

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



Molekulární evoluce všivce statného a všivce Hacquetova

Bc. Michaela Vratislavská

Diplomová práce
předložená
na Katedře ekologie a životního prostředí
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků
na získání titulu Mgr. v oboru
Ochrana a tvorba životního prostředí

Vedoucí práce: RNDr. Jakub Těšitel Ph.D.
Garant práce: Prof. MVDr. Emil Tkadlec, CSc.

Olomouc 2016

Vratislavská M. 2016. Molekulární evoluce všivce statného a všivce Hacquetova [diplomová práce]. Olomouc: Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci. 45 stran, 2 přílohy, česky.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá molekulární variabilitou všivce statného (*Pedicularis exaltata*) a jejím cílem bylo zrekonstruovat jeho evoluční historii. Zároveň byly pro porovnání zkoumány jeho příbuzné druhy, a to všivec Hacquetův (*P. hacquetii*), se kterým bývá často zaměňován, a všivec chocholatý (*P. comosa*). Bylo zkoumáno 141 vzorků z celkem 17 populací z České republiky, Slovenské republiky, Rumunska, Ukrajiny, Rakouska a Slovinska. Data byla analyzována pomocí metody AFLP a sekvenování DNA úseků *rpl32*, *trnT-L* a ITS. Ze všech analýz je zřejmé, že *P. comosa* je samostatný druh. U komplexu *P. exaltata* a *P. hacquetii* byla odhalena nízká mezidruhov a naopak vysoká vnitropopulační a vnitrodruhov variabilita pomocí analýzy molekulární variance. Podrobnější analýzy AFLP dat, analýza hlavních koordinát PCoA a metody STRUCTURE, ukázaly náznak fylogeografické struktury, která je však odlišná od tradičního pojetí hranice mezi druhy *P. exaltata* a *P. hacquetii*. Přímé sekvenování DNA neodhalilo existenci haplotypů charakteristických pro jeden nebo druhý druh. Náznak mezidruhov rozdílu lze pozorovat v PCoA chloroplastových mikrosatelitů. Tyto výsledky celkem jasně ukazují, že oddělování *P. exaltata* a *P. hacquetii* jako samostatných druhů není opodstatněné, přičemž správné jméno, které by se pro tento jediný druh mělo použít, je *Pedicularis hacquetii*.

Klíčová slova: Alpy, AFLP, DNA sekvenace, izolace DNA, Karpaty

Vratislavská M. 2015. Molecular evolution of *Pedicularis exaltata* and *Pedicularis hacquetii* [master thesis]. Olomouc: Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacký University Olomouc. 45 pp., 2 Appendices, in Czech.

Abstract

This thesis investigated molecular variability of *Pedicularis exaltata* to reconstruct its evolutionary history. Its closely related congeners *Pedicularis hacquetii* and *Pedicularis comosa* were also included in the analysis to test the species delimitations. I investigated 141 samples from 17 locations in the area of the Czech Republic, Slovakia, Romania, Ukraine, Austria and Slovenia. The data were analysed by AFLP and DNA sequencing of *rpl32*, *trnT-L* and ITS loci. *P. comosa* was demonstrated as a clearly separated species according to all molecular markers. Low between-species variability coupled with high interpopulation and intrapopulation variability was revealed in the *P. exaltata*-*P. hacquetii* complex by an analysis of molecular variance (AMOVA) of the AFLP data. Principal coordinate analysis and a STRUCTURE analysis showed a weak phylogeographic structure which was however unrelated to the taxonomic differentiation between *P. exaltata* and *P. hacquetii*. Only a trace of such differentiation can be observed in chloroplast microsatellite data. Species delimitation between *P. exaltata* and *P. hacquetii* is therefore not substantiated and their populations should be considered members of a single species *Pedicularis hacquetii*.

Key words: Alps, AFLP, Carpathians, DNA sequence, DNA isolation

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jakuba Těšitele Ph.D., příp. s pomocí dále jmenovaných osob, a pouze s použitím citovaných literárních zdrojů a vlastních získaných dat.

V Olomouci 3.5.2016

.....

podpis

Obsah

Seznam tabulek	vii
Seznam obrázků	viii
1 Úvod	1
1.1 Historie Bílých Karpat	1
1.2 Fylogeografie	3
1.3 Rod <i>Pedicularis</i>	4
1.4 Ekologie zkoumaných druhů	5
1.5 Výskyt a ochrana všivců v České republice	5
1.6 <i>Pedicularis exaltata</i> Besser ex Bunge	7
1.7 <i>Pedicularis hacquetii</i> Graf.	9
1.8 <i>Pedicularis comosa</i> L.	10
2 Cíle práce	12
3 Materiál a metody	13
3.1 Sběr materiálu	13
3.2 Izolace DNA	15
3.3 Metoda AFLP	15
3.4 Sekvenování vybraných úseků	18
3.5 Zpracování molekulárních dat	19
3.6 Analýza dat	19
4 Výsledky	24
4.1 AFLP	24
4.1.1 AMOVA	24
4.1.2 Analýza hlavních koordinát (PCoA)	24
4.1.3 DW index a genová diverzita	27
4.1.4 STRUCTURE	28
4.2 DNA sekvence	29
4.2.1 Haplotypová síť	29
4.2.2 Bayesiánský fylogenetický strom	32
4.2.3 Chloroplastové mikrosatelity	33
5 Diskuze	35
5.1 Molekulární data a komplex <i>P. exaltata</i> a <i>P. hacquetii</i> v Karpatech	35
5.2 Taxonomie	37
6 Závěr	39
7 Literatura	40
Přílohy	46

Seznam tabulek

Tabulka 1. Lokality, na kterých byly vzorky sesbírány	14
Tabulka 2. Primerové kombinace, které byly použity v selektivní amplifikaci.....	16
Tabulka 3. Reakční podmínky AFLP.....	17
Tabulka 4. Reakční podmínky PCR	19
Tabulka 5. Počet sekvencí v jednotlivých úsecích a počet vzorků použitých v metodě AFLP.....	22
Tabulka 6. ITS sekvence druhů rodu <i>Pedicularis</i> stažené z databáze GenBank použité ke konstrukci fylogenetického stromu.	22
Tabulka 7. Variabilita délek chloroplastových mikrosatelitů nalezená v cpDNA v sekvencích <i>rpl32</i> a <i>trnT-L</i> u komplexu <i>Pedicularis</i>	23
Tabulka 8. Analýza molekulární variance AFLP dat pro vzorky všech tří druhů	24
Tabulka 9. Analýza molekulární variance AFLP dat pro vzorky klasifikované jako <i>P. exaltata</i> a <i>P. hacquetii</i>	24
Tabulka 10. Genová diverzita a průměrný podíl vzácných alel populací <i>P. exaltata</i> a <i>P. hacquetii</i>	28
Tabulka 11. Soupis označení sekvencí cpDNA v haplotypových sítích a ITS haplotypů	31
Tabulka 12. Počet mikropopulací a fertilních rostlin na vybraných lokalitách.....	46

Seznam obrázků

Obrázek 1. Jedinec <i>P. exaltata</i> z rumunské lokality Ceahlau, detail květu z rumunské lokality Hangu.....	9
Obrázek 2. <i>P. hacquetii</i> , rumunská lokalita Piule	10
Obrázek 3. <i>P. comosa</i> , rumunská lokalita Piatra Cetii	11
Obrázek 4. Mapa lokalit zkoumaných populací (podkladová mapa převzata z Wikipedia – volný zdroj, upravena).....	15
Obrázek 5. Analýza hlavních koordinát (PCoA) jednotlivých rostlin, 1. a 2. ordinační osa. Symboly vzorků jsou odlišeny podle druhové příslušnosti.	25
Obrázek 6. PCoA porovnání 1. a 3. koordinanty jednotlivých rostlin. Symboly vzorků jsou odlišeny podle druhové příslušnosti.	26
Obrázek 7. Analýza hlavních koordinant (PCoA) jednotlivých rostlin druhů <i>P. exaltata</i> a <i>P. hacquetii</i> , 1. a 2. ordinační osa. Symboly vzorků jsou odlišeny podle druhové příslušnosti. Čísla u symbolů označují konkrétní populace.	26
Obrázek 8. PCoA jednotlivých rostlin druhů <i>P. exaltata</i> a <i>P. hacquetii</i> , 1. a 3. ordinační osa. Symboly vzorků jsou odlišeny podle druhové příslušnosti.	27
Obrázek 9. Výsledky shlukovací metody STRUCTURE hodnotí populace druhů <i>P. exaltata</i> , <i>P. hacquetii</i> a <i>P. comosa</i> . Jednotlivé barvy zobrazují příslušnost ke shlukům. Čísla znázorňují konkrétní hodnocenou populaci s jejími jedinci. $K = 3$	28
Obrázek 10. Výsledky shlukovací metody STRUCTURE hodnotí populace druhů <i>P. exaltata</i> a <i>P. hacquetii</i> . Jednotlivé barvy zobrazují příslušnost ke shlukům. Populace jsou označeny čísly. $K = 2$	29
Obrázek 11. Haplotypová síť zobrazující sekvence chloroplastové DNA druhů <i>P. exaltata</i> , <i>P. hacquetii</i> a <i>P. comosa</i> , úsek <i>rpl32</i> . Velikost symbolů jednotlivých haplotypů odpovídá jejich frekvenci v datasetu. Body značí haplotypy, které v datasetu zastoupeny nejsou.	30
Obrázek 12. Haplotypová síť zobrazující sekvence chloroplastové DNA druhů <i>P. exaltata</i> a <i>P. hacquetii</i> , úsek <i>trnT-L</i> . Velikost symbolů jednotlivých datasetů odpovídá jejich frekvenci v datasetu. Body značí haplotypy, které v datasetu nejsou zastoupeny.....	30
Obrázek 13. Bayesiánský fylogenetický strom zobrazující sekvence ITS u rodu <i>Pedicularis</i> . Čísla u uzlů naznačují posteriorní pravděpodobnost.	32
Obrázek 14. Analýza hlavních koordinát znázorňující variabilitu dat získaných z chloroplastových mikrosatelitů vzorků <i>P. exaltata</i> , <i>P. hacquetii</i> a <i>P. comosa</i> . Jednotlivé vzorky jsou označeny číslem populace kolem černého trojúhelníku.....	33
Obrázek 15. Analýza hlavních koordinát zobrazující variabilitu dat z chloroplastových mikrosatelitů. 1. a 2. ordinační osa. Vzorky <i>P. exaltata</i> a <i>P. hacquetii</i> nebo jejich skupiny zobrazující stejnou skupinu mikrosatelitů jsou označeny černým trojúhelníkem, čísla kolem trojúhelníku znázorňují jednotlivé populace.	34
Obrázek 16. Fotografie kalichu <i>P. exaltata</i> na lokalitě NPR Porážky v Bílých Karpatech	47
Obrázek 17. Fotografie kalichu <i>P. hacquetii</i> na lokalitě Plocken Pass v Alpách	47
Obrázek 18. Fotografie kalichu <i>P. hacquetii</i> na lokalitě Crna Prst v Alpách.....	48
Obrázek 19. Fotografie kalichu <i>P. hacquetii</i> na lokalitě Wolayer Alm v Alpách	48

Poděkování

V první řadě děkuji svému školiteli a vedoucímu diplomové práce Jakubovi Těšiteli za ohromnou trpělivost, shovívavost, podporu a spolupráci. Tím, že mě s vervou provázel celým procesem výzkumu – od sběru materiálu, po laboratorní a počítačové zpracování až po samotné psaní práce, mi umožnil dostat se do oblasti vědy, která mi do té doby zůstávala skryta. A za to jsem mu vděčná.

Děkuji také Ivaně Jongepierové, díky které jsem měla možnost se seznámit s Jakubem Těšitelem a tím se dostat k tomuto tématu. Mé poděkování patří i Pavlu Novákovi (botanik) a Tomáši Pukšici (řidič) za provázení po rumunských a slovenských Karpatech. Brašovskému profesorovi V. A. Indreicovi a jeho žákovi Todimu Scurtovi za pomoc při lokalizaci rumunských lokalit. Honzovi Rolečkovi za kontakt na ukrajinské botaniky, a tím i za vzorky z Ukrajiny. Šárce Svobodové za zasvěcení do tajů laboratorního a počítačového zpracování dat. Miloslavu Kitnerovi a Karlu Fajmontovi za nakopnutí a konzultaci. Profesorovi Emilovi Tkadlecovi za korekci textu. Romanu Kalousovi za pomoc při formální úpravě práce. A v neposlední řadě mé rodině, která mi byla celou dobu velkou oporou. Také chci ještě poděkovat všem, kteří mi vyšli vstříc, když jsem je žádala o zapůjčení či zaslání určité literatury či článku, protože bez toho by tato práce nebyla úplná.

1 Úvod

Chráněná krajinná oblast Bílé Karpaty je proslavená svými orchidejovými loukami a také vzácnými druhy rostlin a bezobratlými živočichy (Rubín a kol. 2006). Velká druhová diverzita cévnatých druhů rostlin je jedinečná v celé střední Evropě (Merunková a kol. 2012). Nachází se zde 103 ohrožených druhů rostlin, mezi něž patří i všivec statný (*Pedicularis exaltata*), který zároveň spadá i mezi 27 zdejších cévnatých druhů rostlin, jenž jsou kriticky ohroženy (Bezděčka a kol. 2002). Tento druh je zajímavý tím, že se nachází pouze na jedné lokalitě v ČR, a to v NPR Porážky (Mackovčín a kol. 2002), na Slovensku se však nevyskytuje, a jeho výskyt je zaznamenán až v Rumunsku (Gulich 2008) a na ukrajinských lokalitách v blízkosti Rumunska (Peregrym a Peregrym 2014). Je také zajímavé, že je velmi často zaměňován s všivcem Hacquetovým (*Pedicularis hacquetii*). Jediný morfologický znak kterým se tyto dva druhy od sebe průkazně odlišují je, že u druhu *P. hacquetii* je kalich na žilkách pokryt viditelnými chlupy (Holub a Kmetřová 1997), kdežto *P. exaltata* má kalich na žilkách lysý (Hrouda 2000).

1.1 Historie Bílých Karpat

Karpatský oblouk byl zformován alpským vrásněním, které trvalo od konce druhohor až po pozdní pleistocén (Chlupáč a kol. 2011). Pro čtvrtohory je typické střídání glaciálů a interglaciálů. V glaciálních dobách podléhaly horniny, zejména flyše, velmi silnému větru, a s tím spojeným odnosem a narušováním povrchu mrazem. Masivním odnosem byla vytvořena nechráněná území, bezlesí, což mělo dopad na biotické složky prostředí, protože zde chyběl dostatek krytých území pro přečkání opakujících se podnebních výkyvů (Chlupáč a kol. 2011, Ložek 2008, Kuča a kol. 1992). Po celé čtvrtohory tvořily Bílé Karpaty koridor mezi nížinami Dolnomoravského úvalu na západní straně a Podunajskou nížinou na východě pro teplomilné druhy šířící se k severu. Na Slovensku navíc vystupuje bradlovské pásmo s vápencovými skalami, které je schopno odolávat podnebním výkyvům a poskytnout tak útočiště mnoha druhům v glaciálních i interglaciálních obdobích. Tyto dvě skutečnosti dohromady s mnoha dalšími faktory zvyšují druhovou bohatost Bílých Karpat oproti jiným pohořím tvořených flyšem (Kuča a kol. 1992, Merunková a kol. 2012).

Interglaciální období čtvrtohor byla ovlivňována pouze přírodními faktory, ovšem nejmladší doba poledová je z velké části ovlivněna činností člověka (Ložek 2008).

Na přelomu posledního pozdního glaciálu proběhlo v několika etapách zvlhčování a oteplování krajiny, kdy v teplejších částech období docházelo k šíření dřevin s vysokou ekologickou amplitudou do tehdejšího bezlesí, např. břízy či borovice lesní (Ložek 2008, Kuča a kol. 1992). Kromě již běžných stepí se začaly vytvářet i mokřady a bylinné biotopy, které připomínají louky dnešní doby (Kuča a kol. 1992). V preboreálu a boreálu nebo-li starém holocénu měla krajina Karpat parkovitou strukturu s otevřenými stepními ploškami. Teplota stoupala na teplotu vyšší, než je současný teplotní průměr. Docházelo k sedimentaci pěnvců. Z jihu na sever se posouvaly druhy s užší klimatickou amplitudou. Vrchol teplot a vlhkosti prostředí nastal ve středním holocénu, především v atlantickém období, kdy zároveň došlo k dalšímu rozšíření a také k zapojení lesních porostů, uvnitř kterých se pravděpodobně začaly tvořit otevřená místa s vápnitými mokřady (Ložek 2008, Kuča a kol. 1992). Řada druhů otevřené krajiny toto období přečkalo právě na těchto enklávách, které byly pravděpodobně zachovány pastvou divokých koní, zubrů a turů (Ložek 2008). Toto období se nazývá také neolit, tedy mladší doba kamenná. V nižších polohách člověk jako pastevec a rolník začal krajinu pomalu přetvářet podle svých potřeb na tzv. kulturní stepi. Klučením a žďářením lesů tak nevědomky pomáhal udržet a šířit teplomilné stepní i luční druhy (Chlupáč a kol. 2011, Klimeš 2008, Kuča a kol. 1992). Avšak ve vyšších nadmořských výškách se příroda nadále nerušeně rozvíjela a utvářely se vegetační stupně do současné podoby (Kuča a kol. 1992). Na sklonku středního holocénu, v mladší a pozdní době bronzové, člověk začal osídlovat i vyšší polohy, což bylo spojeno s další kultivací prostředí Karpat. Díky tomu opět ubývalo lesů, přibývalo půdních sesuvů a šíření druhů otevřené krajiny (Ložek 2008, Kuča a kol. 1992). V mladším holocénu docházelo k ústupu lidských osídlení a ke stěhování národů. Ve středověku a novověku pak člověk opět pronikal do horských oblastí, v té době zde začínalo kopaničářské a valašské osídlování krajiny. Tímto návratem lidí zpět do Karpat začaly opět vznikat menší lesní celky a opět se tak objevila možnost šíření světlomilných druhů. Tehdy začala vznikat většina nám dnes známých bělokarpatských luk (Kuča a kol. 1992).

1.2 Fylogeografie

Fylogeografie je poměrně mladá disciplína, která spojuje dohromady několik vědních oborů, a to především molekulární fylogenetiku, populační genetiku a geografii (Fér a Marhold 2012). Dalo by se tedy říci, že čas a prostor jsou společně považovány za osy fylogeografie, na kterých jsou zobrazovány části genových rodokmenů, jenž nás zajímají (Avisé 2000). Tento pojem zavedl zakladatel této vědy John C. Avisé v roce 1987 (Riddle 2009).

Rostliny mají dva druhy cytoplasmatických genomů, a to mitochondriální DNA (mtDNA) a oproti živočichům navíc i chloroplastovou DNA (cpDNA) (Avisé 2009). Oba dva druhy organelové DNA mají stejnou strukturu, tedy jsou uzavřené kruhové. Dědičnost u obou je zpravidla z mateřské linie a variabilita je zapříčiněna jedinečnými mutacemi, jelikož k rekombinaci u nich nedochází (Avisé 2009, Fér a Marhold 2012). Avšak rostlinná mtDNA se ve fylogeografii nevyužívá, jelikož její evoluční vývoj je až 100krát pomalejší než u živočichů, a ještě jsou s ní i jiné technické komplikace, což ji ve výsledku činí méně vhodnou pro evoluční výzkumy. Z tohoto důvodu se u rostlin používá pouze cpDNA, která má navíc o něco rychlejší evoluci než rostlinná mtDNA (stále však pomalejší než živočišná mtDNA) (Avisé 2009). Z toho plyne, že cpDNA je oproti živočišné mtDNA méně variabilní. Díky studiu organelárních DNA jsou definovány haplotypy pro zkoumané jedince, a to pomocí sekvenování některých jejich částí, zkoumáním variability mikrosatelitů nebo pomocí např. restrikční metody RFLP (Fér a Marhold 2012).

Využívá se také metoda AFLP, která pracuje s rozdílnostmi v sekvencích DNA v rámci jedinců jednoho druhu nebo i mezi příbuznými organismy. Podstatou metody je štěpení DNA restrikčními enzymy s následnou amplifikací takto vzniklých fragmentů. Vzniknou tak zvýrazněné, délkou definované fragmenty DNA, pro každého jedince zvlášť, které se hodnotí podle jejich přítomnosti/nepřítomnosti (Fér a Marhold 2012, Schaal a kol. 1998). Čím je více shodných fragmentů u dvou jedinců, tím jsou si příbuznější (Fér a Marhold 2012). Metoda AFLP je výhodná v tom, že není nutné předem znát sekvence DNA studovaného organismu (Ovesná a Hodek 2007). Navíc ji lze použít i pro určení DW indexu, který určuje, nakolik je která populace jedinečná a do jaké míry se odlišuje od ostatních populací (Fér a Marhold 2012).

1.3 Rod *Pedicularis*

Rod všivec (*Pedicularis* L.) patří do čeledi Orobanchaceae (Olmstead 2002). Podle odhadů botaniků rod zahrnuje 600 až 800 druhů rostoucích převážně v boreálních a arkticko-alpínských oblastech severní polokoule, s centrem geografického rozšíření v Himalájích, odkud se rozšířil dál do Evropy (Macior a kol. 2001, Peregrym a kol. 2011, Wang a kol. 2003). V Evropě se rod vyskytuje převážně v Alpách a Pyrenejích (Hrouda 2000). Do Ameriky se rod dostal skrze Beringův most, který v minulosti spojoval Severní Ameriku s asijským kontinentem (Savil 1977). Několik druhů lze nalézt i na jižní polokouli v Jižní Americe v Andách (od Kolumbie po Ekvádor) či v severní části Afriky, kde byl popsán např. druh *P. numidica* Pomel. (Peregrym a kol. 2011, Stonawski 1985).

Dříve byl rod řazen do čeledi Scrophulariaceae (např. Gazda 1963). Na základě molekulárních studií však bylo postupně dokazováno, že čeleď Scrophulariaceae není monofyletická (Olmstead a Reeves 1995). Nakonec byla původní čeleď Scrophulariaceae přerozdělena do sedmi skupin (Tank a kol. 2006) a rod *Pedicularis* byl zařazen do čeledi Orobanchaceae (Olmstead 2002), stejně jako jiné poloparazitické rody, např. *Euphrasia* L., *Melampyrum* L. či *Rhinanthus* L. (Olmstead a kol. 2001, Tank a kol. 2006).

Rostliny rodu *Pedicularis* jsou poloparazité, tzn. z hostitelské rostliny odebírají živiny a vodu, jsou ale schopny samostatně fotosyntetizovat (Tank a kol. 2006, Těšitel 2011). Mají sekundární haustoria, tzn. mají vlastní kořenový systém, na němž haustoria vznikají (Těšitel 2011, Stonawski 1985). Konkrétně druhy *P. exaltata*, *P. haquetii*, *P. foliosa*, *P. sceptrum-carolinum* a *P. chamissomis* var. *japonica* jsou schopny přežít nějakou dobu bez hostitele (u *P. exaltata* je to prokazatelně jeden rok), ovšem v tom případě rostou o poznání pomaleji (Stonawski 1985).

Opylení rostlin rodu *Pedicularis* po celém jejich areálu rozšíření zajišťují čmeláci (rod *Bombus*) (Macior a kol. 2001, Stonawski 1987). Avšak existují výjimky, např. *P. spicata* a *P. rhinanthoides* ssp. *labellata* jsou opylovány včelami (Macior a kol. 2001) nebo např. *P. densiflora*, jehož lokalitou je Severní Amerika, je opylován kolibříky (Savil 1977). Některé druhy, např. *P. sudetica*, se kromě pohlavního rozmnožování mohou rozšiřovat také vegetativně (Štursová a Kociánová 2005). Plodem všivců je tobolka s mnoha semeny (Hrouda 2000).

Semena většiny druhů všivců včetně *P. exaltata* potřebují být ke svému vyklíčení vystavena po určitou dobu období chladu. Zároveň musejí být uložena ve vlhkém

povrchu substrátu a musejí mít přístup světla a kyslíku. Výjimku u českých druhů tvoří *P. sceptrum-carolinum*, který přemrznutí semen nepotřebuje (Stonawski 1985).

Svůj název rod získal údajně díky tomu, že se výluh z rostlin používal k odvšivení nejen dobytka, ale i lidí. Není však jasné, které konkrétní druhy se za tímto účelem používaly. Je ale dokázáno, že většina rostlin tohoto rodu obsahuje glykosid aukubin, který je pro vši jedovatý (Machačná 2007, Šavikin-Fodulović a kol. 2003, Hofman 2014). U lidí tato látka může způsobit průjemy, koliky, v trávicím traktu může vést k zánětům a při požití větší dávky může dojít až ke krvácení do mozku. Rostliny obsahují také množství dalších alkaloidů (Hofman 2014, Stonawski 1985). Díky tomu se dříve některých druhů používalo i v lidovém léčitelství, např. *Pedicularis laeta* byl v Kazachstánu používán jako silné diuretikum a hemostatikum, a také jako osvědčený lék na silné formy ischiasu (Ivanov 1956). A i v dnešní době jsou např. u *Pedicularis densiflora*, pocházejícího ze Severní Ameriky, tamějšími indiánskými kmeny tradičně využívány jeho pupeny a květy, které jsou kouřeny pro své uvolňující vlastnosti (Schlatter 2014).

1.4 Ekologie zkoumaných druhů

Všivec statný (*P. exaltata*) roste převážně na vlhkých loukách, které ovšem nejsou trvale zamokřeny, a které mají celoročně vyšší hladinu spodní vody a zároveň těžší půdy bohaté na živiny (Čeřovský 1999, Hrouda 2000). Podobně i všivec Hacquetův (*P. hacquetii*) vyhledává vlhčí stanoviště u potoků, horské vlhčí lesy, horské vysokobylinné nivy, a také mokrá skalnatá i travinná místa subalpínských luk se slabě kyselými, neutrálními či humózními půdami. Přesahuje i do alpínského a supramontánního stupně (Holub a Kmet'ová 1997, Săvulescu 1960). Všivec chocholatý (*P. comosa*) se nachází na vápenitých podložích skalnatých a travnatých stanovišť subalpínských horských oblastí (Săvulescu 1960). Jeho jediná lokalita Vršatec na slovenské straně Karpat představuje nejsevernější výskyt tohoto druhu, přičemž další jeho nejbližší lokality jsou jižní Alpy v Itálii a Transylvánie v Rumunsku (Holub a Kmet'ová 1997).

1.5 Výskyt a ochrana všivců v České republice

Na našem území je zaznamenáno celkem 5 druhů všivců, a to *P. exaltata*, *P. palustris* L. subsp. *palustris* subsp. *opsiantha*, *P. sceptrum-carolinum* L., *P. sudetica* Willd. subsp.

sudetica, *P. sylvatica* L. (Danihelka a kol. 2012). Vyhláškou Ministerstva životního prostředí 395/1992 Sb. jsou chráněny kriticky ohrožené druhy *P. exaltata*, *P. sceptrum-carolinum* a *P. sudetica*, jako silně ohrožený druh pak *P. palustris* a *P. sylvatica*. V současném Černém a červeném seznamu cévnatých rostlin České republiky jsou jako C1 označeny *P. exaltata* a *P. sudetica*, C2 pak *P. palustris*, C3 *P. sylvatica* a jako druh vyhynulý A1 je řazen *P. sceptrum-carolinum* (Grulich a kol. 2012). V červeném seznamu ohrožených rostlin a živočichů ČR v 5. svazku jsou uvedeny druhy *P. exaltata*, *P. sceptrum-carolinum* a *P. sudetica* (Čeřovský a kol. 1999). *P. sudetica* je navíc chráněn i v evropských ustanoveních, a to v Bernské úmluvě z roku 1998 v Příloze I – přísně chráněné druhy rostlin, kde je řazen v čeledi Scrophulariaceae a také v celosvětovém červeném seznamu (Walter a Gillett 1997).

Všivec žezlovitý (*P. sceptrum-carolinum*) dříve hojně rostl na jediném místě v ČR, konkrétně na lokalitě Lipka na Šumavě, avšak místními obyvateli byl systematicky likvidován kvůli jeho nevhodnosti pro spásání dobyt看, až zde byl nakonec zcela vyhuben (Hendrych 1977, Albrecht 2003).

Všivec bahenní (*P. palustris*) se v České republice vyskytuje na okrajích oligotrofních stojatých vod (Chytrý a kol. 2011), na vápnatých slatiništích, což jsou území s celoroční zásobou vysoko položené hladiny vody, která jsou bohatá na vápník, hořčík a další minerály, bez výskytu rašeliníku, a také na přechodových rašelinistích (Chytrý a kol. 2010). Je to druh konkurenčně slabý, citlivý na zásahy do vodního režimu, patřící mezi ustupující druhy mokřadních stanovišť (Hrouda 2000). Najít jej však lze i na nevápnitých mechových slatiništích, kde se rašeliník již pravidelně vyskytuje a který lze popsat jako přechod mezi posledními dvěma jmenovanými biotopy. Na tomto typu území roste i všivec lesní (*P. sylvatica*), který lze ještě najít i na lokalitách mezofilních podhorských a horských smilkových trávníků, což jsou nízké acidofilní trávníky s nízkou až vysokou druhovou rozmanitostí (Chytrý a kol. 2010, Chytrý 2010). Roste také na lokalitách suchých trávníků, na trvale zamokřených stanovištích mezotrofních rašelinných luk a i na přechodových rašelinistích doprovázených ostřicemi (Chytrý 2010, Chytrý a kol. 2011). Všivec lesní je světlomilný druh, konkurenčně slabý, který potřebuje vysokou hladinu spodní vody (Hrouda 2000).

Na rozhraní subalpínského a alpínského stupně lze najít všivec krkonošský (*P. sudetica* subsp. *sudetica*), nejčastěji na mechových rašelinných prameništích, rašelinistích a také na slatiništích (Chytrý a kol. 2011, Hrouda 2000, Štursová

a Kociánová 2005). Druh není pevně vázán k žádnému společenstvu ani půdnímu typu, ovšem potřebuje stanoviště s kyselým podkladem. V České republice se tento poddruh vyskytuje pouze v Krkonoších (Hrouda 2000, Štursová a Kociánová 2005).

1.6 *Pedicularis exaltata* Besser ex Bunge

Pedicularis exaltata popsal Besser v roce 1832, ovšem správně popsána byla tato rostlina až v roce 1849 Bungem (Hrouda 2000, Stonawski 1985). Všivec statný je vytrvalý hemikryptofyt, který se rozmnožuje převážně pohlavně (Stonawski 1985). Jeho výskyt v ČR u nás objevil František Čoka v létě roku 1906 severně od města Strážnice (Podpěra 1906). Dr. Podpěra jej řadí jako druh karpatsko-pontický, a také udává, že se všivec vysoký, jak jej česky nazývá, nachází po celých Karpatech až po Moldavsko, Sedmihradsko, jižní a střední Rusko (po Litvu, Volyň) a že proniká také na Balkánský poloostrov do Srbska, Bosny i Černé hory. Ovšem již v té době se všivec statný vyskytoval u nás a v Rusku pouze v nižších polohách (Podpěra 1906). Na základě tohoto údaje lze říci, že k řádnému rozlišování druhů *P. exaltata* a *P. hacquetii* začalo docházet až v posledních pár desetiletích.

Na Ukrajině se jeho výskyt v posledních letech velmi zúžil, je zde tedy zapsán v Červeném seznamu (Hoskovec 2008, Peregrym a Peregrym 2014). Z Polských a Běloruských lokalit již zcela zmizel (Burlaka a Kazemirska 2012, Peregrym a Peregrym 2014). Za hlavní příčinu jsou považovány změny biotopů pod vlivem antropogenních činností, jako např. odvodňování, orba luk a nadměrná pastva hospodářských zvířat (Peregrym a Peregrym 2014). V Červeném seznamu podle IUCN je zapsán jako VU, tedy jako druh zranitelný. Ve vnitrostátních zákonech Rumunska však není nijak chráněn, je zapsán pouze v tamějším Červeném seznamu jako druh R (Oprea a Sîrbu 2013).

Všivec statný je mohutná 100–150 cm vysoká bylina s přímou nerozvětvenou dutou rýhovanou lodyhou, která je hustě olistěná (Čeřovský 1999, Stonawski 1985, Podešva 2007). Listy mohou být až 40 cm dlouhé a až 10 cm široké, peřenosečné až peřenodílné, s pilovitými úkrojky, které mají špičky zubů bělavé (Hrouda 2000). Čepel je kopinatá, jedno či dvojité zpeřená. Dolní listy jsou řapíkaté, dole velmi hustě chlupaté, řapík je tím kratší, čím list roste výše na rostlině, horní listy mohou být až přisedlé (Hrouda 2000, Stonawski 1985, Podešva 2007). Květenství může být až 50 cm dlouhý hrozen, který se směrem ke špičce zužuje (Podešva 2007, Hrouda 2000). Je bohaté na listeny, které jsou delší než květy a jsou podobné listům (Hrouda 2000, Stonawski 1985). Kalich je

zvonkovitý, trubkovitý, kožovitý, pěticipý, na žilkách lysí nebo jen velmi málo chlupatý. Koruna je bledě sírově žlutá, až 28 mm dlouhá, uvnitř lysá nebo lehce chlupatá v místě připojení tyčinek, horní pysk je celokrajný, přímý, s okrouhlou špičkou, na okraji mírně huňatý, dolní pysk je pravidelně trojlaločný, nitky tyčinek u vrchu hustě chlupaté, semeník je po stranách lehce zploštělý, čnělka lehce vyniká z horního pysku (Stonawski 1985, Podešva 2007, Hrouda 2000). Semena vejcového tvaru, tupě hranatá (Hrouda 2000). Koruna i následné plody jsou delší než kalich (Stonawski 1985). Kvetे od června do srpna (Săvulescu 1960).

Jeho dnešní nejzápadnější výskyt je v NPR Porážky v Bílých Karpatech, což je jediná lokalita ve střední Evropě. Nejbližší lokality této rostliny se nacházejí několik set kilometrů ve východních a jihovýchodních Karpatech (Kuča a kol. 1992, Procházka a kol. 1983). V roce 1976 byly louky ležící nad lokalitou tohoto všivce rozorány místním JZD, které zde hospodařilo. Tímto nevhodným a nepovoleným zásahem nastala po podzimních deštích eroze půdy a svah s výskytem všivce byl téměř celý zasypán hlínou. Mimo sesutou zeminu byly nalezeny pouze dvě kvetoucí rostliny. Jejich semena byla kultivována a použita pro obnovu populace (Procházka a kol. 1983, Stonawski 1985).

Jedním ze starších předpokladů, jak se na naše území všivec statný dostal, je ve formě osiva ze zahraničí (Růžička 1987). Před tím, než vznikly železniční tratě, bylo jedno z velmi rozšířených povolání povoznictví. Ovšem s rozvojem železnice tato práce ztrácela smysl, a lidé živící se dříve touto prací se začali věnovat spíše svému blízkému okolí a hospodaření na vlastních i obecních pozemcích. Pomocí travního osiva, které v té době bylo používáno, se tak na naše území dostala údajně *Salvia austriaca*, a není tedy vylouženo, že i *Pedicularis exaltata* (Stonawski 1985).



Obrázek 1. Jedinec *P. exaltata* z rumunské lokality Ceahlau, detail květu z rumunské lokality Hangu

1.7 *Pedicularis hacquetii* Graf.

Tento všivec byl objeven v roce 1833 Ž. Grafem pod horou Črna prst ve Slovinsku, ale teprve v následujícím roce, r. 1834, byl tento druh oficiálně popsán (Dakskobler a kol. 2008). Na Slovensku byl ještě v roce 2009 zapsán v Červeném seznamu jako VU, tedy jako druh zranitelný (Dítě 2009), nyní je zde v kategorii NT, tzn. jako druh téměř ohrožený (Turis a kol. 2014). Vztahuje se zde na něj i ochrana zákonem MŽP SR č. 24/2003 Z. z. vztahující se k § 33 ods. 1 a 5 zákona v příloze č. 5. Mezi druhy chráněné jej najdeme také v Rakousku a Itálii (Mazáč 2007).

Všivec Hacquetův může být až 120 cm vysoký. Má přímou hranatou nevětvenou podélně rýhovanou lodyhu, která je ve vrchní části hustě olistěná, směrem dolů však olistění ubývá. Listy jsou střídavé, krátce řapíkaté, jedno až trojitě peřenodílné, na rubu místy krátce chlupaté (Holub a Kmeťová 1997, Mazáč 2007). Listy v horní části krátce řapíkaté až přisedlé či objímavé, hustě chlupaté. Květenství je klasovité, od spodu směrem nahoru houstne. Listeny jsou delší než květy, u spodu chlupaté, dolní listeny podobné horním listům, horní listeny kratší než květy (Holub a Kmeťová 1997). Kalich je zvonkovitého tvaru, kožovitý, na žilkách chlupatý, někdy holý, se třemi až pěti cípy,

kteře jsou brvitě. Koruna je bledě šírově žlutá, dlouhá 20-25 mm, lehce dopředu zahnutá do oblouku, uvnitř chlupatá, dolní pysk je trojlaločný, horní pysk je přímý s okrouhlou špičkou, z horní strany chlupatý, celokrajný, v místě srůstu tyčinek a někdy i pod dolním pyskem chlupatá (Holub a Kmet'ová 1997, Mazáč 2007, Săvulescu 1960). Nitky delších tyčinek u vrchu jsou hustě chlupaté, kratší tyčinky jsou méně chlupaté. Semeník je zploštělý, holý. Tobolka ze stran je lehce zploštělá, o něco delší než kalich, téměř dřevnatá, vejčitého tvaru (Holub a Kmet'ová 1997). Semena mají trojúhelníkovitý tvar. Kvete od července do srpna (Săvulescu 1960).



Obrázek 2. *P. hacquetii*, rumunská lokalita Piule

1.8 *Pedicularis comosa* L.

Na Slovensku se vyskytuje pouze na jediné lokalitě, a to na PR Vršatská Bradla v Chráněné krajinné oblasti Biele Karpaty (Kuča a kol. 1992), je zde zapsán v Červeném seznamu jako CR, tzn. jako druh kriticky ohrožený (Dítě 2009, Turis a kol. 2014), je také pod ochranou zákona MŽP SR č. 24/2003 Z. z. vztahující se k § 33 odst. 1 a 5 zákona v příloze č. 5.

Všivec chocholatý je přibližně 20–80 cm vysoký. Lodyhu má nevětvenou, přímou,

kadeřavě pýřitou, po celém stonku rovnoměrně listnatá, listy těsně pod květenstvím nahloučené. Listy střídavé, řapíkaté, dvakrát peřenosečné a kopinaté, pilovité zuby mají bělavou špičku (Holub a Kmeťová 1997, Rencová 2011). Přízemní listy mohou být až 15 cm dlouhé, řapíky listů se směrem k vrcholu zkracují, mohou být až přisedlé (Holub a Kmeťová 1997, Săvulescu 1960). Květenství je v prodlouženém klasu, husté, spodní listeny jsou delší než květy, horní listeny jsou stejně dlouhé jako květy, huňaté nebo holé (Holub a Kmeťová 1997, Rencová 2011). Květy jsou stopkaté nebo přisedlé, dlouhé cca 2,5 cm. Kalich zvonkovitý, blanitý, lysý nebo na žilkách lehce huňatý, pěticičný, pravidelný, cípy široce trojúhelníkovité a tupé (Holub a Kmeťová 1997, Rencová 2011, Săvulescu 1960). Koruna je citronově žlutá, dvakrát delší než kalich, horní pysk ohnutý do tvaru „C“, po stranách má zoubky, zakončen krátkým useknutým zobáčkem, lysý (Holub a Kmeťová 1997, Săvulescu 1960). Dolní pysk je trojlaločný, krátce chlupatý, prostřední lalok vykrojený, boční laloky kulatě trojúhelníkovité. Tobolka je skoro dvakrát delší než kalich, ze stran lehce zploštělá (Holub a Kmeťová 1997). V Rumunsku kvete od června do srpna (Săvulescu 1960), na Slovensku od května do června (Holub a Kmeťová 1997).



Obrázek 3. *P. comosa*, rumunská lokalita Piatra Cetii

2 Cíle práce

Cíle práce jsou:

1. Prostudovat molekulární variabilitu a zrekonstruovat evoluční historii komplexu *P. exaltata* a *P. hacquetii* v Karpatech.
2. Zjistit, jestli tato rekonstrukce evoluční historie může pomoci k vyřešení otázek původu populace *P. exaltata* na lokalitě NPR Porážky v Bílých Karpatech. A pokud tato rekonstrukce bude úspěšná, tak vyřešit taxonomii u *P. exaltata* a *P. hacquetii*.
3. Zhodnotit význam populace *Pedicularis exaltata* na lokalitě NPR Porážky pro historii vegetace a biogeografii bělokarpatské flóry.

3 Materiál a metody

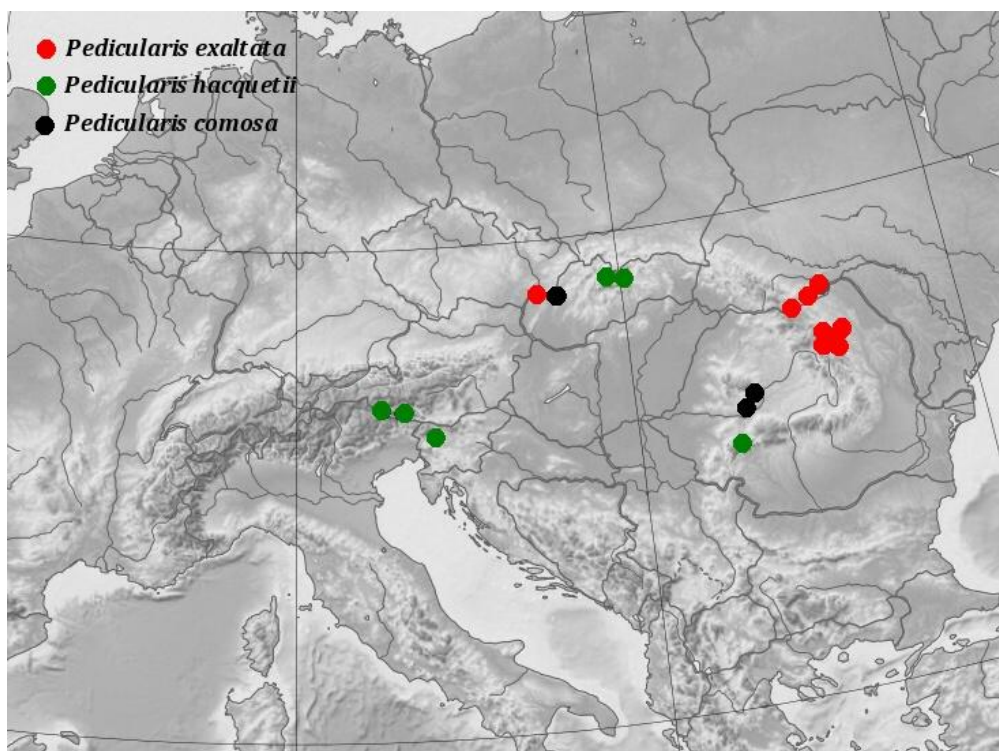
3.1 Sběr materiálu

Pro studium *Pedicularis exaltata* bylo sebráno 126 vzorků na 14 lokalitách vyskytujících se na území České republiky, Slovenské republiky, Rumunska, Ukrajiny, Rakouska a Slovinska (obr. 4, tab. 1). Oblasti výskytu v Rumunsku byly lokalizovány ve spolupráci s brašovským profesorem V. A. Indreicem. Z těchto míst byly vyřazeny všechny lokality, na kterých se podle něj a podle dalších místních botaniků *P. exaltata* již nevyskytuje, ať už díky změnám tamějších biotopů či úplné devastaci lokality. Podle tamějších možností byly sesbírány vzorky. Lokality na Slovensku byly vybírány podle záznamů výskytu *P. hacquetii* v knize Flóra Slovenska. Z ukrajinských lokalit mi byly vzorky poslány tamějšími botaniky ze všech lokalit, na kterých se *P. exaltata* vyskytuje. Lokality v Alpách byly vybírány na základě informací poskytnutých Doc. Wilfriedem Franzem (Alpen Adria Universität, Klagenfurt).

Na každé lokalitě bylo odebráno 10 vzorků představovanýchmi dvěma nejmladšími listy. Sesbírané listy byly zabaleny do kousku savého papíru, který byl popsán datem, názvem lokality, druhem a číslem vzorku. Vzorky byly následně uloženy do papírové obálky, která byla popsána lokalitou a nalezeným druhem. Tato obálka byla uložena do vzduchotěsné krabičky naplněné silikagelem. Na každé lokalitě byly posbírány vzorky z rostlin vzdálených od sebe co nejvíce podle velikosti daných lokalit, aby se co nejvíce zabránilo sběru mateřské a dceřiné rostliny. Z rostlin, které měli květy, bylo odebráno po jednom květu i s kalichem. Na lokalitách, na kterých legislativa dané země umožňovala sběr rostlin, byly odebrány celé rostliny, jež jsou nyní uloženy v herbáři Jihočeské univerzity (čísla položek CBFS 6074–6979). Po návratu zpět do ČR byly vzorky uchovávány v mrazáku až do jejich následného zpracování.

Tabulka 1. Lokality, na kterých byly vzorky sesbírány

Číslo lokality	ID	Počet rostlin	Druh	Oblast	Stát	Nadmořská výška	Severní zeměpisná šířka	Východní zeměpisná délka
1	VAP	10	<i>P. exaltata</i>	Bílé Karpaty, Vápenky	CZE	600	48°53.267'N	17°37.437'E
2	SP	10	<i>P. exaltata</i>	Prutsko-Siretské Meziříčí, Spas'ka	UKR	400-450	48°17.938'N	25°46.762'E
3	SAR	10	<i>P. exaltata</i>	Bukovinské Karpaty, Sarata	UKR	1096	47°44.253'N	24°59.563'E
4	SUR	10	<i>P. exaltata</i>	Bukovinské Karpaty, Shurdin	UKR	1118	47°57.778'N	25°13.102'E
5	R05	10	<i>P. exaltata</i>	Muntii Stanisoare, Ceahlau	RO	625	47°04.488'N	25°57.953'E
6	R06	10	<i>P. exaltata</i>	Muntii Stanisoare, Bistricioara	RO	653-747	47°02.953'N	25°56.232'E
7	R08	10	<i>P. exaltata</i>	Muntii Stanisoare, Hangu	RO	905-920	47°07.617'N	26°03.964'E
8	R09	10	<i>P. exaltata</i>	Muntii Stanisoare, Sihla	RO	804-815	47°10.835'N	26°09.417'E
9	R02	10	<i>P. hacquetii</i>	Muntii Retezat, Piule	RO	1820	45°18.448'N	22°54.573'E
10	RSK01	10	<i>P. hacquetii</i>	Vysoké Tatry, Popradské pleso	SK	1519	49°09.294'N	20°04.855'E
11	RSK02	10	<i>P. hacquetii</i>	Vysoké Tatry, Osobitá	SK	1600	49°15.625'N	19°43.219'E
12	CP	5	<i>P. hacquetii</i>	Julijske Alpe, Črna Prst Massif	SK	1610	46°14'00.3'N	13°56'16.4'E
13	WA	5	<i>P. hacquetii</i>	Carnische Alpen	AUT	1480	46°37'47.6'N	12°50'59.6'E
14	PP	5	<i>P. hacquetii</i>	Carnische Alpen	AUT	1500	46°36'21.9'N	12°56'35.7'E
15	VRS	5	<i>P. comosa</i>	Biele Karpaty, Vršatec	SK	790	49°04.753'N	18°09.967'E
16	R04	1	<i>P. comosa</i>	Cheile Turzii	RO	529	46°33.979'N	23°40.417'E
17	R03	10	<i>P. comosa</i>	Muntii Metaliferi, Piatra Cetii	RO	890	46°15.624'N	23°30.013'E



Obrázek 4. Mapa lokalit zkoumaných populací (podkladová mapa převzata z Wikipedia – volný zdroj, upravena)

3.2 Izolace DNA

Vzorky byly nadrceny ve 2ml mikrozkušavkách ve mlýnku Retsch MM400 (wolframkarbidové mlecí kuličky o průměru 3mm, 2 minuty, frekvence 30/s). Izolace byla prováděna pomocí komerčního kitu Invisorb Spin Plant Mini Kit (www.strattec.com), pouze s menšími změnami ve způsobu eluce. Na rozdíl od kitového protokolu bylo do každé mikrozkušavky nalito 50 µl Bufferu AE, poté proběhla inkubace 30 minut při pokojové teplotě. Po následné centrifugaci, která proběhla podle protokolu, byly filtráty opět přepipetovány na kolonku a pro zvýšení koncentrace DNA nechány ještě 10 minut inkubovat při pokojové teplotě. Izolovaná DNA pak byla skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Měření koncentrace DNA bylo prováděno pomocí přístroje NanoDrop 2000c značky Thermo Scientific.

3.3 Metoda AFLP

Rumunská lokalita Cheile Turzii byla vyřazena z metody AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) pro nedostatečný počet nalezených a sesbíraných vzorků. Kromě restrikce byly všechny fáze metody AFLP kontrolovány v elektroforéze na agarózovém

gelu (0,8 µl GelRed, 2,0 µl produktu, 4,0 µl ladderu, 120 V/30 minut). AFLP bylo prováděno pomocí AFLP kitů od firmy Invitrogen. Pro všechny reakce byl používán termocycler Biometra T3000, detailní reakční podmínky pro preselektivní a selektivní amplifikaci jsou shrnuty v tab. 3.

Nezávisle na prvním běhu byl u 10 % vzorků proveden i druhý běh. Z každé lokality byl vybrán vždy první vzorek v pořadí. Průběh reakcí probíhal za zcela stejných podmínek jako první běh.

Restrikční reakce byla připravována v objemu 5,0 µl a skládala se z 1,1 µl vody, 1,0 µl 5x Reaction Buffer, 0,4 µl směsi enzymů EcoRI/Mse a 2,5 µl DNA. DNA byla většinou v koncentraci 100 ng/µl. Pokud měl vzorek nízkou koncentraci, nebyla do restrikční reakce dána voda a objem vzorku byl navýšen o 1,1 µl DNA. Byl využit kit AFLP® Core Reagent Kit I. Vzorky byly promíchány a poté byly na krátký okamžik zcentrifugovány. Vloženo do termocycleru. Restrikce probíhala 3 hodiny při 37 °C.

Ligační směs byla připravena smícháním 4,8 µl Adaptor/Ligation Solution a 0,2 µl T4 DNA ligázy. Ta byla následně přidána k roztoku do proběhlé restrikce. Byl využit kit AFLP® Core Reagent Kit I. Ligace probíhala 16 hodin při 22 °C.

Preselektivní amplifikace byla připravena ze 4,0 µl Preamplifikačního mixu, 0,5 µl PCR Buffer (10x), 0,1 µl DNA polymerázy a 0,4 µl vzorku po ligaci. Byl využit kit AFLP® Pre-amp Primer Mix I. Podmínky preamplifikace jsou shrnuty v tab. 4.

Selektivní amplifikace obsahovala 2,55 µl vody, 0,50 µl PCR Buffer (10x), 0,10 µl dNTP, 0,25 µl fluorescenčně značeného EcoRI primeru, 0,25 µl MseI primeru, 0,10 µl DNA polymerázy a 1,25 µl zředěného roztoku z již proběhnuté preselektivní amplifikace (zředění bylo v poměru 1:10, preselektivní amplifikace:voda). Vždy byly namíchány 4 směsi pro 4 různé primerové kombinace (tab. 2). Podmínky pro selektivní amplifikaci jsou shrnuty v tab. 3.

Tabulka 2. Primerové kombinace, které byly použity v selektivní amplifikaci

Barva	Fluorescenčně barvené primery EcoRI	Nebarvené primery MseI
Modrá	ACG	CCA
Zelená	AAC	CAC
Červená	ACA	CCA
Žlutá	AGG	CGA

Tabulka 3. Reakční podmínky AFLP

Typ reakce	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas
Preselektivní amplifikace	1×	72	2min
	20×	94	30s
		56	30s
		72	2min; ramping 2°C/1s
		60	30min
	1×	10	hold
Selektivní amplifikace	1×	94	2min
		65	30s
		72	2min; ramping 2°C/1s
		94	1s
	8×	64–56	30s; touch-down by 1°C
		72	2min; ramping 2°C/1s
	23×	94	1s
		56	30s
		94	2min; ramping 2°C/1s
	1×	60	30min
	1×	10	hold

Po selektivní amplifikaci bylo potřeba vzorky přesrážet. Nejprve byly vzorky smíchány tak, že od jednoho vzorku byly dány do jedné mikrozkušavky všechny barevné kombinace, a to v poměru 1:1:1:1. Pokud ovšem některá z kombinací v daném setu vykazovala na agarózovém gelu méně intenzivnější signál než ostatní, byl její poměr zvednut 2x oproti ostatním. Přesrážení probíhalo v 1,5ml mikrozkušavce. Na její stěnu byl dán 1 µl octanu sodného. Do kapky octanu sodného byly dány 3,0 µl směsi PCR produktů, poté bylo přidáno 25 µl čistého 96% ethanolu. Krátce promícháno na vortexu a krátce centrifugováno. Poté byly vzorky dány do mrazáku na 20 minut/20 °C. Následně byly vzorky centrifugovány na 30 minut/RPM 13800/4 °C. DNA zůstala usazena na dně mikrozkušavky, zbytek roztoku byl opatrně vylit. Bylo přidáno 100 µl 70% ethanolu. Pak byly vzorky centrifugovány na 5 minut/RPM 13800/4 °C. DNA stále zůstala na dně mikrozkušavky, zbytek roztoku byl opět opatrně vylit. Mikrozkušavky byly ponechány otevřené při pokojové teplotě po dobu 5 minut, poté byly dány do inkubátoru s teplotou 65 °C a hlídány, dokud se neodpařily poslední zbytky ethanolu. Pak byly mikrozkušavky vyňaty a uzavřeny. Skladování před odesláním na další zpracování probíhalo při 4 °C

v lednici. Fragmentační analýza byla prováděna firmou SEQme s.r.o.

3.4 Sekvenování vybraných úseků

Vztahy mezi jednotlivými vzorky byly analyzovány sekvenací 3 úseků DNA. Jako zkoumané oblasti byly vybrány tyto úseky: ITS (jaderné DNA), *rpl32* (chloroplastové DNA), *trnT-L* (chloroplastové DNA). Z každé populace byly sekvenovány 3 vzorky.

PCR byla připravována v objemu 10 µl a její složení bylo 2,2 µl vody, 1,2 µl forward primeru o koncentraci 2,5 pmol, 1,2 µl reverse primeru v koncentraci 2,5 pmol, 5µl Plain PP Master Mix (Top Bio) a 0,4 µl DNA. Použité primery byly následující: ITS1P (5'–CTTTATCATTTAGAGGAAGGAAG–3') (Selosse a kol. 2002) v kombinaci s ITS4 (5'–TCCTCCGCTTATTGATATGC–3') (White a kol. 1990), *trnT2F* (5'–TCCTCCGCTTATTGATATGC–3') v kombinaci s *trnL^{UAA}* (5'–TCTACCGATTTCGCCATATC–3') (Taberlet a kol. 1991), *rpl32* (5'–CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT C–3') v kombinaci s *trnL^{UAG}* (5'–CTG CTT CTT AAG AGC AGC GT–3') (Shaw a kol. 2007).

PCR reakce proběhla na termocycleru BIOER XP CYCLER. Přesné reakční podmínky jsou v tab. 4.

Po kontrole na agarózovém gelu (120V/30min), byly tyto PCR produkty přečištěny metodou ExoSAP - smícháním 1,5 µl ExoSAP a 5,0 µl PCR produktu. Reakce probíhala v termocycleru 15 minut při 37 °C, a poté 15 minut při 85 °C. Pomocí této purifikace byly odstraněny zbylé primery a neinkorporované nukleotidy.

Následně byla připravena směs pro sekvenační reakci z 5,5 µl vody, 2,5 µl vybraného primeru a 2,0 µl přečištěného PCR produktu. Každý genomový segment byl sekvenován z obou konců, tzn. vždy byly namíchány dvě sekvenční reakce pro daný naamplifikovaný úsek. Sekvenace byla prováděna firmou SEQme s.r.o.

Tabulka 4. Reakční podmínky PCR

	ITS		<i>rpl32</i>		<i>trnT-L</i>	
	Teplota	Čas	Teplota	Čas	Teplota	Čas
	(°C)	(s)	(°C)	(s)	(°C)	(s)
Počáteční denaturace	95	300	95	180	95	300
Počet cyklů v následujících třech fázích	32		35		32	
Denaturace	95	60	95	45	95	60
Annealing	52	60	51	60	62	60
Elongace	72	90	72	60	72	60
Konečná elongace	72	600	72	600	72	600

3.5 Zpracování molekulárních dat

Hrubá data z fragmentační analýzy byla vyhodnocena pomocí programu GeneMarker 1.80. Byla zde označována přítomnost fragmentů, které měly intenzitu 50 (*Peak Detection Threshold*) a vyšší. Byla provedena nezávislá analýza AFLP u 10 % vzorků. Získané výsledky byly hodnoceny nezávisle na zpracování prvního běhu obou metod. U fragmentační analýzy byly vyloučeny fragmenty, které nebyly hodnoceny stejně u obou vzorků z prvního i druhého běhu. Poté byl spočítán *error rate*, tzn. podíl fragmentů, které byly v obou bězích nesterjné hodnoceny. Následně byly z tabulky odstraněny fragmenty, které měly frekvenci menší než *error rate*, který byl roven 3,64 %. Odraněny tak byly všechny fragmenty s frekvencí rovnou třem nebo nižší.

Výsledky sekvenační analýzy byly upraveny v programech FinchTV 1.4.0, poté jednotlivé 5'-konce a 3'-konce vzorků byly dány dohromady v programu DNABaser 3.5.4.2. Finální úprava takto získaných sekvencí probíhala v programu BioEdit 7.1.3.0.

3.6 Analýza dat

3.6.1 AFLP

Z binárních AFLP dat ve formě přítomnosti/nepřítomnosti jednotlivých fragmentů byla spočítána matice distancí mezi jednotlivými vzorky. V tomto výpočtu byl použit

Jaccardův koeficient (Gower a Legendre 1986) jakožto míra podobnosti mezi každými dvěma vzorky (X a Y):

$$J_j = a / (a + b + c),$$

kde J_j je Jaccardův index, a je počet fragmentů, které se vyskytují v obou vzorcích, b je počet fragmentů, které se vyskytují pouze ve vzorku X a c je počet fragmentů, které se vyskytují pouze ve vzorku Y. Tato míra podobnosti je tedy asymetrická, tj. uvažuje podobnost vzorků pouze na základě dvojité presence fragmentů. Dvojité absence jsou ignorovány.

Na základě distanční matice byla spočítána analýza molekulární variance (AMOVA; Excoffier a kol. 1992). Tato analýza rozložila variabilitu v AFLP datech na tři hierarchicky vnořené úrovně: (1) mezi druhy, (2) mezi populacemi v rámci druhů a (3) uvnitř populací. Statistická významnost dvou hierarchicky vyšších variančních komponent (i a ii) byla navíc otestována Monte-Carlo permutačním testem. Z distanční matice byla dále spočítána analýza hlavních koordinát (PCoA; Šmilauer a Lepš 2014). Tato metoda slouží ke shrnutí variability v datech pomocí několika málo proměnných (hlavních koordinát), které lze geometricky zobrazit v n -rozměrném prostoru. Hlavní koordináty jsou seřazené sestupně podle proporce vysvětlené variability v datech (první vysvětluje nejvíce variability, druhá méně, ... poslední nejméně), přičemž jednotlivé koordináty jsou na sobě lineárně nezávislé. Tedy, první koordináta je taková proměnná, která vysvětluje nejvíce variability v mnohorozměrných datech. Druhá koordináta je proměnná, která je nezávislá na první koordinátě a zároveň vysvětluje nejvíce variability v datech po odečtení vlivu první koordináty. Třetí koordináta je nezávislá na lineární kombinaci prvních dvou koordinát a vysvětluje nejvíce variability po odečtení jejich vlivu. Atd. V ideálním případě je možné popsat většinu variability v datech několika prvními (dvěma, třemi) hlavními koordinátami. Analýza hlavních koordinát byla spočítána jednak pro celý dataset, jednak pro podsoubor, který neobsahoval vzorky *P. comosa*. V obou případech byly zobrazeny první tři osy na ordinačních diagramech, přičemž v prvním případě byly grafickými symboly odlišeny jednotlivé předpokládané druhy, zatímco ve druhém případě, byly odlišeny populace.

Hrubá data popisující presence/absence fragmentů byla dále analyzována pomocí Bayesovského shlukovacího algoritmu implementovaného v programu Structure 2.3 (Pritchard a kol. 2000, Falush a kol. 2007). Počet shluků (K) byl odhadnut pomocí 100 000 běhů algoritmu, přičemž prvních 20 000 sloužilo jako „burnin“ a nebylo

započítáno do konečného výsledku. Byl použit model příměsí („admixture model“) a nastavení recesivních alel. Algoritmus byl spuštěn 20× pro všechna K od 1 do 10. Nejvěrohodnější počet shluků byl určen pomocí přístupu Evanna a kol. (2005). Finální shlukovací analýza pro nejvěrohodnější počet shluků byla provedena se stejným nastavením algoritmu. Tyto analýzy byly provedeny dvakrát, jednak pro všechny vzorky analyzované AFLP a jednak s vyloučením vzorků *P. comosa*.

Z hrubých dat popisujících presence/absence fragmentů byly navíc spočítány doplňující parametry pro jednotlivé populace: genová diverzita (Nei 1987) a podíl vzácných alel „frequency down-weighted marker value“ (DW index; Schönswetter a Tribsch 2005). První parametr vypovídá, jak je populace geneticky variabilní, druhý indikuje množství vzácných alel typických pro jedince z dané populace, ale nevyskytujících se nikde jinde. Vysoký DW index indikuje relativně staré, od ostatních populací izolované populace.

AFLP data byla analyzována v programu R, verze (R Core Team 2014) - balíčcích ade4 (Dray a Dufour 2004) a vegan (Oksanen a kol. 2014). Pro výpočet genové diverzity a DW indexu byl použit R skript AFLPdat (Ehrich 2006).

3.6.2 Sekvence DNA

Sekvence jednotlivých sekvenovaných úseků byly zalignovány algoritmem ClustalW v programu BioEdit 7.1.3.0. Z alignmentů byly následně odstraněny neúplné sekvence, které nebyly dále analyzovány (tab. 5). Pro každý alignment chloroplastových úseků *rpl32* a *trnT-L* byla sestavena haplotypová síť pomocí metody statistické parsimonie (Posada a Crandall 2001, Clement a kol. 2002) v programu PopArt, verze 1.7 (<http://popart.otago.ac.nz>). Při sestavování sítě byly uvažovány pouze nukleotidové substituce. Variabilita charakteru mikrosatelitů (rozdíly v počtu jednobázových repetice) byla extrahována z alignmentů (tab. 7). Následně byla spočtena molekulární nepodobnost mezi jednotlivými vzorky na základě rozdílů délek jednotlivých mikrosatelitů podle metody Bruvo a kol. (2004) v R balíčku poppr (Kamvar et al. 2014). Matice nepodobností byla následně analyzována pomocí analýzy hlavních koordinát.

K sekvencím jaderného úseku ITS byly staženy sekvence příbuzných druhů rodu *Pedicularis* z databáze GenBank (tab. 6). Identické sekvence z vlastních vzorků byly sloučeny v rámci lokality. Stažená i sekvenační data byla sloučena do jednoho souboru, který byl alignován algoritmem ClustalW v programu BioEdit 7.1.3.0. Z výsledného alignmentu byl zkonstruován bayesovský fylogenetický strom v programu MrBayes, verze

3.2.6 (<http://mrbayes.sourceforge.net/index.php>). Pro konstrukci stromu byl použit model GTR+Gamma běžící 2000000 generací, uložena byla každá 1000. Výsledný strom byl získán jako většinový konsenzus uložených stromů, přičemž prvních 25 % dat nebylo pro konsenzus použito („burnin“).

Tabulka 5. Počet sekvencí v jednotlivých úsecích a počet vzorků použitých v metodě AFLP

Populace	Počet sekvencí v úseku <i>rpl32</i>	<i>rpl32</i>	Počet sekvencí v úseku <i>trnT-L</i>	<i>trnT-L</i>	Počet sekvencí v úseku ITS	ITS, nukleotid 473	Počet vzorků použitých v metodě AFLP
1	3	rA1	3	tA1	2	C	10
2	3	rB2	2	tA3	3	C	10
3	3	rB2	2	tA1, tA3	3	G	10
4	3	rB2	3	tA1	3	G	10
5	3	rA1,rB1	3	tA1,tA4	3	C, D	10
6	3	rA1	3	tA1	3	C	10
7	3	rB1	3	tA4	3	C	10
8	3	rA1, rA2	3	tA1	3	C	10
9	3	rA1	1	tA5	3	C	10
10	3	rA1	3	tA2	1	C	10
11	3	rA1	2	tA1, tA2	3	C, G	10
12	3	rA1	3	tA1	3	C	0
13	3	rA1	3	tA1	3	C	0
14	3	rA1	3	tA4	3	C	0
15	2	rC2	2	tB	2	T	5
16	3	rC4	3	tB	3	T	0
17	3	rC1, rC3	3	tB	3	T	10

Tabulka 6. ITS sekvence druhů rodu *Pedicularis* stažené z databáze GenBank použité ke konstrukci fylogenetického stromu.

GenBank kód	Druh
HG424173.1	<i>Pedicularis palustris</i>
AY949679.1	<i>Pedicularis foliosa</i>
HG424081.1	<i>Pedicularis atropurpurea</i>
AY949661.1	<i>Pedicularis tuberosa</i>
AY949652.1	<i>Pedicularis kernerii</i>
HG424116.1	<i>Pedicularis elongata</i>
HG424079.1	<i>Pedicularis ascendens</i>
HG424138.1	<i>Pedicularis julica</i>
HG424117.1	<i>Pedicularis eriantha</i>
HG424210.1	<i>Pedicularis sibirica</i>
HG424097.1	<i>Pedicularis comosa</i>
HG424236.1	<i>Pedicularis venusta</i>
HG424069.1	<i>Pedicularis altaica</i>
HG424238.1	<i>Pedicularis villosa</i>
HG424098.1	<i>Pedicularis compacta</i>

Tabulka 7. Variabilita délek chloroplastových mikrosatelitů nalezená v cpDNA v sekvencích *rpl32* a *trnT-L* u komplexu *Pedicularis*

		T	A	A	T	A	T	G	G	T	G	C	T
vzorek	pop.	r219	r225	r286	r308	r386	r550	r556	r564	t181	t193	t491	t542
Pd1-R.fas	1	5	3	10	10	2	5	6	4	11	1	1	7
Pd3-R.fas	1	5	3	10	10	2	5	6	4	11	1	1	7
Pd11-R.fas	6	5	3	10	10	2	5	6	4	11	1	1	7
Pd12-R.fas	6	5	3	10	10	2	5	6	4	11	1	1	7
Pd13-R.fas	6	5	3	10	10	2	5	6	4	11	1	1	7
Pd21-R.fas	8	5	3	10	10	2	5	6	4	11	1	1	7
Pd22-R.fas	8	5	3	10	11	2	5	6	4	11	1	2	7
Pd23-R.fas	8	5	3	10	10	2	5	6	4	11	1	1	7
Pd31-R.fas	7	5	3	11	10	2	6	5	4	11	1	2	7
Pd32-R.fas	7	5	3	11	10	2	6	5	4	11	1	2	7
Pd33-R.fas	7	5	3	11	10	2	6	5	4	11	1	2	7
Pd41-R.fas	5	5	3	10	10	2	5	6	4	11	1	1	7
Pd42-R.fas	5	5	3	10	10	2	5	6	4	11	1	1	7
Pd43-R.fas	5	5	3	11	10	2	6	5	4	11	1	2	7
Pd62-R.fas	9	5	3	9	10	2	5	6	4	11	1	2	7
Pd71-R.fas	11	5	3	9	10	2	5	6	4	11	1	1	7
Pd73-R.fas	11	5	3	9	10	2	5	6	4	11	1	2	7
Pd81-R.fas	10	5	3	9	10	2	5	6	4	11	1	2	7
Pd92-R.fas	2	5	3	10	9	2	5	6	4	11	1	2	7
Pd94-R.fas	2	5	3	10	9	2	5	6	4	11	1	2	7
Pd103-R.fas	3	5	3	11	10	2	6	6	5	11	1	2	7
Pd104-R.fas	3	5	3	11	10	2	6	5	4	11	1	2	7
Pd112-R.fas	4	5	3	11	10	2	6	5	4	11	1	2	7
Pd113-R.fas	4	5	3	11	10	2	6	5	4	11	1	2	7
Pd114-R.fas	4	5	3	11	10	2	6	5	4	11	1	2	7
CP1_ <i>rpl32</i>	12	5	3	8	10	2	5	6	4	12	1	2	7
CP2_ <i>rpl32</i>	12	5	3	8	10	2	5	7	4	12	1	2	7
CP3_ <i>rpl32</i>	12	5	3	8	10	2	5	6	4	12	1	2	7
CP4_ <i>rpl32</i>	12	5	3	8	10	2	5	6	4	12	1	2	7
CP5_ <i>rpl32</i>	12	5	3	8	10	2	5	6	4	12	1	2	7
PP1_ <i>rpl32</i>	14	5	3	10	10	2	5	6	4	11	1	2	7
WA1_ <i>rpl32</i>	13	5	3	8	10	2	5	6	5	12	1	2	7
WA2_ <i>rpl32</i>	13	5	3	8	10	2	5	6	4	12	1	2	7
WA3_ <i>rpl32</i>	13	5	3	8	10	2	5	6	4	12	1	2	7
WA4_ <i>rpl32</i>	13	5	3	8	10	2	5	7	5	12	1	2	7
WA5_ <i>rpl32</i>	13	5	3	8	10	2	5	7	5	12	1	2	7
Pd51-R.fas	17	4	4	12	10	1	5	7	4	7	2	2	6
Pd52-R.fas	17	4	4	11	10	1	5	7	4	7	2	2	6
Pd53-R.fas	17	4	4	11	10	1	5	7	4	7	2	2	6
PedC2-R	15	4	3	10	10	1	5	7	4	7	2	2	6
PedC3-R	15	4	3	10	10	1	5	7	4	7	2	2	6
Pd91-R.fas	16	4	4	12	10	1	6	6	4	7	2	2	6

4 Výsledky

4.1 AFLP

Celkem bylo analyzováno 125 jedinců, pomocí 4 primerových kombinací, jimiž bylo získáno celkem 838 hodnotitelných fragmentů.

4.1.1 AMOVA

Analýza molekulární variance AFLP dat (AMOVA) pro vzorky všech tří druhů ukazuje, že variabilita mezi všemi zkoumanými druhy je spíše nízká (13,38 %) a mezi populacemi v rámci druhů je ještě nižší. Vnitropopulační variabilita je velmi vysoká (tab. 8).

V analýze molekulární variance AFLP dat pro vzorky klasifikované jako *P. exaltata* a *P. hacquetii* je variabilita mezi populacemi vyšší než mezi druhy a vnitropopulační rozdíl je u nich opravdu vysoký (tab. 9). V obou analýzách jsou komponenty variability na obou hierarchicky vyšších úrovních průkazně vyšší než nula ($p < 0,05$).

Tabulka 8. Analýza molekulární variance AFLP dat pro vzorky všech tří druhů

Zdroj variability	Procento variability	p *
Mezi druhy	13,38%	0,003
Mezi populacemi v rámci druhů	11,59%	<0,001
Uvnitř populací	75,03%	

* pravděpodobnost, že variabilita na dané úrovni je nulová

Tabulka 9. Analýza molekulární variance AFLP dat pro vzorky klasifikované jako *P. exaltata* a *P. hacquetii*

Zdroj variability	Procento variability	p *
Mezi druhy	5,22 %	<0,001
Mezi populacemi v rámci druhů	7,48 %	<0,001
Uvnitř populací	87,30 %	

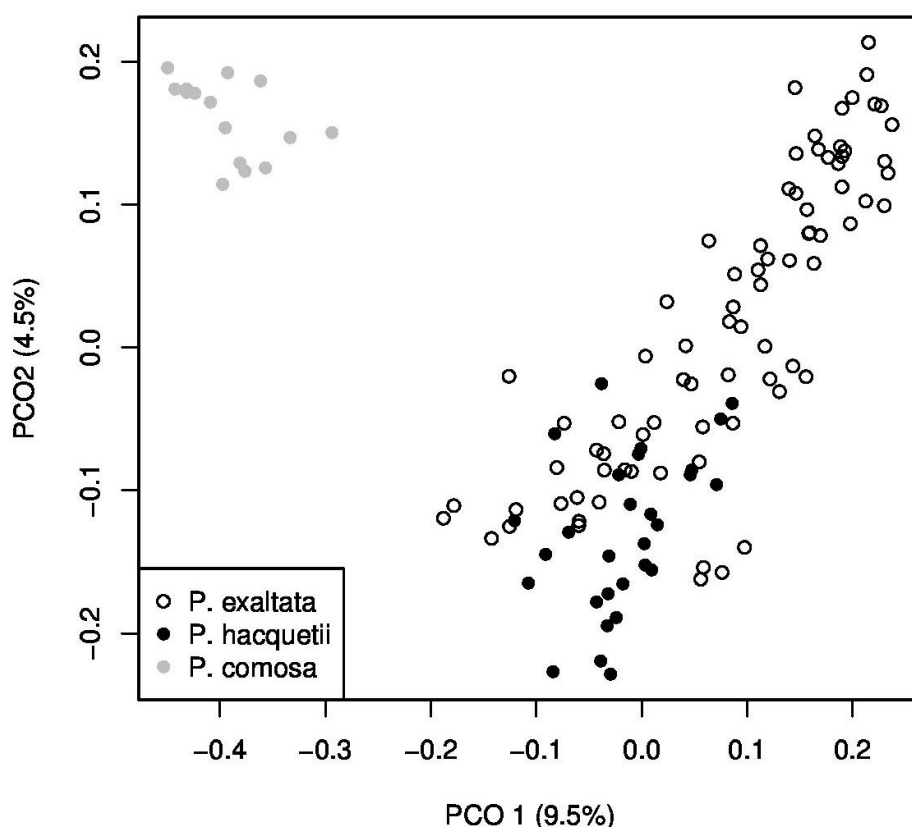
* pravděpodobnost, že variabilita na dané úrovni je nulová

4.1.2 Analýza hlavních koordinát (PCoA)

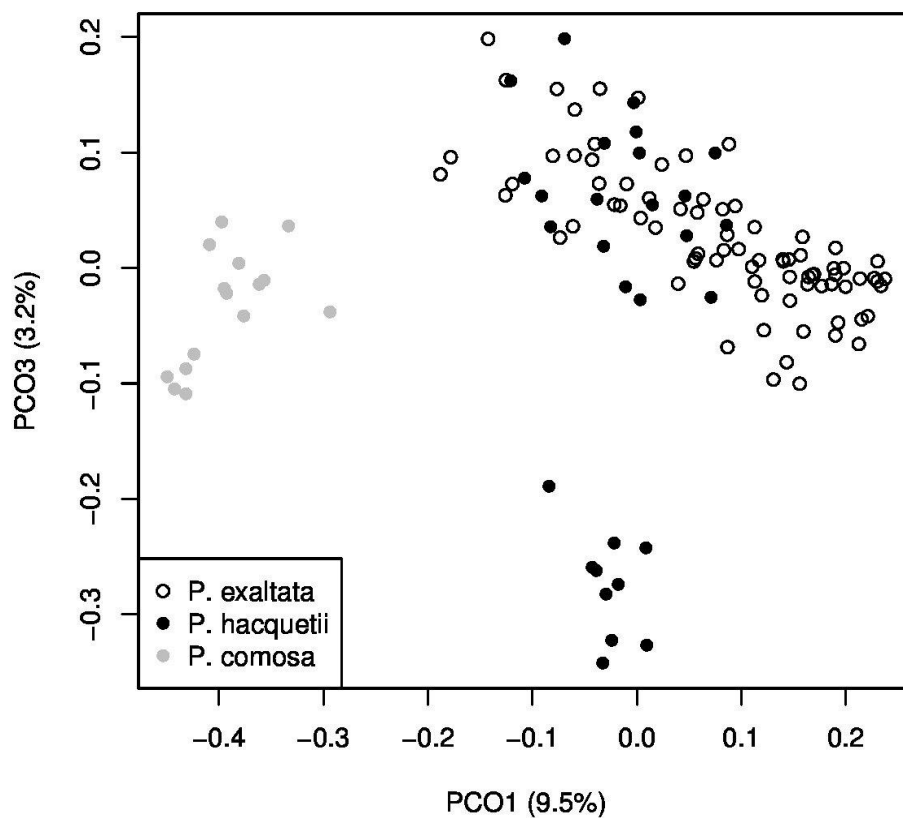
Při porovnávání všech tří zkoumaných druhů pomocí analýzy hlavních koordinát bylo zjištěno, že druh *P. comosa* se výrazně odlišuje (obr. 5). Vzorky *P. exaltata* a *P. hacquetii*

spolu tvoří jednu velkou skupinu, v níž se pozice vzorků obou druhů z části překrývají. *P. exaltata* a *P. hacquetii* se neodlišují ani na třetí ordinační ose (obr. 6), kde se však výrazně odlišuje část vzorků *P. hacquetii* od většiny vzorků obou druhů.

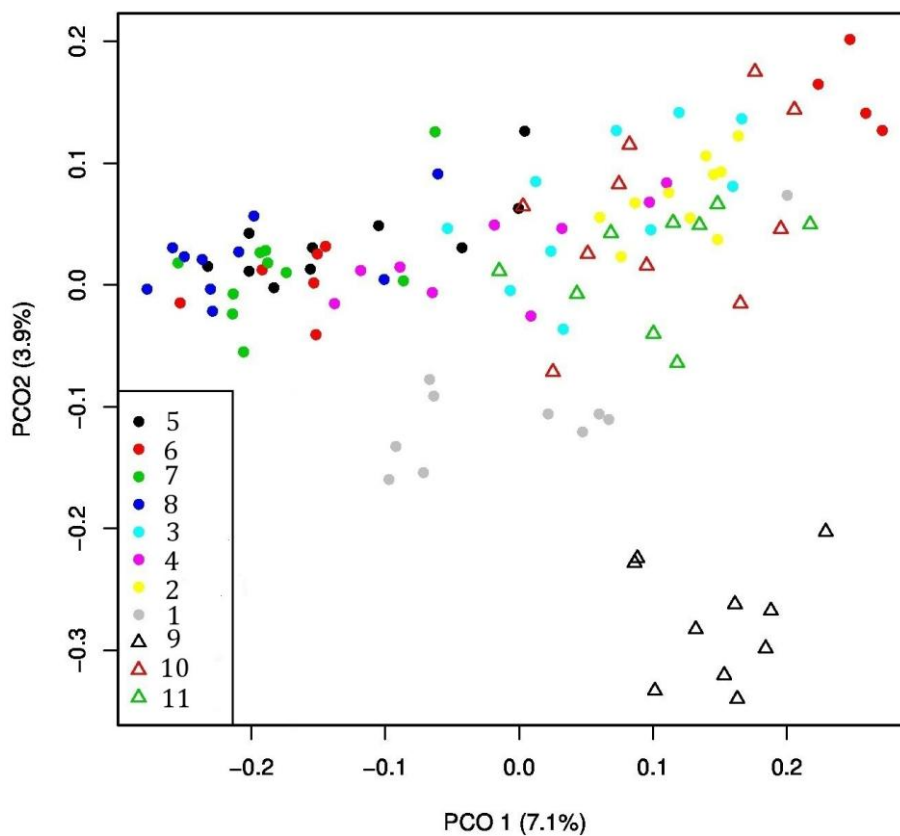
V analýze obou koordinát populací *P. exaltata* a *P. hacquetii* se v první a třetí ose většina populací má sklon držet více méně u sebe, kromě populace na lokalitě Piule v Rumunsku (9), která se zřetelně oddělila (obr. 7). Vnitropopulační variabilita ze všech lokalit je zde však značná. Česká populace *P. exaltata* z Bílých Karpat (1) se částečně odlišuje od rumunských a ukrajinských populací na druhé a třetí koordinátě. Výjimku tvoří jeden vzorek, který je na třetí ose mezi pomíchanými ukrajinskými a rumunskými populacemi (obr. 8). V obou analýzách (obr. 7 a 8) se od sebe poněkud odlišují rumunské i ukrajinské populace *P. exaltata*. Výjimku tvoří rumunská lokalita Bistricioara (6), která se zřetelně dělí na dvě části, kdy se šest vzorků drží u rumunských populací a čtyři vzorky odskakují na opačnou stranu lehce až za vzorky z Ukrajiny.



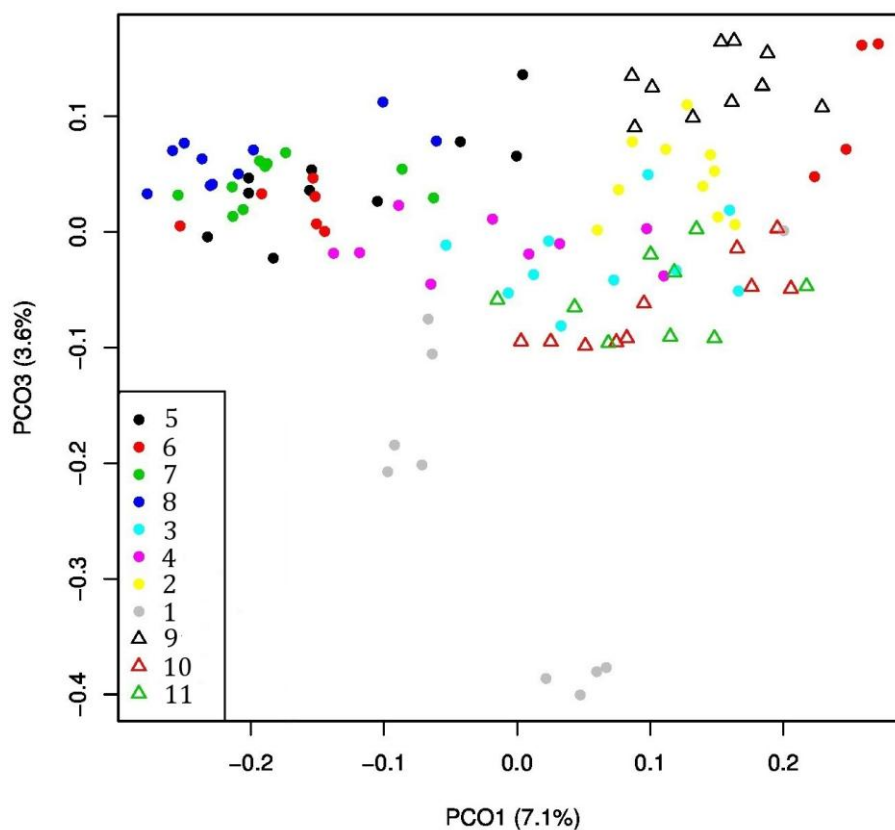
Obrázek 5. Analýza hlavních koordinát (PCoA) jednotlivých rostlin, 1. a 2. ordinační osa. Symboly vzorků jsou odlišeny podle druhové příslušnosti.



Obrázek 6. PCoA porovnání 1. a 3. koordinanty jednotlivých rostlin. Symboly vzorků jsou odlišeny podle druhové příslušnosti.



Obrázek 7. Analýza hlavních koordinant (PCoA) jednotlivých rostlin druhů *P. exaltata* a *P. hacquetii*, 1. a 2. ordinační osa. Symboly vzorků jsou odlišeny podle druhové příslušnosti. Čísla u symbolů označují konkrétní populace.



Obrázek 8. PCoA jednotlivých rostlin druhů *P. exaltata* a *P. haquetii*, 1. a 3. ordinační osa. Symboly vzorků jsou odlišeny podle druhové příslušnosti.

4.1.3 DW index a genová diverzita

Nejvyšší genová diverzita byla zaznamenána u ukrajinské populace Shurdin (4), a to 0.200, s podílem variabilních markerů 0.615 (tab. 9). Nejnižší genová diverzita je u rumunské populace oblasti Sihla (8) o hodnotě 0.072 s podílem variabilních markerů 0.241. Podíl variabilních markerů jedinců a hodnota genové diverzity na lokalitě Vápenky je mírně podprůměrná v porovnání s ostatními populacemi.

DW index počítaný z průměrů *P. exaltata* a *P. hacquetii* (tab. 10) dosahuje nejvyšší hodnoty u rumunské populace na lokalitě Piule (9), a to 683.132, a nejnižší hodnotu 166.227 má rumunská populace v oblasti Hangu (7). DW index na lokalitě Vápenky (1) je mírně nadprůměrný.

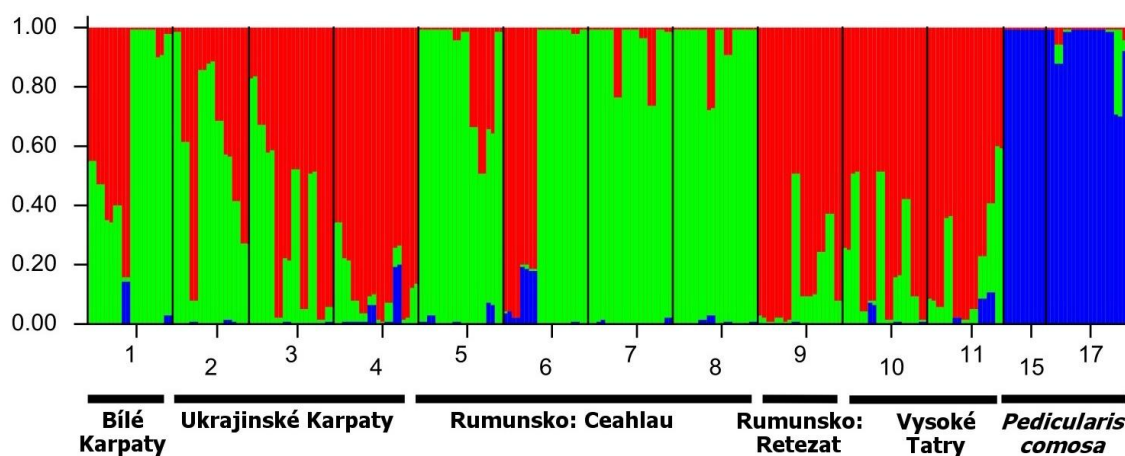
Tabulka 10. Genová diverzita a průměrný podíl vzácných alel populací *P. exaltata* a *P. hacquetii*

Populace	n *	Podíl variabilních markerů	Genová diverzita	DW index z průměrů
ex_Ceahlau	10	0.382	0.110	283.035
ex_Bistricioara	10	0.503	0.180	666.449
ex_Hangu	10	0.268	0.081	166.227
ex_Sihla	10	0.241	0.072	173.327
ex_Sarata	10	0.556	0.182	607.951
ex_Spas'ka	9	0.435	0.147	456.868
ex_Shurdin	10	0.615	0.200	618.749
ex_Vápenky	10	0.359	0.112	526.653
ha_Piule	10	0.362	0.118	683.132
ha_Popradské pleso	10	0.576	0.175	588.477
ha_Osobitá	9	0.538	0.172	617.177

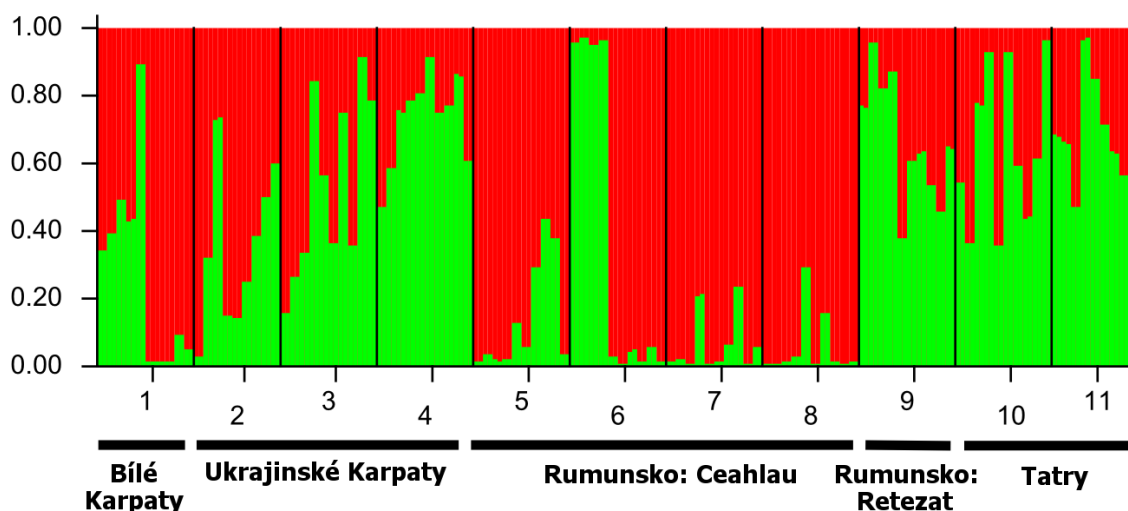
*počet použitých vzorků z populace

4.1.4 STRUCTURE

Pro celkový dataset byly identifikováno $K = 3$ jako nejvěrohodnější počet shuků. Vlastní analýza ukázala zřetelné oddělení *P. comosa* od zbylých dvou druhů (obr. 9). Variabilita uvnitř komplexu *P. exaltata* a *P. hacquetii* byla podrobněji studována analýzou, v níž nebyl zřetelně odlišný *P. comosa* zahrnut. Tato analýza identifikovala $K = 2$ jako nejvěrohodnější počet shluků. Vlastní shlukovací analýza neidentifikovala zřetelné oddělení populací do jednotlivých shluků. Do jednoho shluku lze zařadit populace 7 a 8. Zatímco populace 1, 5 a 6 obsahují směs jedinců zařaditelných do obou shluků a ostatní populace obsahují jedince nezařaditelné ani do jednoho shluku (obr. 10).



Obrázek 9. Výsledky shlukovací metody STRUCTURE hodnotí populace druhů *P. exaltata*, *P. hacquetii* a *P. comosa*. Jednotlivé barvy zobrazují příslušnost ke shlukům. Čísla znázorňují konkrétní hodnocenou populaci s jejími jedinci. $K = 3$



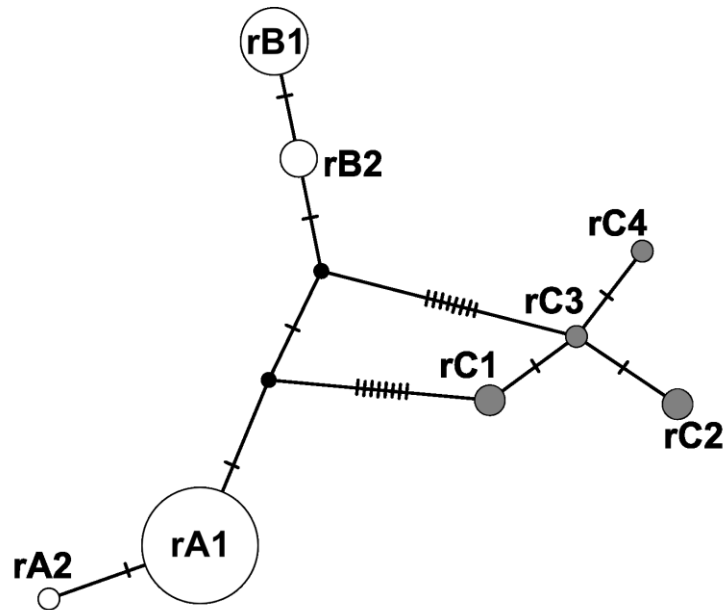
Obrázek 10. Výsledky shlukovací metody STRUCTURE hodnotí populace druhů *P. exaltata* a *P. hacquetii*. Jednotlivé barvy zobrazují příslušnost ke shlukům. Populace jsou označeny čísly. $K = 2$

4.2 DNA sekvence

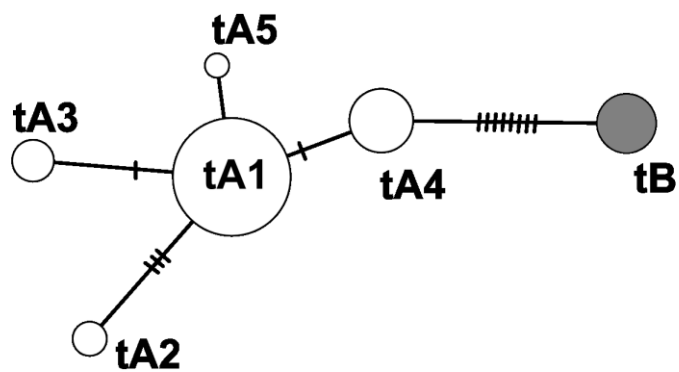
4.2.1 Haplotypová síť

Haplotypová síť vygenerovaná na základě výsledků sekvenace genu *rpl32* (obr. 11) ukazuje, že *P. comosa* se drží samostatně stranou od ostatních dvou druhů a zároveň obsahuje čtyři haplotypy. U vzorků *P. exaltata* a *P. comosa* byly nalezeny čtyři haplotypy. Nejčastější haplotyp (rA1) obsahuje všechny vzorky *P. hacquetii* a velkou část vzorků *P. exaltata* (Rumunsko, Vápenky). Ve vzorcích *P. exaltata* byly nalezeny i další méně časté haplotypy. Jednotlivé populace v některých případech obsahují více než jeden haplotyp.

Síť zobrazující vztahy mezi haplotypy úseku *trnT-L* (obr. 12) ukazuje odlišnost druhu *P. comosa*. Sekvence *P. hacquetii* a *P. exaltata* mají společné haplotypy. Z nich nejčastější zahrnuje sekvence obou druhů. Vzácnější haplotypy (tA2, tA3, tA5) naopak sestávají pouze ze sekvencí jednoho nebo druhého druhu. Z analýzy byly vyloučeny vzorky s krátkými sekvencemi, tj. vzorky 61, 63 (*P. hacquetii*, oblast Piule), 72 (*P. hacquetii*, oblast Osobitá), 82, 83 (*P. hacquetii*, oblast Popradské pleso), 93 (*P. exaltata*, oblast Spas'ka), 102 (*P. exaltata*, oblast Sarata). Vždy však danou populaci zastupuje alespoň jeden vzorek.



Obrázek 11. Haplotypová síť zobrazující sekvence chloroplastové DNA druhů *P. exaltata*, *P. hacquetii* a *P. comosa*, úsek *rpl32*. Velikost symbolů jednotlivých haplotypů odpovídá jejich frekvenci v datasetu. Body značí haplotypy, které v datasetu zastoupeny nejsou.



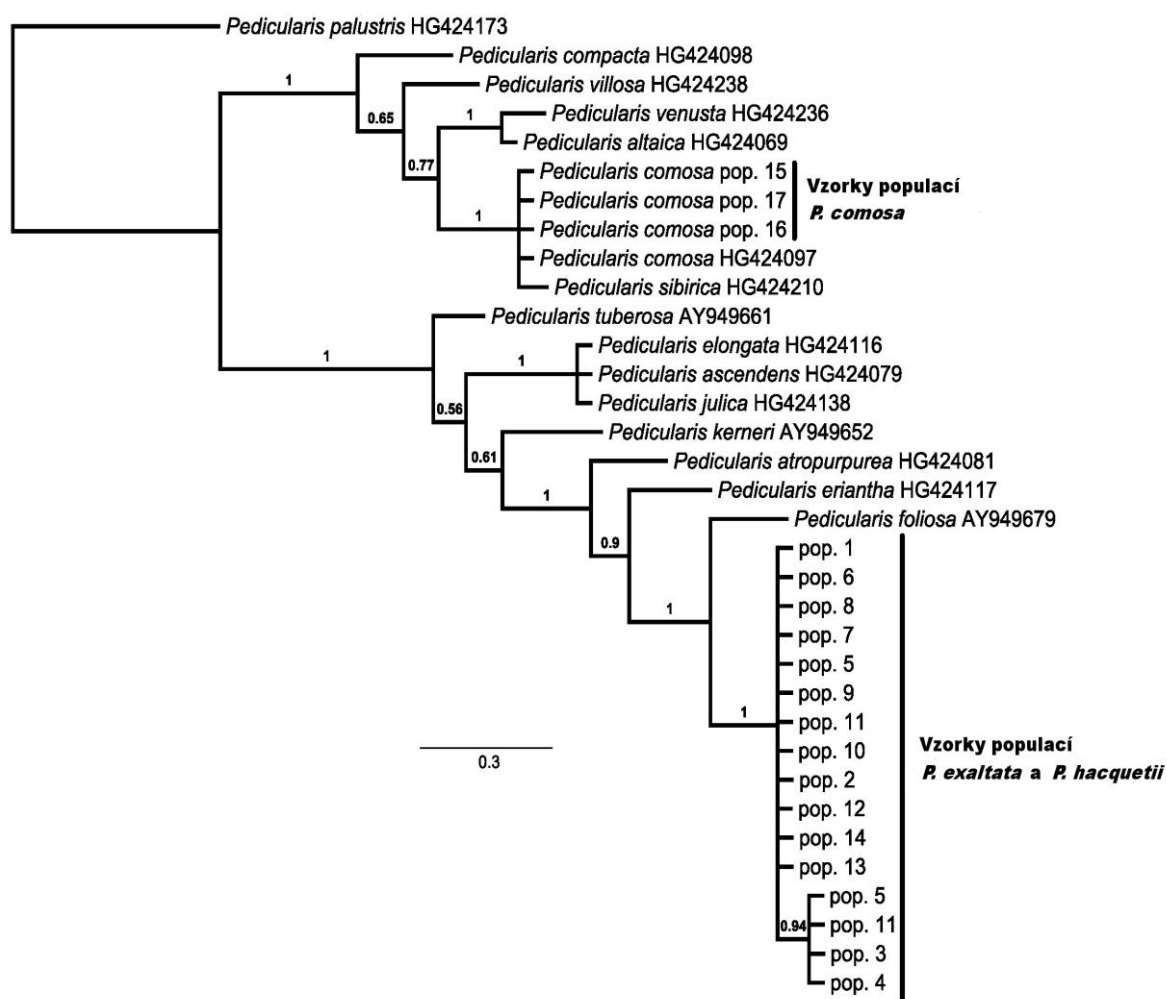
Obrázek 12. Haplotypová síť zobrazující sekvence chloroplastové DNA druhů *P. exaltata* a *P. hacquetii*, úsek *trnT-L*. Velikost symbolů jednotlivých datasetů odpovídá jejich frekvenci v datasetu. Body značí haplotypy, které v datasetu nejsou zastoupeny.

Tabulka 11. Soupis označení sekvencí cpDNA v haplotypových sítích a ITS haplotypů

Číslo populace	kód	druh	<i>rpl32</i>	<i>trnT-L</i>	ITS, nukleotid 473	Stát	Oblast
1	ex_VAP	ex	rA1	tA1	C	CZE	Bílé Karpaty
2	ex_SP	ex	rB2	tA3	C	UKR	Prutsko-Siretské meziříčí, Černovická oblast, Kicmaňský okres
3	ex_SAR	ex	rB2	tA1, tA3	G	UKR	Bukovinské Karpaty, Černovická oblast, Putylský okres
4	ex_SUR	ex	rB2	tA1	G	UKR	Bukovinské Karpaty, Černovická oblast, Putylský okres
5	ex_R05	ex	rA1, rB1	tA1, tA4	C, G	RO	Muntii Stanisoare, oblast Ceahlau, okres Neamt
6	ex_R06	ex	rA1	tA1	C	RO	Muntii Stanisoare, oblast Ceahlau, okres Neamt
7	ex_R08	ex	rB1	tA4	C	RO	Muntii Stanisoare, oblast Ceahlau, okres Neamt
8	ex_R09	ex	rA1, rA2	tA1	C	RO	Muntii Stanisoare, oblast Ceahlau, okres Neamt
9	ha_R01R02	ha	rA1	tA5	C	RO	Retezatské hory, Hunedoara okres
10	ha_RSK01	ha	rA1	tA2	C	SK	Vysoké Tatry, Popradské pleso
11	ha_RSK02	ha	rA1	tA1, tA2	C, G	SK	Vysoké Tatry, Osobitá
12	ha_CP	ha	rA1	tA1	C	SLO	Julijske Alpy, Črna Prst Masiv
13	ha_WA	ha	rA1	tA1	C	AUT	Carnische Alpen
14	ha_PP	ha	rA1	tA4	C	AUT	Carnische Alpen
15	co_VRS	co	rC2	tB	-	SK	Bílé Karpaty
16	co_R04	co	rC4	tB	-	RO	Cheile Turzii, okres Cluz Napoca
17	co_R03	co	rC1, rC3	tB	-	RO	Muntii Metaliferi, Piatra Cetii

4.2.2 Bayesiánský fylogenetický strom

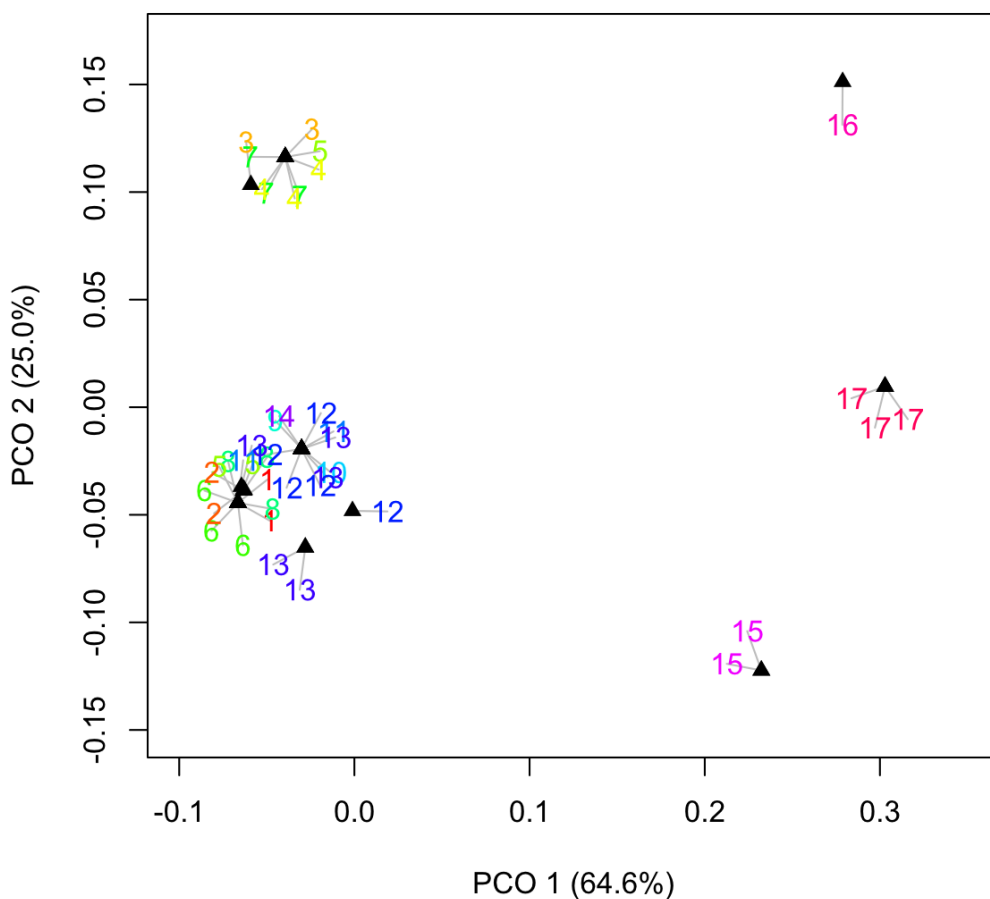
Bayesiánský fylogenetický strom znázorňuje sekvence ITS (obr. 13) rodu *Pedicularis*. *P. exaltata* a *P. hacquetii* jsou zde dohromady v jedné větvi, která se dále dělí na jednu menší podvětev, kde jsou opět oba dva druhy smíchány dohromady. Komplex *P. exaltata–hacquetii* je podpořen jako monofyletický oproti nejbližšímu příbuznému druhu *P. foliosa*. *P. comosa* je od *P. exaltata-hacquetii* izolován zcela větví fylogenetického stromu.



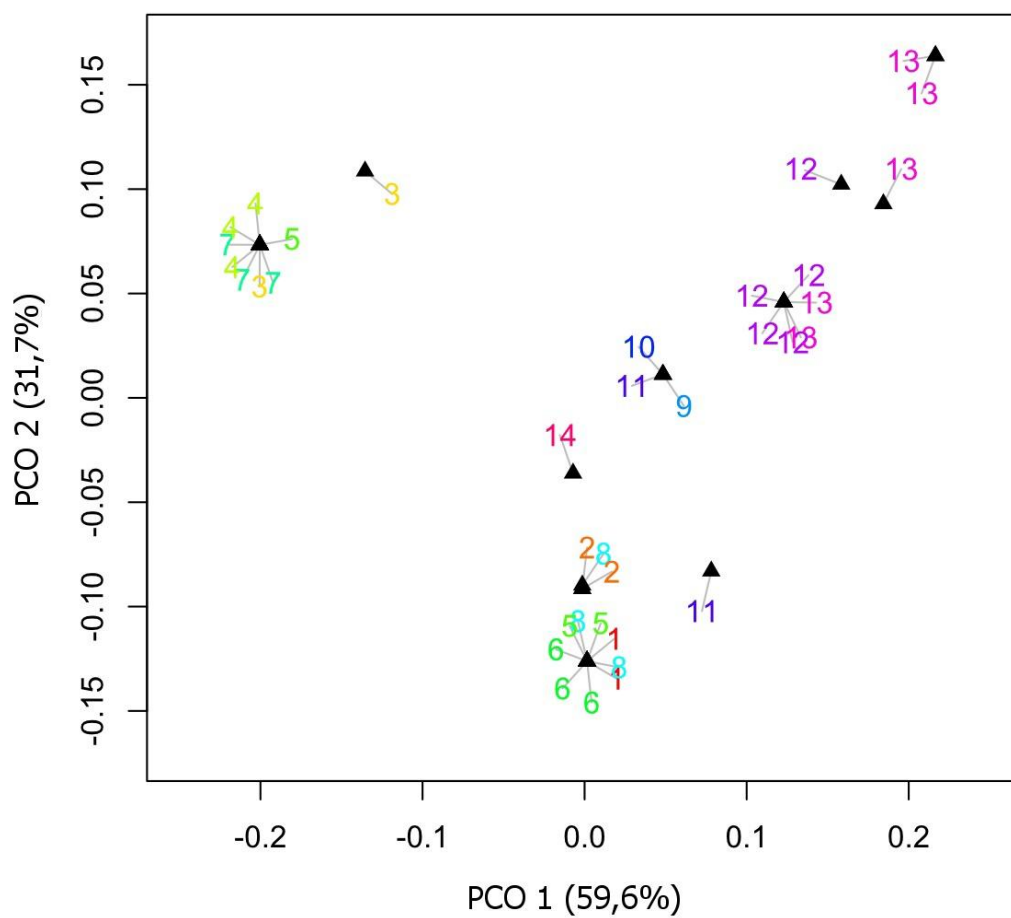
Obrázek 13. Bayesiánský fylogenetický strom zobrazující sekvence ITS u rodu *Pedicularis*. Čísla u uzlů naznačují posteriorní pravděpodobnost.

4.2.3 Chloroplastové mikrosatelity

Při porovnání dat z mikrosatelitů všech tří druhů je *P. comosa* zřetelně oddělena od ostatních dvou druhů a *P. exaltata* pak ještě tvoří jeden samostatný shluk, který je tvořen dvěma populacemi z Ukrajiny (Shurdin a Sarata) a dvěma populacemi z Rumunska (Hangu a Ceahlau) (obr. 14). Data zobrazující chloroplastové mikrosatelity *P. exaltata* a *P. hacquetii* u obr. 15 ukazují rozdělení dat na dvě skupiny, kde menší skupina je tvořena opět dvěma populacemi z Ukrajiny (Shurdin a Sarata) a dvěma populacemi z Rumunska (Hangu a Ceahlau). Druhá, větší skupina, je tvořena podél 2. ordinační osy a ukazuje variabilitu ne mezi druhy, ale mezi lokalitami. Tato skupina je variabilní. Variabilita má charakter gradientu, který popisuje 2. ordinační osa, kde na jedné straně jsou lokality z Alp a na druhé straně lokality z Rumunska.



Obrázek 14. Analýza hlavních koordinát znázorňující variabilitu dat získaných z chloroplastových mikrosatelitů vzorků *P. exaltata*, *P. hacquetii* a *P. comosa*. Jednotlivé vzorky jsou označeny číslem populace kolem černého trojúhelníku.



Obrázek 15. Analýza hlavních koordinát zobrazující variabilitu dat z chloroplastových mikrosatelitů. 1. a 2. ordinační osa. Vzorky *P. exaltata* a *P. hacquetii* nebo jejich skupiny zobrazující stejnou skupinu mikrosatelitů jsou označeny černým trojúhelníkem, čísla kolem trojúhelníku znázorňují jednotlivé populace.

5 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo rekonstruovat vztahy mezi populacemi druhu *Pedicularis exaltata*. Pro lepší pochopení jeho evoluční historie a pro porovnání byly zkoumány i další dva jeho příbuzné druhy, a to *P. hacquetii*, který je považován za blízkce příbuzný zkoumanému druhu (Hrouda 2000) a se kterým se nejčastěji zaměňuje, a dále *P. comosa*.

5.1 Molekulární data a komplex *P. exaltata* a *P. hacquetii* v Karpatech

Analýza molekulární variance zřetelně ukazuje minimální podíl variability na úrovni mezi druhy *P. exaltata* a *P. hacquetii*. Fylogeografická struktura komplexu *P. exaltata* a *P. hacquetii* je velmi mělká. Pouze u chloroplastových mikrosatelitů lze pozorovat určitý náznak oddělení *P. exaltata* a *P. hacquetii* odpovídající tradičnímu taxonomickému pojetí (Holub a Kmet'ová 1997, Hrouda 2000, Mayer E. 1972). Obecně ale žádný ze zkoumaných molekulárních markerů neposkytuje dostatečně silné indicie k odlišení *P. hacquetii* a *P. exaltata* jako dvou samostatných druhů. Ve studii zabývající se genetickou strukturou borovice limby (*Pinus cembra*), která má podobný areál výskytu jako *P. exaltata*, byly na dvou lokalitách v rumunských Rodenských horách nalezeni jedinci, kteří svou genetickou strukturou odpovídají jejímu blízkce příbuznému druhu borovici sibiřské (*Pinus sibirica*). Autoři této studie doporučují sledování obou druhů pro předpokládanou introgresi mezi populacemi (Lendvay a kol. 2014). Přestože se v dílčích analýzách v mé diplomové práci některé populace zřetelně vyčleňují, v jiných analýzách ani tyto populace nevybočují, takže není možné rozlišit žádnou konzistentní strukturu, která by poukazovala na existenci dvou či více odlišitelných taxonů v rámci studovaného souboru populací *P. hacquetii* a *P. exaltata*. Jedna z hypotéz této skutečnosti je tzv. genetické znečištění, což znamená směs lokální adaptace druhu s nepůvodními jedinci příbuzného druhu (Lendvay a kol. 2014), v tomto případě druhu *P. exaltata* a druhu *P. hacquetii*. Ovšem tato teorie je postavena na velmi slabém základě, jelikož ani jedna studovaná populace není jednoznačně oddělena do samostatného druhu. Ledaže by introgrese již byla v tak pokročilém stádiu, že od sebe nelze odlišit původně jednotlivé druhy.

Zajímavé jsou výsledky metody STRUCTURE aplikované na AFLP data, která identifikovala rozdělení datasetu do 2 shluků. Populace nejsou oddělovány podle

tradičního dělení druhů, ale lze pozorovat jakousi geografickou strukturu. Rumunské populace Ceahlau, Hangu a Sihla (5,7,8) ležící kolem vodní nádrže Izvorul Montelui ve východních Karpatech, lze zařadit do jedné skupiny. Do druhé skupiny pak spadají populace ležící na Ukrajině, v Tatrách a v rumunském Retezatu. Přičemž rumunská populace Bistricioara a česká populace Vápenky jsou svým rozdělením jedinců do dvou klastrů na pomezí obou skupin. Studie fylogeografie pryskyřníku platanolistého (*Ranunculus platanifolius*) odhalila existenci dvou hlavních genetických linií, které formují jeho současné rozšíření. Jedna obsahuje východní část Balkánského poloostrova spolu s jihovýchodní částí Karpat, druhá linie pak zahrnuje zbylé oblasti. Je zde tedy předpoklad, že postglaciální historické pásmo tohoto druhu bylo ovlivněno dvěma hlavními areály, a to jihovýchodní a centrální Evropy, a severozápadní částí Evropy (Stachurska-Swakoń a kol. 2013). Podobně je tomu zjevně i u komplexu *P. exaltata*–*P. hacquetii*, kde jeden areál genetické linie tvoří okolí vodní nádrže Izvorul Montelui ve východních Karpatech, a další linie pak směřuje z Alp do Tater a na Ukrajinu (např. obr. 8). Během posledního zalednění ledovce pokryly nejvyšší vrcholy Vysokých Tater, zatímco údolí a nižší vrcholy zůstaly bez ledovcového pokrytí (Stachurska-Swakoń a kol. 2013). Což potvrzuje vyšší DW index i podíl variabilních markerů na slovenských lokalitách.

Nejvyšší DW index a i nejvyšší genovou diverzitu ze všech zkoumaných populací má rumunská populace Bistricioara, což by mohlo indikovat starobylost této populace a přítomnost glaciálního refugia v její blízkosti (Kitner a kol. 2012). Také populace z Vápenek je v programu STRUCTURE rozdělena do dvou klastrů, má podprůměrný podíl variabilních markerů a s tím spojenou relativně nižší genovou diverzitu, ovšem její DW index patří mezi vyšší. To by odpovídalo znovuoobnovení této lokality v 70. letech minulého století, kdy byla tato populace téměř vyhubena. Relativně menší molekulární variabilita spojená s výrazným zastoupením unikátních alel poměrně dobře odpovídá tomu, co bychom očekávali u malé reliktní populace, dlouho oddělené od zbytku areálu. Takový scénář podporuje i charakter molekulární variability ostatních populací komplexu *P. exaltata*–*P. hacquetii*, který ukazuje na rozpad souvislejšího areálu a tendenci k tvorbě izolovaných areálů (např. v Tatrách). Populace na Vápenkách se z tohoto pohledu již nejeví tak výjimečná. Zavlečení, ať úmyslné nebo náhodné, v době osídlování území lidmi či v travní směsi dovážené z ciziny (Růžička 1987) se ve světle těchto poznatků jeví spíše jako méně pravděpodobná hypotéza, která ani není podpořena žádnými jasnými fakty.

Více analýz poukazuje také na určitou genetickou jedinečnost populace na lokalitě číslo 9 v pohoří Retezat. Ta je od ostatních populací oddělena geograficky což se projevuje i v molekulární variabilitě (PCoA AFLP data).

Z výsledků vyplývá, že *P. comosa* je zcela samostatným druhem, jelikož ve všech provedených analýzách se drží stranou od zbývajících dvou druhů. Jasně to lze vidět na všech haplotypových sítích cpDNA, kde se od *P. exaltata* a *P. hacquetii* liší několika substitucemi, na Bayesýánském stromě ITS a také na výsledcích z AFLP, kde je zřetelně oddělen.

5.2 Taxonomie

Charakteristika *P. exaltata* v Květeně ČR je založena na populaci z lokality v NPR Porážky, ovšem popis v ní se v jednom bodě odlišuje od skutečnosti, a to v popisu kalichu, kde v Květeně ČR je psáno, že kalich je i na žilkách lysý a nepravidelně 5cípý. Ve skutečnosti jsou však rostliny z této lokality na kalichu jemně ochlupené a kalich nemá takřka žádné cípy (obr. 16). Je možné, že jemné ochlupení na žilnatině kalichu se po nějaké době vylysá a v době zrání tobolek zde již žádné ochlupení nenalezneme. Tak tomu totiž je u *P. hacquetii* na některých lokalitách v Alpách (obr. 17, 18, 19). Flora Europa pak uvádí údaj, kde kalich *P. exaltata* popisuje jako skoro lysý („subglabrous“). Je zjevné, že populace *P. hacquetii*–*P. exaltata* jsou variabilní v ochlupení kalichu. Tato variabilita má však spíše kontinuální charakter a tento znak tak může stěží sloužit jako diagnostický taxonomický znak na druhové úrovni. Absence morfologického a molekulárního odlišení mezi populacemi řazenými do druhů *P. exaltata* a *P. hacquetii* indikuje, že se jde o jediný druh. Z taxonomického hlediska lze považovat *P. exaltata* a *P. hacquetii* za synonymum.

V Květeně ČR lze nalézt údaj, že *P. exaltata* byl poprvé popsán Besserem roku 1832 ve Flóře 15, avšak neplatně. *P. exaltata* byl řádně popsán až v roce 1846 Bungem. *P. hacquetii* byl řádně popsán hned napoprvé, a to v roce 1844 Grafem. Dle pravidla priority je tedy správné jméno pro zástupce obou původních druhů *Pedicularis hacquetii*.

V taxonomickém pojetí lze uvažovat o dvou polyfyleticky vzniklých varietách jednoho druhu, ale takový závěr by bylo třeba podpořit podrobnější morfologickou studií. V tuto chvíli lze spekulovat nad existencí dvou morfotypů, nížinného s lysým kalichem a vysokohorského s ochlupeným kalichem. Chlupatost kalichu

u vysokohorského typu může poskytovat ochranu semeníku před chladem, tj. být pozitivně selektována v podmínkách vysokých hor. Naopak lysý kalich u nížinných populací může být výhodný kvůli nižšímu riziku napadení houbovými chorobami při vlhkém a teplém počasí, pozorováno např. u kokrhele luštince (*Rhinanthus alectorolophus*; J. Těšitel, ústní sdělení). U rostlin čeledi Orobanchaceae není neobvyklé, že mají tendenci tvořit ekotypy, tedy ekologicky vyhraněné populace, které se přizpůsobují lokalitě, na které se nacházejí (např. *P. palustris*). Tento taxonomický koncept je podpořen i výsledky haplotypových sítí, které znázorňují, že *P. exaltata* i *P. hacquetii* mají stejné haplotypy a některé populace mají i dokonce více vzájemně propojených haplotypů. Podobnou studii provedl Těšitel a kol. se skupinou *Melampyrum sylvaticum* agg. v hercynské a karpatské oblasti, kdy na základě molekulárních a morfologických studií navrhli sloučit mikrospecie *M. saxosum* a *M. herbichii* v oblasti Západních Karpat, jelikož zde kromě barvy koruny nenalezli žádný další rozdíl. Zkoumali při tom úseky *trnL-trnT* cpDNA a úsek ITS jaderné DNA (Těšitel a kol. 2009).

Dříve se řešila otázka, jak se *P. exaltata* dostal z rumunských Karpat až do Česka, když na celých slovenských Karpatech nemá zaznamenanou ani jednu lokalitu výskytu. Díky molekulárním metodám bylo zjištěno, že populace *P. exaltata* náleží k druhu *P. hacquetii*. Dále tedy budu používat jméno *P. hacquetii*. Na přelomu glaciálu a starém holocénu měl *P. hacquetii* pravděpodobně jeden velký souvislý areál, který se táhl od Alp po Karpaty a po Panonskou pánev. V době oteplování a s tím souvisejícím postupným zalesňováním krajiny se, do tohoto momentu souvislý, areál začal rozpadat na menší celky. Pokud je tato teorie pravdivá, znamená to, že *P. hacquetii* přežil mladší holocén v Bílých Karpatech, což by ukazovalo na kontinuitu bezlesí v této oblasti od konce posledního glaciálu. Otázka bezlesí a pololesí v Bílých Karpatech v době holocénu je velmi diskutovaná (Hájková a kol. 2011, Hájek a kol. 2016). Tato práce přináší nový aspekt do této diskuze díky využití molekulárních metod. Otázkou však stále zůstává, jak si představovat tehdejší bezlesí. Některé populace *P. hacquetii* se totiž nacházejí na velkém areálu trvalého bezlesí, jiným stačí pouze kousek otevřeného prostoru mezi křovím. Nynější lokalita NPR Porážky tak mohla v minulosti být např. pouze otevřeným bahništěm či místem častého spásání zvěře.

6 Závěr

Tato práce studuje molekulární variabilitu a rekonstruuje evoluční historii komplexu *Pedicularis exaltata* a *Pedicularis hacquetii* v Karpatech, se zaměřením na populaci *P. exaltata* v Bílých Karpatech na lokalitě NPR Porážky. Zkoumáno bylo celkem 126 jedinců z karpatských lokalit, sběr vzorků byl proveden v roce 2013. Pro dořešení taxonomické problematiky byl dataset doplněn o 15 jedinců z alpských lokalit, kde sběr vzorků proběhl v roce 2015. Kromě dvou již zmíněných druhů byl pro porovnání hodnocen i *Pedicularis comosa*, který je podle výsledku v této práci uvedených samostatným druhem.

P. exaltata a *P. hacquetii* jsou podle molekulárních studií, obsažených v této práci, jeden druh. Navrhuji, aby se komplex souhrnně nazýval *P. hacquetii*, podle Grafa z roku 1844, který jej jako první řádně popsal. *P. comosa* vyšel v molekulárních studiích jako samostatný druh.

Výsledky podporují hypotézu, že populace vyskytující se na lokalitě NPR Porážky je reliktního charakteru. Mohla na místě přežívat celou dobu od staršího holocénu, kdy se pravděpodobně rozpadl souvislý areál *P. hacquetii*. To by indikovalo existenci kontinuálního bezlesí na území Bílých Karpat v průběhu holocénu. Výskyt všivce statného, resp. všivce Hacquetova na lokalitě NPR Porážky není tak ojedinělý, protože nejbližší lokality nalezneme již na středním Slovensku. I přesto je třeba však stále dbát na udržení této reliktní populace na našem území.

Jako pokračování své práce navrhuji studii zaměřenou na morfologii, která by rozřešila ekologicky vyhraněné populace, které se přizpůsobují jednotlivým podmínkám prostředí, tedy případné jednotlivé ekotypy druhu.

7 Literatura

- Albrecht J. a kol. 2003. Českobudějovicko. In: Mackovčin P. a Sedláček M. [ed.]: Chráněná území ČR, svazek VIII. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a EkoCentrum Brno. 808 s.
- Avice J. C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. 1. title. London: Harvard University press. 447 s.
- Avice J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. Journal of Biogeography 36: 3-15.
- Bezděčka P., Jongepier J. W. a kol. 2002. Chráněná území CHKO Bílé Karpaty. In: Mackovčin P., Jatiová M. a kol. 2002. Chráněná území ČR – Zlínsko, svazek II. 1. vydání. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a EkoCentrum Brno. 92 s.
- Bruvo R., Michiels N. K., D'Souza T.G., Schulenburg H. 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. Molecular Ecology 13: 2101–2106
- Burlaka M. D., Kazemirska M. A. 2012. Morfometrija generatyvnyh osobyn ta vitalitetna struktura populacij *Pedicularis exaltata* Besser (Orobanchaceae) v bukovyns'komuprykarpatti. Ukr. Botan. Žurn. 69, 1: 17-27
- Clement M., Posada D., Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol.Ecol. 9: 1657–1660
- Clement M., Snell Q., Walker P., Posada D., Crandall K. 2002. TCS: Estimating gene genealogies. Parallel and Distributed Processing Symposium. International Proceedings 2. 184
- Čerovský J., Feráková V., Holub J., Maglocký Š., Procházka F. 1999. Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů ČR a SR, díl 5. (Vyšší rostliny). Bratislava: Příroda. 453 s.
- Danihelka J., Chrtek Jr. J., Kaplan Z. 2012. Check list of vascular plants of the Czech Republic. Preslia 84: 647-811
- Dakskobler I., Praprotnik N., Wraber T. 2008. Črna prst, njeni prvi botanični obiskovalci in njene rastlinske posebnosti. Hladnikia 21: 29-39
- Dítě D. 2008. Zákonem chránené druhy rastlín Slovenskej republiky [Internet]. Botany.cz: 2008 November 16 [citováno 5. 3. 2015]. Dostupné na: www.botany.cz/cs/chrane-rastliny-slovenska/
- Dítě D. 2009. Červený zoznam ohrožených druhov cévnatých rastlín Slovenska [Internet]. Botany.cz: 2009 November 27 [citováno 5. 3. 2015]. Dostupné na: www.botany.cz/cs/ohrozene-rastliny-slovenska/

- Dray S., Dufour A. B. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*. 22 (4): 1-20
- Ehrich D. 2006. AFLP dat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Mol. Ecol. Notes* 6. p. 603-604
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611–2620
- Excoffier L., Smouse P. E., Quattro J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. s. 479–491
- Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes* 7: 574–578
- Fér T., Marhold K. 2012. Fylogeografie rostlin střední Evropy. *Živa* 4: 158-161
- Gazda J., Střihavková H., Toběrná V. 1963. *Soustavná botanika, rostliny krytosemenné*. 2. vydání. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. s. 80-81
- Gower J. C., Legendre P. 1986. Metric and Euclidean properties of dissimilarity coefficients. *Journal of Classification* 3: 5–48
- Grulich V. 2008. Fytogeografie. In: Jongepierová I., editor. 2008. *Louky Bílých Karpat (Grassland of the White Carpathian Mountains)*. Veselí nad Moravou: ZO ČSOP Bílé Karpaty. 461 s.
- Grulich a kol. 2012. Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. *Preslia* 84: 631-645
- Hájek M., Dudová L., Hájková P., Roleček J., Moutelíková J., Jamrichová E., Horsák M. 2016. Contracting Holocene environmental histories may explain patterns of species richness and rarity in a Central European landscape. *Quaternary Science Reviews* 133: 48-61
- Háková P., Roleček J., Hájek M., Horsák M., Fajmon K., Polák M., Jamrichová E. 2011. Prehistoric origin of the extremely species-rich semi-dry grasslands in the Bílé Karpaty Mts (Czech Republic and Slovakia). *Preslia* 83: 185-204
- Hendrych R. 1977. Zaniklé nebo nezvěstné rostliny naší květeny. *Živa* 25: 84-85
- Hofman H. 2014. *Horské rostliny - nejkrásnější druhy Alp a dalších evropských hor*. 1. vydání. Svojtka & Co. 256 s.
- Holub J., Kmeťová E. 1997. *Pedicularis* L. In: Goliášová K., editor. 1997. *Flóra Slovenska V/2*. 1. vydání. Bratislava: VEDA, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied Bratislava. 633 s.
- Hoskovec L. 2008. Chráněné druhy rostlin Ukrajiny [Internet]. Botany.cz: 2008 December 12 [citováno 5. 3. 2015]. Dostupné na: www.botany.cz/cs/chrane-rostliny-ukrajiny/
- Hrouda L., 2000. *Pedicularis* L. – všivec. In: Slavík B., editor. 2000. *Květena České republiky*, 6. Svazek. 1. vydání. Praha: Academia. 770 s.

- Chlupáč I., Brzobohatý R., Kovanda J., Stráník Z. 2011. Geologická minulost České republiky. 2. vydání. Praha: Academia. 436 s.
- Chytrý M., Kučera T., Kočí M., Grulich V., Lustyk P., editors. 2010. Katalog biotopů České republiky. 2. vydání. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR. 445 s.
- Chytrý M., Kočí M., Šumberová K., Sádlo J., Krahulec F., Hájková P., Hájek M., Hoffman A., Blažková D., Kučera T., Novák J., Řezníčková M., Černý T., Hartel H., Simonová D. 2010. Vegetace České republiky 1. Travninná a keříčková. 2. vydání. Praha: Academia. 522 s.
- Chytrý M., Šumberová K., Hájková P., Hájek M., Hroudová Z., Navrátilová J., Čtvrtlíková M., Sádlo J., Lososová Z., Hrivnák R., Rydlo J., Ořaňelová H., Bauer P., Hanáková P., Ekrť L., Ekrťová E. 2011. Vegetace České republiky 3. Vodní a mokřadní vegetace. 1. vydání. Praha: Academia. 828 s.
- Ivanov V. V. 1956. The Lousewort in popular (volk) medicine. Leningrad: Bot. Žur. 41: 262.
- Kamvar Z. N., Tabima J. F., Grünwald N. J. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. PeerJ 2: e281; DOI 10.7717/peerj.281
- Kitner M., Majeský L., Gillová L., Vymyslický T., Nagler M. 2012. Genetic structure of *Artemisia panicii* populations inferred from AFLP and cpDNA data. Preslia 84: 97-120.
- Klimeš L., 2008. Druhové bohatství luk. In: Jongepierová I., editor. 2008. Louky Bílých Karpat (Grassland of the White Carpathian Mountains). Veselí nad Moravou: ZO ČSOP Bílé Karpaty. 461 s.
- Kuča P., Májský J., Kopeček F., Jongepierová I. 1992. Biele Bílé Karpaty. 1. vydání. Bratislava: Vydavateľstvo Ekológia. 380 s.
- Lendvay B., Höhn M., Brodbeck S. 2014. Genetic structure in *Pinus cembra* from the Carpathian Mountains inferred from nuclear and chloroplast microsatellites confirms post-glacial range contraction and identifies introduced individuals. Tree Genetics & Genomes 10: 1419-1433
- Ložek V. 2008. Vývoj v době poledové. In: Jongepierová I., editor. 2008. Louky Bílých Karpat (Grassland of the White Carpathian Mountains). Veselí nad Moravou: ZO ČSOP Bílé Karpaty. 461 s.
- Macior L. W., Tang Y., Jianchen Z. 2001. Reproductive biology of *Pedicularis* (Scrophulariaceae) in the Sichuan Himalaya. Plant Species Biology 16: 83-89
- Mackovčín P., Jatiová M. a kol. 2002. Zlínsko. In: Mackovčín P., Sedláček M. [ed.] 2002. Chráněná území ČR, svazek II. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a EkoCentrum Brno. Praha. 376 s.
- Machačková K., 2007. Farmaceuticky perspektivní látky z chráněných druhů rostlin [diplomová

- práce]. [Hradec Králové (CZ)]: Univerzita Karlova. 100 s.
- Mayer E., 1972. *Pedicularis* L. In: Tutin T.G., Heywood H.V., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A. (eds): *Flora Europaea*, svazek 3, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 269-276
- Mazáč J. 2007. *PEDICULARIS HACQUETII* Graf – všivec Hacquetův/všivec karpatský [Internet]. Botany.cz: 2007 October 10 [citováno 5. 3. 2015]. Dostupné na: www.botany.cz/cs/pedicularis-hacquetii/
- Merunková K., Preislerová Z., Chytrý M. 2012. White Carpathian grasslands: can local ecological factors explain their extraordinary species richness? *Preslia* 84: 311-325
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
- Oksanen J., Blanchet F. G., Kindt R., Legendre P., Minchin P. R., O'Hara B. R., Simpson G. L., Solymos P., Stevens M. H. H., Wagner H. 2014. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.2-0
- Olmstead R. G., Reeves P. A. 1995. Evidence for the polyphyly of the *Scrophulariaceae* based on chloroplast *yc1* and *ndhF* sequences. *Ann. Mi. Bot. Gard.* 82: 176-193
- Olmstead R. G., dePamphilis C. W., Wolfe A. D., Young N. D., Elisons W. J., Reeves P. A. 2001. Disintegration of the *Scrophulariaceae*. *American Journal of Botany* 88(2): 348-361.
- Olmstead R. G. 2002. Whatever happened to the *Scrophulariaceae*? *Fremontia* Vol. 30, No 2: 12-22
- Oprea A., Sîrbu C. 2013. The vascular flora of Rarău Massif (Eastern Carpathians, Romania). Note II. *Memoirs of the Scientific Sections of the Romanian Academy*, Tome XXXVI: 17-52
- Ovesná J., Hodek J. 2007. Využití AFLP pro DNA genotypizaci rostlin. *Výzkumný ústav rostlinné výroby*, v. v. i. 21 s.
- Peregrym O. M., Tsybalyuk Z. M., Mosyakin S. L. 2011. Pollen morphology of Ukrainian species of the genus *Pedicularis* L. (Orobanchaceae Vent.). *Biodiv. Res. Conserv.* 24:5-12.
- Podešva Z. 2007. *Pedicularis exaltata* Bunge – všivec statný/všivec statný [Internet]. Botany.cz: 2007 July 7 [citováno 30. 3. 2015]. Dostupné na: www.botany.cz/cs/pedicularis-exaltata/
- Podpěra J. 1906. Vývoj a zeměpisné rozšíření květeny v zemích českých ve srovnání s poměry Evropskými. Svazek 6. *Knihovna Přírody a Školy*. Mor. Ostrava. s. 221
- Posada D., Crandall K. A. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.* 16: 37-45
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959
- Peregrym O. M., Peregrym M. N. 2014. Pošyrennja vydiv rodu *Pedicularis* (Orobanchaceae) v Ukrajinі. *Ukr. Bot. Žurn.* 71: 573-580

- Procházka F., Čeřovský J., Holub J. 1983. Chráněné a ohrožené druhy květeny ČSR. Praha: Ústřední dům pionýrů a mládeže Julia Fučíka ve spolupráci s komisí předsednictva ČÚV SSM pro tvorbu a ochranu životního prostředí. s. 19
- Procházka F. [ed.] 2001. Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). Příroda 18: 1-166
- R Core Team 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Dostupné na: <http://www.R-project.org/>
- Rencová E. 2011. PEDICULARIS COMOSA L. - všivec chocholatý/všivec chocholatý [Internet]. Botany.cz: 2011 November 14 [citováno 5. 3. 2015]. Dostupné na: www.botany.cz/cs/pedicularis-comosa/
- Riddle R. B. 2009. What is modern biogeography without phylogwography? Journal of Biogeography 36: 1-2
- Rubín J., Balatka B., Burdová P., Cílek V., Henrych R., Hromas J., Chlupáč I., Kotlaba F., Kouřimský J., Mikuláš R., Petříček V., Plesník J., Reš B., Vylita T. 2006. Přírodní klenoty České republiky. Praha: Academia. s. 21
- Růžička V. 1987. O záchraně všivce statného 3. Naší přírodou 7: 88-89
- Savil D. B. O. 1977. Leaf form and evolutionary patterns in *Pedicularis*. Plant Evolution. Vol. 43. Part B. No. 6: 223-227
- Săvulescu T., editor. 1960. Flora Republicii Populare Române: Flora Reipublicae Popularis Romanicae, Svazek 7. Academia Reipublicae popularis Romanicae. 659 s.
- Schaal B. A., Hayworth D. A., Olsen K. M., Rauscher J. T, Smith W. A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. MoleculEcology 7: 465-474
- Schlatter J. 2014. Synthetic Cannabinoids: Synthesis and Biological Activities. In: Atta-ur-Rahman, editor. 2014. Studies in Natural Products Chemistry, vol. 43. 1. edition. Great Britain: Elsevier. s. 293
- 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
- Schönswetter P., Tribsch A. 2005. Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). Taxon 54. 725-732
- Stachurska-Swakoń A., Cieślak E., Ronikier M. 2013. Phylogeography of a subalpine tall-herb *Ranunculus plataniifolius* (Ranunculaceae) reveals two main genetic lineages in the European mountains. Botanical Journal of the Linnean Society 171: 413-428
- Stonawski J. 1985. Biologie a záchrana genofondu *Pedicularis exaltata* Besser v Bílých Karpatech [diplomová práce]. [Olomouc (CZ)]: Univerzita Palackého. 111 s.
- Stonawski J. 1987. Opylování a šíření semen *Pedicularis exaltata*. Praha. Zpr. Čs. Bot.

Společ. 22: 56-58

- Šavikin-Fodulović K., Bulatović V., Menković N., Tasić S., Zdunić G., Popović M. 2003. Osvrt na biljne vrste područja Nacionalnog parka Tara. Leg. Sirov. 23: 113-121
- Štursová H., Kociánová M. 2005. Poznámky k rozšíření, biologii a ekologii všivce *Pedicularis sudetica* subsp. *sudetica*. Opera Corcontica 43: 157-178
- Tank D. C., Beardsley P. M., Kelchner S. A., Olmstead R.G. 2006. Review of the systematics of *Scrophulariaceae* and their current disposition. L. A. S. Johnson Review No. 7. Australian Systematic Botanic 19. s. 289-307
- 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
- Těšitel J. 2011. Jak se parazituje v říši rostlin, funkční anatomie. Živa 3: 105-107
- Turis P., Kliment J., Feráková V., Dítě D., Eliáš P., Hrivnák R., Košťál J., Šuvada R., Mráz P., Bernátová D. 2014. Red List od vascular plants od the Carpathian part of Slovakia. Košice: Thaiszia - J. Bot. 24 (1): 35-87
- Walter K. S., Gillett H. J. [eds.] 1998. 1997 IUCN Red List of threatened plants. IUCN – The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK: Compiled by the World Conservation Monitoring Centre. s. 561
- Wang H., Mill R. R., Blackmore S. 2003. Pollenmorphology and infragenerice volutionary relationship in some Chinese species of *Pedicularis* (Scrophlariaceae). Plant Syst. Evol. 237: 1-17
- Wikipedie – volný zdroj [citováno 10. 4. 2016]. Dostupné na: https://cs.wikipedia.org/wiki/Nejvy%C5%A1%C5%A1%C3%AD_hory_evropsk%C3%B4ch_zem%C3%AD#/media/File:Europe_relief_laea_location_map.jpg

Přílohy

Příloha A

Na vybraných lokalitách byly spočítáni fertilní jedinci a počet tamějších mikropopulací (tab. 12). Jako mikropopulace je brána taková populace, která zahrnuje skupinu jedinců rodu *Pedicularis* rostoucích blízko sebe, a zároveň je od další nejbližší mikropopulace vzdálena alespoň 15 metrů. Sčítání proběhlo na všech rumunských lokalitách, kde se nacházely druhy *P. exaltata* a *P. hacquetii*, a to v červenci 2013. U rumunských lokalit s *P. comosa* byl pro nedostatek času proveden pouze odhad. Na Slovensku proběhlo sčítání na všech nalezených lokalitách s *P. hacquetii*, a to na přelomu měsíce července a srpna 2013. Na ukrajinských lokalitách, na slovenské lokalitě Vršatec a v Alpách nebyla možnost provést sčítání ani přibližný odhad počtu fertilních rostlin a mikropopulací, jelikož sběr vzorků byl proveden bez mé přítomnosti. Na české lokalitě NPR Porážky proběhl sběr materiálu ještě před nasazením na květ, tedy také nebyla možnost provést sčítání ani hrubý odhad fertilních jedinců.

Tabulka 12. Počet mikropopulací a fertilních rostlin na vybraných lokalitách

Číslo lokality	Stát	Region	Lokalita	Počet fertilních rostlin	Počet nalezených mikropopulací	Druh
8	RO	Muntii Stanisoare	Sihla	136	8	<i>P. exaltata</i>
7	RO	Muntii Stanisoare	Hangu	26	1	<i>P. exaltata</i>
6	RO	Muntii Stanisoare	Bistricioara	106	18	<i>P. exaltata</i>
5	RO	Muntii Stanisoare	Ceahlau	53	7	<i>P. exaltata</i>
9	RO	Muntii Retezat	Piule	16	2	<i>P. hacquetii</i>
17	RO	Muntii Metalifery	Piatra Cetii	desítky	2	<i>P. comosa</i>
16	RO	Cheile Turzii	Cheile Turzii	pouze pár jedinců	1	<i>P. comosa</i>
10	SK	Vysoké Tatry	Popradské pleso	164	1	<i>P. hacquetii</i>
11	SK	Vysoké Tatry	Osobitá	22	2	<i>P. hacquetii</i>



Obrázek 16. Fotografie kalichu *P. exaltata* na lokalitě NPR Porážky v Bílých Karpatech



Obrázek 17. Fotografie kalichu *P. hacquetii* na lokalitě Plocken Pass v Alpách



Obrázek 18. Fotografie kalichu *P. hacquetii* na lokalitě Crna Prst v Alpách



Obrázek 19. Fotografie kalichu *P. hacquetii* na lokalitě Wolayer Alm v Alpách