS	50 30 56.7 N 13 59 19.0 E
G. valdepilosum	G151	Velichov	C, A, G, M	0.504	4x	28.6.2011	CZ	Velichov, S slope of the Thebisberg hill, W of the village, scree, basalt	ML, JS	50 16 55.8 N 12 59 50.5 E
G. valdepilosum	G153	Děvín	C, A		4x	29.6.2011	CZ	Děvín, small rock on the edge of slope, 650 m SW transmission tower, limestone rock, limestone	ML, JS	48 51 54.0 N 16 38 40.5 E
G. valdepilosum	G154	Děvín 2	C, A		4x	29.6.2011	CZ	Děvín, depression on the SW slope, 300 m W transmission tower, grassland/steppe on the slope, limestone	ML, JS	48 52 06.8 N 16 38 50.4 E
G. valdepilosum	G208	Sejrup	C, G	0.511	4x	19.8.2011	DK	Sejrup, Sejrup krat forest, 1.2 km E of the village, open oak woodland,	FK	55 52 58.5 N 9 19 39.5 E
G. valdepilosum	G213	Vuznice	C, A, G	0.498	4x	25.8.2011	CZ	Nižbor, 2.1 km N from railway station, Vůznice national nature reserve, outcrop 500 m S from Vůznice water reservoir, rocky outcrop in forest, silicate	ML	50 01 16.53 N 13 59 30.16 E
G. valdepilosum	G247	Treseburg	C, A, G	0.501	4x	5.6.2012	D	Treseburg, rocky crest 1.1 km NNW of the village, open forest and rocks, silicate	FK	51 43 08.6 N 10 57 32.2 E
G. valdepilosum former G. sudeticum	G032	Planý vrch	C, A, G, M	0.511	4x	27.6.2010	CZ	Mnichov, pine forest 100 m SW of the small serpentine quarries, 1.5 km W of the church in the village, serpentine rocks in open pine forest, serpentine	FK	50 02 16.08 N 12 45 59.04 E
G. valdepilosum former G. sudeticum	G136	Vlček	C, A, G, M	0.503	4x	21.6.2011	CZ	Prameny, Vlčí Hřbet hill 1.9 km S of the village, open pine forest on serpentine, serpentine	FK	50 01 59.0 N 12 44 04.2 E
G. valdepilosum former G. sudeticum	G277	Prameny	C, A, G	0.501	4x	1.9.2012	CZ	Prameny, isolated rocky outcrop 1.2 km N of the village, serpentine rocky outcrop, serpentine	AK, MH	50 3 41.22 N 12 43 54 E
G. valdepilosum former G. sudeticum	G278	Dominova skalka	C, A, G	0.505	4x	1.9.2012	CZ	Nová Ves, Dominova skalka rock, 1.6 km SSE of the village, serpentine rocky outcrop, serpentine	AK, MH	50 4 17 N 12 47 10 E