

SCHISTOCHILOPSIS OPACIFOLIA (CULM. EX MEYL.) KONSTANT. V KRKONOŠÍCH

Schistochilopsis opacifolia (Culm. ex Meyl.) Konstant. in the Krkonoše Mts



Jan Kučera¹ & Jiří Váňa²

¹ Přírodovědecká fakulta Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích, Branišovská 31, CZ-370 05 České Budějovice, e-mail: kucera@prf.jcu.cz; ² Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, katedra botaniky, Benátská 2, CZ-128 01 Praha 2, e-mail: jiri.vana@natur.cuni.cz



Abstract:

The liverwort *Schistochilopsis opacifolia*, considered vanished from the Czech bryoflora, was detected in recent collections from the Labská rokle ravine in the Krkonoše Mts, and its identification and distinctness from *S. incisa* was confirmed by molecular barcoding using *trnL-trnF* chloroplast sequences. A selective partial revision of material collected in the summit region of the Krkonoše Mts yielded several other specimens, all of which were collected in the Labský důl valley. The diagnostic characters of the species are discussed to prompt the search for other localities of this rare, yet probably partly overlooked, species of our liverwort flora.



Key words:

distribution, Giant Mts, *Lophozia*, molecular barcoding, Scapaniaceae, threat.

ÚVOD

Během floristického průzkumu krkonošského Labského dolu v roce 2015 zaznamenal první autor na několika místech játrovku, která připomínala druh *Schistochilopsis opacifolia* (Culm. ex Meyl.) Konstant. (= *Lophozia opacifolia* Culm. ex Meyl.). Dosud jediný údaj o výskytu tohoto druhu u nás – na Čertově louce v Krkonoších – pochází z práce Szweykowski & Kožlicka (1974). Druh byl sbírán J. Szweykowským v roce 1958 (Váňa 1992). Morfologické odlišení druhu *Schistochilopsis opacifolia* od mnohem běžnějšího druhu *S. incisa* (Schrad.) Konstant. je všeobecně považováno za problematické (Bisang 1991, Damsholt 2002, Bakalin 2011) a ani doposud provedené molekulární studie (Vilnet et al. 2008) nedaly jednoznačnou odpověď na oprávněnost rozlišování druhů, přestože dřívější biosystematické práce potvrdily značně odlišné spektrum v elektroforetické mobilitě zkoumaných peroxidáz (Krzakowa et al. 1991).

Morfologické znaky rostlin v položkách z loňského roku (Kučera 18508, 18520, viz níže) odpovídaly znakům udávaným pro druh *S. opacifolia*, proto jsme se pokusili o „molekulární barcoding“ sekvenací chloroplastového úseku *trnL-trnF*. Získané sekvence byly skutečně podobnější sekvencím *S. opacifolia* dostupným v databázi GenBank než sekvencím *S. incisa* ze stejného zdroje, proto jsme přistoupili k sekvenaci ještě dalších dvou položek a širší revizi dříve sebraného materiálu.

METODIKA

Revize herbářového materiálu

Na základě publikovaného rozšíření druhu *Schistochilopsis incisa* (Hubáčková & Vaňa 1990) jsme vytypovali položky sebrané ve vrcholových partiích Krkonoš a Hrubého Jeseníku, nacházející se v herbáři PRC, CBFS a soukromém herbáři J. Váni. Položek, nacházejících se mimo tyto herbáře bylo minimum a nebyly sbírány na lokalitách, které by už nebyly zahrnuty do předchozí revize. Navíc byla revidována položka třetího našeho druhu rodu, *Schistochilopsis grandiretis* (Lindb. ex Kaal.) Konstant., sbíraná rovněž v Labské roklí nedaleko místa současného nálezu *S. opacifolia*.

Získání a zpracování molekulárních dat

Ze čtyř položek odpovídajících morfologicky druhu *Schistochilopsis opacifolia* a dvou položek druhu *S. incisa* byla získána genomická DNA metodou NaOH extrakce (Werner et al. 2002). Chloroplastový úsek *trnL-trnF* byl amplifikován za použití primerů TabC a TabF (Taberlet et al. 1991), jaderný úsek ITS pomocí primerů m18S a m25R (Spagnuolo et al. 1999) ve standardních PCR reakcích podle protokolu popsaneho v práci Köckinger & Kučera (2011). Chloroplastový úsek se podařilo amplifikovat u třech položek *S. opacifolia* a jedné položky *S. incisa* (Genbank identifikátory položek *S. opacifolia* jsou uvedeny níže v seznamu revidovaných položek, *trnL-trnF* sekvence druhu položky Košnar s.n. CBFS:18669: **KU954331**), amplifikace a sekvenace jaderné ITS se zdařila pouze částečně u jedné položky každého druhu, proto jsme tyto částečné sekvence v analýzách dále nepoužili. Pro fylogenetickou analýzu jsme kromě našich sekvencí použili sekvence volně dostupné v databázi GenBank, které byly ve většině případů získány z materiálu, analyzovaného v pracích de Roo et al. (2007) a Vilnet et al. (2007, 2008). Byly použity pouze sekvence druhů reprezentativních zástupců rodů čeledi Scapaniaceae s. l., které tvoří komplex blízce příbuzných druhů, spolu se sekvencemi *Isopaches decolorans* a *Pseudolophozia sudetica* z čeledi Anastrophyllaceae.

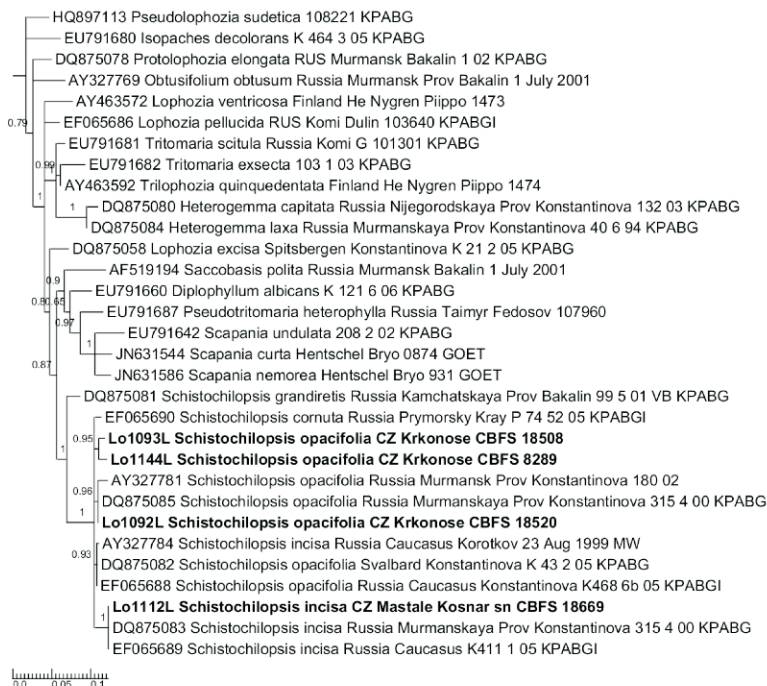
Sekvence úseku *trnL-trnF* byly po manuální editaci v programu Geneious v. 8 (Biomatters Ltd.) alignovány v online verzi programu MAFFT v. 7 (Katoh & Standley 2013) s použitím strategie E-INS-i a standardních nastavení kromě skórovací matice (1PAM / $\kappa=2$) a penalizace za otevření

gapu (1.0). Indely byly kódovány binárně (Simmons & Ochoterena 2000) v programu Seqstate v. 1.4 (Müller 2005) a fylogenetická analýza provedena v programu MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist et al. 2012) za použití smíšené matice DNA a standardních znaků z kódovaných indelů. Parametry substitučního modelu pro DNA data byly v GTR prostoru odhadovány přímo během mcmc analýzy (nst=mixed rates=gamma), analýza proběhla za použití standardních nastavení ve dvou běžích za využití diagnostiky konvergence mezi běhy nastavené na hodnotu 0,005.

VÝSLEDKY

Molekulární analýza

Fylogenetická rekonstrukce potvrdila v hlavních obrysech vzájemné vztahy mezi čeledi Scapaniaceae s. l., publikované v pracích de Roo et al. (2007) a Vilnet et al. (2007, 2008, 2010). Rod *Schistochilopsis* je sesterskou skupinou ke *Scapaniaceae* s. str. (včetně *Saccobasis* a *Pseudotritomaria*). Všechny analyzované rostliny jsou součástí silně podpořené a výrazně odlišené linie, tvořené druhy *Schistochilopsis cornuta* (Steph.) Konstant. (morfologicky poměrně odlišný taxon, omezený výskytem na severovýchodní Asii – Čínu včetně Taiwanu, Koreu, Japonsko, Kurily, Sachalin, Amurskou provincii a Přímořský kraj v Rusku), *S. opacifolia* a *S. incisa* (obr. 1). Tři sekvence označené jako *S. incisa* jsou identické i přes značně vzdálený zeměpisný původ (Česká republika, Kavkaz, Murmanská provincie v severozápadním Rusku) a vzhledem k významnějším odlišnostem (devět sdílených substitucí odlišujících je od zbytku sekvencí) tvoří dobře vymezenou linii. Zbytek sekvencí je poměrně variabilní (22 vesměs unikátních substitucí a tři indely) a tvoří čtyři slabě podpořené linie, z nichž tři odpovídají rostlinám určitelným jako *S. opacifolia* (předpokládáme, že kavkazská rostlina označená jako *S. incisa* (AY327784) mohla být vzhledem k obtížnému vymezení druhů nesprávně určena).



Obr. 1. Fylogenetické vztahy mezi zástupci reprezentativních zástupců rodu čeledi Scapaniaceae s. l. na základě Bayesiánské analýzy chloroplastového úseku trnL–trnF. Tučně jsou uvedeny nově získané sekvence. Podpora větví je vyjádřena aposteriorními pravděpodobnostmi, jejich délka odpovídá počtu substitucí na pozici v alignmentu.

Fig. 1. Phylogenetic relationships among representatives of genera of the Scapaniaceae s. l. based on Bayesian analysis of the chloroplast region trnL–trnF. Newly acquired sequences are printed in bold. Branch support values correspond to Bayesian posterior probabilities, and the length of branches corresponds to substitution rates per site.

Revize herbářových položek

Během revize bylo ověřeno, že znaky uváděné v literatuře (Krzakowa et al. 1991, Damsholt 2002), pro odlišení obou taxonů (tab. 1) umožňují přiřazení jednotlivých položek k druhům *S. opacifolia* a *S. incisa*. Žádná ze studovaných položek neměla sporofyty, pouze u položek Kučera 8289 a 18520 jsou přítomny perianty. Krkonošské položky druhu *S. opacifolia* mají často jen dvouvrstevnou bázi listů, ačkoliv platí, že dvouvrstevná část zasahuje v listu výše. Zubatost listových laloků je poměrně spolehlivým znakem u rostlin *S. incisa* z nižších poloh, u rostlin z vyšších poloh však bohužel tento znak selhává. Poměrně spolehlivě na studovaných položkách funguje znak velikosti a tvaru listových gem, ovšem množství tvořených gem u druhu *S. opacifolia* nebývá velké a jejich tvar a velikost jsou poměrně variabilní, proto je někdy potřeba větší a výrazněji úhelnaté

gemy u tohoto druhu pečlivě hledat. Habitus a nejnápadnější znaky obou druhů na českém materiálu jsou ilustrovány na obrazových tabulích v příloze (Příloha obr. 1, 2); menší velikost listů *S. incisa* na obr. 2 D, E není diakritickým znakem.

Tab. 1. Určovací znaky druhů *Schistochilopsis opacifolia* a *S. incisa*.
Table 1. Identification characters of *Schistochilopsis opacifolia* and *S. incisa*.

Znak	<i>S. opacifolia</i>	<i>S. incisa</i>
Tvar listu	obvykle širší než delší	± stejně dlouhé nebo delší než širší
Zářez listových laloků	do 1/5–1/3 délky	do 1/3–1/2 délky
Okraje listových laloků	± celokrajně, nejvýše s ojedinelými zuby	po okrajích zubaté až ostnitě
Vrstevnatost listů na bázi	až do 2/3 délky listu dvou- pětivrstevné	u báze krátce dvouvrstevné nebo i jednovrstevné
Gemy	18–33 × 18–40 μm (průměrná délka kolem 30 μm), výrazně úhelnaté, tj. s výrazně vybihavými rohy)	18–20 × 18–25 μm (průměrná délka kolem 20 μm), zaobleně 4- či víceboké, rohy nezřetelně vybihavé
Ústí periantu	zubaté (zuby jednobuněčné, do 90 μm délky)	brvitě (brvy 1–3buněčné, až 250 μm dlouhé)
Výtrusy	11–17 μm	15–21 μm

V herbáři CBFS byly nalezeny čtyři položky druhu *S. opacifolia*, v herbáři PRC žádná a v soukromém herbáři J. Váni byla nalezena jedna starší položka druhu. Všechny tyto položky kromě položek sbíraných v loňském roce byly původně určeny jako *S. incisa*. Revize položky sbírané M. Zmrhalovou pod Labskou boudou a určené jako *S. grandiretis* rovněž odhalila záměnu za druh *S. opacifolia*. Většina sběrů pochází pocházejí z Labského dolu, a to většinou z horní části Labské rokle mezi Labským vodopádem a Labskou boudou, dvě položky byly sbírány v horní části Pančavského vodopádu. Zde je uveden jejich úplný výčet:

- Krkonoše, Labský důl: Labská rokle, na cestě u Labské boudy, ca 1270 m n. m., 9. 9. 1960, leg. V. Kotoučková, herb. Váňa.
- Krkonoše, Labský důl: Labská rokle, boční přítok Labe 240 m nad soutokem s Labem (sv.), 520 m v. Labské boudy [S-1942: M33 E3539,20 N5626,79], ca 1250 m n. m., na vlhkém humusu přes žulový kámen pod kapavým převisem skály, jv. orientace, 26. 7. 2001, leg. J. Kučera 8225, CBFS.
- dtto, Labská rokle, břeh Labe 160 m s. – ssv. Labské boudy [E3538,658 N5626,928], 1300 m n. m., horizontálně na žulovém kameni v potoce, polostín, 28. 6. 2003, leg. M. Zmrhalová, SUM.
- dtto, Labská rokle, břeh Labe, 100 m ssv. Labské boudy, 25 m pod mostem přes Labe [E3538,703 N5626,911], 1290 m n. m., vlhký žulový kámen na pravém břehu potoka, stín, 2. 9. 2015, leg. J. Kučera 18520, CBFS. **GenBank accession no. KU954332.**
- dtto, Labská rokle, jiz. rokle ústící u paty Labského vodopádu, 50 m nad soutokem s Labem [E3538,877 N5626,917], 1260 m n. m., na vlhkém humusu na žulové skalce na pravém břehu potoka, polostín, 2. 9. 2015, leg. J. Kučera 18508, CBFS. **GenBank accession no. KU954334.**
- Krkonoše, Labský důl: Pančavský vodopád, pravá strana, 120–130 m vsv. od horní hrany [E3538,723 N5625,822 a E3538,720 N5625,816], ca 1170 m n. m., 28. 7. 2001, leg. J. Kučera, CBFS: vlhký humus na stinné skalní římsce pod

převísem (Kučera 8286) a štěrbina jv. orientované žulové skály (Kučera 8289 **GenBank accession no. KU954333**).

- Úpská jáma: Sněžná strouha, horní část, ca 870 m sv. vrcholu Studniční hory [E3550,63, N5622,67], 1295 m n. m., kolmo na sv. orientovaném skalním výchozu, stín, 25. 7. 2002, leg. M. Zmrhalová, SUM.

Revize dalších položek sbíraných ve vrcholové oblasti Krkonoš (Úpská jáma, důl Bílého Labe, Čertova zahrádka) druhým autorem, B. Buryovou a dalšími autory (herbáře PRC, PRA a soukr. herbář J. Váni) naopak neodhalila další záměny druhů *S. incisa* a *S. opacifolia*.

DISKUSE

Nově zjištěné výskyty druhu *Schistochilopsis opacifolia* ukazují, že se nejedná o neznámý (Kučera et al. 2012), ani zcela extrémně vzácný druh naší flóry, jak by se dalo soudit z předchozího zpracování jeho rozšíření (Váňa 1992). V nejvyšších polohách Krkonoš byl dosud prokazatelně přehlížen a zaměňován za běžný druh *S. incisa*, popřípadě *S. grandiretis*. Lze očekávat, že úplná revize herbářových položek by mohla přinést další nálezy, i když dosud provedené revize nepotvrzují, že by výskyt *S. opacifolia* ve vyšších polohách Krkonoš nad výskytem druhu *S. incisa* zjevně převažoval. Nejzajímavější otázkou zůstává, zda je taxon u nás svým rozšířením omezen na Krkonoše nebo se vyskytuje i v ostatních našich vyšších pohořích, zejména Hrubém Jeseníku; dosud provedená revize sběrů M. Zmrhalové (herbář SUM) zatím žádný výskyt druhu v pohoří neodhalila. Ve vrcholových částech Krkonoš mohou oba druhy prokazatelně růst i na stejných lokalitách, ačkoliv se z větší části liší ekologicky – *S. incisa* dává přednost tlejícímu dřevu, *S. opacifolia* vlhkému humusu při potůčcích, ve svahových prameništích nebo ve štěrbínách silikátových skal. Dokumentované populace byly poměrně malé, porůstající dohromady nejvýš několik dm² plochy, nezdálo se však, že by byly bezprostředně ohroženy. Vzhledem k omezenému výskytu a velikosti populace však musí být druh *S. opacifolia* na našem území být hodnocen minimálně v kategorii VU podle kritéria D2 (extrémně malé obývané území), v případě předpokládaného ohrožení biotopu či úbytku populace (ani jedno nelze zatím s jistotou vyloučit) by druhu náleželo hodnocení v kategorii EN podle kritéria B2ab.

Molekulární identifikace potvrdila, že určení na základě udávaných znaků je poměrně spolehlivé, ať se jedná o tvar listů či gem. Je samozřejmě možné, že tyto znaky by byly relativizovány na větším množství určovaného materiálu. Získané sekvence navíc odhalily ne zcela zanedbatelnou variabilitu druhu *S. opacifolia*, což je při vzácnosti taxonu u nás a geografické blízkosti analyzovaných populací poměrně překvapivé, nicméně potvrzuje to podobná zjištění o variabilitě druhu, získaná isoenzymovou analýzou peroxidáz (Krzakowa et al. 1991).

PODĚKOVÁNÍ

Autoři děkují M. Zmrhalové, B. Shaw a Z. Palicemu za vyhledání dřive sbíraných položek rodu *Schistochilopsis* v zájmových územích a jejich poskytnutí ke studiu a kurátorům herbáře PRA za zapůjčení položek.

LITERATURA

- Bakalin V. A. (2011): Notes on *Lophozia* VI. Taxonomy and distribution of *Lophozia* and *Schistochilopsis* (Lophoziaceae) in North America north of Mexico. – *Bryologist* 114: 298–315.
- Bisang I. (1991): Biosystematische Studien an *Lophozia* subg. *Schistochilopsis*. – *Bryophytorum Bibliotheca* 43: 1–187.
- Damsholt K. (2002): Illustrated Flora of Nordic Liverworts and Hornworts. – Kleinstieber, Lund.
- de Roo R. T., Hedderson T. A. & Söderström L. (2007) Molecular insights into the phylogeny of the leafy liverwort family Lophoziaceae Cavers. – *Taxon* 56: 301–314.
- Hubáčková J. & Váňa J. (1990): 101. *Lophozia incisa* (Schrad.) Dum. – In: Duda J. & Váňa J., Rozšíření játrovek v Československu – LVII, Časopis Slezského Zemského Muzea, Ser. A, 39: 25–37.
- Katoh K. & Standley D. M. (2013): MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. – *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Köckinger H. & Kučera J. (2011): *Hymenostylium xerophilum*, sp. nov., and *H. gracillimum*, comb. nov., two neglected European mosses and their molecular affinities. – *Journal of Bryology* 33: 195–209.
- Krzakowa M., Szweykowski J., Bisang I. & Kozlicka M. (1991): Peroxidases as taxonomic characters in *Lophozia incisa* (Schrad.) Dum. and *L. opacifolia* (Culm.) Meyl. – *Journal of Bryology* 16: 551–559.
- Kučera J., Váňa J. & Hradílek Z. (2012): Bryophyte flora of the Czech Republic: updated checklist and Red List and a brief analysis. – *Preslia* 84: 813–850.
- Kučera J., Zmrhalová M., Buryová B., Košnar J., Plášek V. & Váňa J. (2004): Bryoflora of the glacial cirques of the Western Krkonoše Mts. – *Časopis Slezského Zemského Muzea, Ser. A, 53: 1–47.*
- Müller K. F. (2005): SeqState — primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA datasets. – *Applied Bioinformatics* 4: 65–69.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D. L., Darling A., Höhna S., Large B., Liu L., Suchard M. A. & Huelsenbeck J. P. (2012): MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. – *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Simmons M. P. & Ochoterena H. (2000): Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. – *Systematic Biology* 49: 349–381.
- Spagnuolo V., Caputo P., Cozzolino S., Castaldo R. & de Luca P. (1999): Patterns of relationships in Trichostomoideae (Pottiaceae, Musci). – *Plant Systematics and Evolution* 216: 69–79.
- Szweykowski J. & Kozlicka M. (1974): Wątrobowce (Hepaticae) [Liverworts (Hepaticae)]. – In: Szweykowski J. & Wojterski T. (eds), Atlas rozmieszczenia roślin zarodnikowych w Polsce [Atlas of geographical distribution of spore plants in Poland], Ser. IV., Vol. 8, Polska Akademia Nauk, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, Poznań.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. & Bouvet J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. – *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Váňa J. (1992): 102. *Lophozia opacifolia* Culm. in Meyl. – In: Duda J. & Váňa J., Rozšíření játrovek v Československu – LXI, Časopis Slezského Zemského Muzea, Ser. A, 41: 52–53.

- Vilnet A. A., Konstantinova N. A. & Troitsky A. V. (2008): Phylogeny and systematics of the genus *Lophozia* s. str. (Dumort.) Dumort. (Hepaticae) and related taxa from nuclear ITS1-2 and chloroplast trnL-F sequences. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 403–418.
- Vilnet A. A., Konstantinova N. A & Troitsky A. V. (2010): Molecular insight on phylogeny and systematics of the Lophoziaceae, Scapaniaceae, Gymnomitriaceae and Jungermanniaceae. – *Arctoa* 19: 31–50.
- Vilnet A. A., Milyutina I. A., Konstantinova N. A., Ignatov M. S. & Troitsky A. V. (2007): Phylogeny of the genus *Lophozia* (Dumort.) Dumort. s. str. inferred from nuclear and chloroplast sequences ITS1–2 and trnL–F. – *Russian Journal of Genetics* 43: 1306–1313.
- Werner O., Ros R. M. & Guerra J. (2002): Direct amplification and NaOH extraction: two rapid and simple methods for preparing bryophyte DNA for polymerase chain reaction (PCR). – *Journal of Bryology* 24: 127–131.