

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra Botaniky



Morfologická plasticita chrpy luční (*Centaurea jacea* L.).

Diplomová práce

Bc. Jakub Karásek

Vedoucí práce: Mgr. Petr Koutecký, PhD.

České Budějovice 2010

Karásek, J., 2010: Morfologická plasticita chrpy luční (*Centaurea jacea*) [Morphologic plasticity of *Centaurea jacea*, Masters thesis in Czech] p – 44 + 6 The Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace: Byl zkoumán rozsah morfologické plasticity chrpy luční (*Centaurea jacea* L.). Plasticita populací poddruhu *Centaurea jacea* subsp. *jacea* v jižních Čechách byla porovnána s variabilitou celého druhu v širším areálu. Byl prokázán překryv lokálních druhů s oběma poddruhy. Byly nalezeny korelace determinačních znaků a faktorů prostředí. Molekulární analýza pomocí metody ISSR nenalezla rozdíly mezi poddruhy. Pro definitivní rozluštění podstaty poddruhů je nutné provést navazující studii.

Anotation: Morphological plasticity of brown knapweed (*Centaurea jacea* L.) was examined. South bohemian populations of subsp. *jacea* were compared to plasticity in larger area. The plasticity of local population overlaps with both subspecies. The correlation between abiotical factors and determination characteristics were found. Molecular survey using ISSR method shows no difference between subspecies. The final resolution of subspecies existence will be questioned in following study.

Klíčová slova: Chrpa luční, *Centaurea jacea*, morfologická variabilita, ISSR, fragmentační analýza

Keywords: *Centaurea jacea*, Brown Knapweed, morphological plasticity, ISSR, fragment analysis

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s použitím uvedených zdrojů.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č.111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 29.4.2010

Jakub Karásek

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Petru Kouteckému, za inspirativní vedení a hlavně pevné nervy při dokončování mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat Jiřímu Košnarovi za ochotu a pomoc při práci v laboratoři molekulární biologie rostlin. A v poslední řadě děkuji také své přítelkyni Martině Balzarové za psychickou podporu v posledních dnech před odevzdáním.

Práce byla částečně financována grantem SGA 2009/009

Obsah

1 Úvod.....	3
1.1 Rod <i>Centaurea</i>	3
1.2 <i>Centaurea jacea</i> agg.....	4
1.4 <i>Centaurea jacea</i>	5
1.4.1. Morfologie.....	5
1.4.2 Taxonomie.....	6
2 Cíle práce.....	9
3 Materiál a metody.....	10
3.1 Morfologická plasticita.....	10
3.1.1 <i>Centaurea jacea</i> subsp. <i>jacea</i>	10
3.1.2 Celková variabilita <i>C. jacea</i>	12
3.1.3 Úprava dat a výběr znaků.....	12
3.2 Kultivační pokus.....	16
3.3 Molekulární analýza.....	16
3.3.1 Izolace DNA.....	16
3.3.2 Sekvence ITS.....	17
3.3.3 ISSR.....	17
4 Výsledky.....	20
4.1 Morfologická plasticita.....	20
4.2 Vliv prostředí.....	28
4.3 Kultivační pokus.....	31
4.3.1 Reakce na zastínění.....	31
4.3.2 Reakce na sucho.....	31
4.3 Sekvence.....	32
4.4 Fragmentační analýza.....	32
4.5 Shrnutí.....	35
5 Diskuze.....	37

5.1 Morfologická plasticita.....	37
5.2 Kultivační experiment	38
5.3 Molekulární analýza	39
5.4 Shrnutí	39
6 Závěr.....	41
7 Literatura	42
8 Přílohy	i

1 Úvod

1.1 Rod *Centaurea*

Rod chrpa (*Centaurea*) se taxonomicky řadí do čeledi *Asteraceae* podčeledi *Cichorioideae* tribu *Cardueae* subtribu *Centaureinae* (Hellwig 1996, Häffner et Hellwig 2000, Garcia-Jacas et al. 2001). Dle různého druhového pojetí obsahuje přibližně 400-700 druhů (Dittrich 1977, Bremer 1994, Wagenitz and Hellwig 1996), což představuje 4. největší rod v čeledi. Rod *Centaurea* je rozšířený v Evropě, jihozápadní Asii a severní Africe. Několik druhů se vyskytuje i v Africe jižně od Sahary, v Severní a Jižní Americe (Meusel et Jäger 1992, Hellwig 2004). Vývojové centrum rodu spojené s největší druhovou diverzitou se nachází v oblasti Středozemního moře (Wagenitz 1975, Hellwig 2004). Několik druhů chrp rodu *Centaurea* je invazních, zejména v Severní Americe, kde invadují hlavně *C. solstitialis*, *C. melitensis* a *C. maculosa* (Roche & Roche 1991, Pitcairn et al. 1998).

Z hlediska taxonomie a nomenklatury patří rod *Centaurea* k velmi obtížným skupinám evropské flóry (Bremer 1994, Susanna et al. 1995, Gabrielyan 1995, Wagenitz and Hellwig 1996). Nejasné je zejména vymezení druhů, které je v některých skupinách dále komplikováno absencí reprodukčních bariér. Na styku populací několika druhů pak dochází ke křížení, někdy i vícenásobnému, a vzniku hybridních populací. Snaha popisovat různé, často hybridní taxony je pak příčinou komplikované nomenklatorické situace, kdy je jeden taxon různými autory různě nazýván a naopak jedno jméno je různými autory různě vykládáno a přiřazováno k různým taxonům.

Na území České republiky je nejobtížnější taxonomie a determinace chrp ze sect. *Jacea*. Kvůli celkové podobnosti jednotlivých taxonů a nedostatku vhodných znaků se špatně určují. Určování dále znesnadňuje poměrně velká plasticita ve vztahu k podmínkám prostředí. Hlavním znakem pro určování chrp ze sekce *Jacea* je tvar přívěšků zákrovních listenů. Podle něj a dalších znaků lze středoevropské taxony rozdělit do několika dobře vyhraněných skupin: *Centaurea jacea* agg., *Centaurea nigrescens* agg., *Centaurea nigra*, *Centaurea phrygia* agg. (Dostál 1976, Štěpánek et Koutecký 2004) Tyto vyjmenované skupiny se dají snadno rozpoznat, ale rozlišení taxonů uvnitř nich je obvykle značně obtížné. Chrpy sekce *Jacea* jsou polyploidní komplex se dvěma úrovněmi ploidie, základní chromozómové číslo je $x = 11$ (Hellwig 2004), přičemž jsou známy diploidní ($2n = 22$) a tetraploidní ($2n = 44$) taxony (Dostál 1976).

To ovlivňuje zejména některé jejich vlastnosti, mimo jiné i vzájemnou hybridizaci. Taxony o stejné ploidii se velmi dobře kříží a kříženci jsou obvykle také plodní. Zatímco kříženci taxonů různé ploidie jsou vzácní a téměř sterilní. Různá ploidní úroveň tak představuje významnou reprodukční bariéru (Gardou 1972, Hardy et al. 2000, 2001).

V rámci jednotlivých ploidních úrovní však vznikají složité hybridní populace a dokonce dochází ke vzniku vícenásobných kříženců. Na základě morfologických znaků je obtížné tyto hybridy určovat. Ve většině znaků totiž vykazují průměr hodnot mezi rodiči. Nejnápadnější jsou kříženci mezi *C. jacea* jako jedním z rodičů a některým jiným taxonem jako druhým. Tito kříženci mají přívěsky zákrovních listenů nepravidelného tvaru s bočními trásněmi nepravidelně srostlými. Vzhledem k hojnosti a rozšíření *C. jacea* jsou v populacích ostatních taxonů velmi časté.

1.2 *Centaurea jacea* agg.

Tato skupina druhů je vymezena dvěma výraznými morfologickými znaky (Dostál 1976, 1982, 1989).

1) Absence chmýru nažek

2) Tvar přívěsků středních zákrovních listenů, které jsou víceméně okrouhlé, poměrně široké a na okraji celokrajné nebo nepravidelně mělce vykousávaně zoubkaté, většinou miskovitě prohnuté (vypuklé).

Kvůli absenci chmýru nažek jsou ve většině starších i novějších klíčů a flór (např. Wagenitz 1987, Adler et al. 1994, Štěpánek 2002, Fischer et al. 2008) do této skupiny přiřazovány i druhy *Centaurea macropetala* BORBÁS a *C. oxylepis* (WIMM. et GRAB.) HAYEK, často jako poddruhy *C. jacea* L. Odlišují se však výrazně tvarem přívěsků zákrovních listenů, které jsou na okraji pravidelně hřebenitě trásnité, jejich nedělená část je trojúhelníkovitá někdy až úzce trojúhelníkovitá. Z tohoto důvodu je považují za samostatné druhy mimo agg. a dále se jimi moje práce nezabývá.

Do skupiny *Centaurea jacea* agg. je řazeno více jak deset taxonů, např. Flora Europaea jich uvádí v ranku druhu a poddruhu dvanáct (Dostál 1976), některé další byly popsány později (Poldini 1977, Dostál 1989). Většina taxonů ze skupiny *C. jacea* agg. se vyskytuje v jižní polovině Evropy. Taxonomická problematika celé skupiny v jižní Evropě je velmi složitá

a na základě současných poznatků není situace uspokojivě řešitelná a vyžaduje důkladnou revizi.

Ve střední Evropě je nejběžnějším taxonem skupiny *Centaurea jacea* L. s přívěsky středních zákrovních listenů 4 mm. Dále jsou udávány:

Centaurea weldeniana RCHB., s přívěsky zákrovních listenů světle okrově zbarvenými a mírně průsvitnými, většími než u *C. jacea*, širokými okolo 6–7 mm. Rostliny jsou velmi hustě šedoplstnaté rostliny fenologicky pozdní, primární areál tohoto druhu sahá od Řecka po Itálii. Ze střední Evropy je známá od obce Gießhübl nedaleko Vídně (Koutecký 2008). Patrně mylný údaj pochází z jižního Slovenska (Dostál 1989, Dostál et Červenka 1992)

Centaurea bracteata SCOP. Výrazně šedivě chlupaté rostliny s velkými a světlými přívěsky zákrovních listenů o šířce 5–8 mm. Původní v jižních Alpách a přilehlých balkánských pohorích, (Dostál 1976, Meusel et Jäger 1992). Sporný údaj z Třeboňska (Dostál et Červenka 1992)

Taxon, *Jacea tomentosa* DOSTÁL, uváděný Dostálem (1989) nebyl ve skutečnosti nikdy platně popsán. Je udáván ze slanisek jižního Slovenska. Morfologicky má být *Jacea tomentosa* údajně podobná *C. jacea* subsp. *angustifolia*, ale listy mají být hustě bělovlnaté, větve krátké, úbory malé se zákrovem jen 8–10 mm v průměru, přívěsky zákrovních listenů bledě hnědé až bělavé. Patrně se jedná jen o adaptaci na konkrétní stanovištní podmínky (Koutecký 2008).

1.4 *Centaurea jacea*

1.4.1. Morfologie

Vytrvalá, 50–120 cm vysoká rostlina s hranatou lodyhou vystoupavou až přímou v horní polovině řídce větvená. Přízemní listy jsou dlouze řapíkaté, celistvé až peřenodílné, lodyžní střídavé, řapíkaté až přisedlé, celistvé, vejčité až kopinaté. Okraje zubaté nebo pilovité. Úbory vyrůstají jednotlivě nebo po dvou na koncích větví, skládají se z pouze z pěticípých růžových až růzovofialových trubkovitých květů. Průměr úboru je přibližně 4 cm. Plodem je nažka. Kvete od července do září. (Štěpánek et Koutecký 2004)

Tento druh chrpy roste na loukách, pastvinách, okrajích lesů, v příkopech a na mezích. Upřednostňuje světlá a sušší až středně vlhká stanoviště a neutrální až slabě kyselá půdy bohaté na živiny. (Ellenberg 1974).

Přirozený areál sahá na západě po severní Španělsko a Francii, na severu po střední Skandinávii a sever Ruska, na jihu po severní Itálii, střední Balkán, Ukrajinu, na východě až k Uralu. Sekundární výskyt je zaznamenán z jižní Anglie. Zavlečena je také do Grónska, Severní Ameriky a Argentiny, Japonska a Altaje. (Dostál 1976, Meusel et Jäger 1992). V České Republice se vyskytuje téměř na celém území s těžištěm výskytu v nížinách a pahorkatinách. (Štěpánek et Koutecký 2004)

1.4.2 Taxonomie

Značná morfologická variabilita vedla v minulosti řadu autorů k popisu mnoha vnitrodruhových taxonů popsaných na základě jediného nebo několika málo znaků jako barva přívěsků, šířka listů, výška lodyhy, odění apod. (např. Koch 1843, 1844, Gugler 1904, 1907, Hruby 1931). Tyto snahy kritizují již Hayek (1918) a Wagner (1939).

Podobně byla popsána i řada taxonů vzniklých hybridizací vyznačujících se pravidelně hřebenitě trásnitými přívěsky zákrovních listenů (Wagenitz 1987).

V ranku druhu nebo poddruhu je ve většině recentních středoevropských flór a určovacích klíčů uváděn taxon *Centaurea subjacea* (Dostál 1976, Dostál 1989, Dostál et Červenka 1992, Meusel et Jäger 1992, Shubert et Vent 1994, Kubát et al. 2002, Fisher et al. 2005). *Centaurea subjacea* má podle literatury připomínat *C. jacea*, od které se má odlišovat zejména pravidelně hřebenitě trásnitými přívěsky středních zákrovních listenů, které jsou široce vejčité a jejichž koncová tráseň není delší než postranní trásně. Je udávána z České republiky, Slovenska, Polska, Německa, Maďarska a Rakouska (Dostál 1976). Revize tohoto taxonu prokázala jeho hybridní původ (Koutecký 2009). Jedná se o křížence *C. jacea* a *C. macroptilon* a nemá tedy smysl tento taxon dále samostatně rozlišovat.

Většina současné literatury se shoduje, že ve střední Evropě má smysl rozeznávat dva taxony, uváděné buď v ranku poddruhu jako *Centaurea jacea* L. subsp. *jacea* a subsp. *angustifolia* Gremlí (např. Wagenitz 1987, Adler 1994, Shubert et Vent 1994, Oberdorfer 1994, Lange 1996, Ochsmann 1998, Štěpánek 2002, Štěpánek et Koutecký 2004, Fischer et al. 2005, Jäger et Werner 2005) nebo, méně často, jako druhy *C. jacea* L. s. str. a *C. pannonica* (HEUFF.) SIMONK. (Dostál 1976, 1989, Dostál et Červenka 1992). Vzhledem k neostrému vymezení (překryv morfologických znaků) a existenci populací přechodného charakteru ve své práci používám koncepci poddruhů. V tabulce 1 jsou shrnuty v literatuře obvykle udávané rozlišovací znaky mezi *C. jacea* subsp. *jacea* a subsp. *angustifolia*.

Tab. 1: Morfologické znaky sloužící k determinaci poddruhů druhu *Centaurea jacea*.

subsp. <i>jacea</i>	subsp. <i>angustifolia</i>
lodyha nevětvená nebo větvená nad polovinou délky	lodyha pod polovinou délky ± bohatě větvená
větve krátké, pod úborem někdy ztlustlé, řídce olistěné	větve dlouhé, prutovité, pod úborem tenké, neztlustlé, bohatě olistěné
střední a horní lodyžní listy podlouhle až vejčité kopinaté	střední a horní lodyžní listy čárkovitě kopinaté
listy hladké nebo slabě drsné, lysé nebo pýřité nebo tence šedoplstnaté a olysávající, zelené	listy ± drsné, přitisklé pavučinaté nebo řídce běloplstnaté, olysávající, šedivě zelené
zákrovy válcovité nebo vejcovitě válcovité, 15–18×12–15 mm	zákrovy vejcovité, 13–16×8–10 mm
přívěsky středních zákrovních listenů bělavé, uprostřed často tmavší	přívěsky středních zákrovních listenů bledě až tmavě hnědé, uprostřed často světlejší
fenologicky časnější	fenologicky pozdější
mezická stanoviště vyšších poloh	suchá a teplá stanoviště nižších poloh

Dosavadní zkušenosti naznačují, že rostliny, pocházejících z kosených stanovišť, a zvláště rostliny druhé generace, mají většinou méně větví, které jsou spíše vzpřímené a ne odstálé, dále mají většinou výrazně širší listy, ale zároveň delší internodia (jsou řídce olistěné), mívají řidší odění (nebývají šedivé) a jisté rozdíly jsou i na úborech. Určitý vliv na morfologii rostlin má i vlhkost a oslunění stanoviště, zejména na větvení rostlin, šířku listů a odění.

Je patrné, že rostliny jsou ve vztahu k prostředí plastické právě v těch znacích, které jsou používány k determinaci poddruhů. Geografické rozšíření obou poddruhů - subsp. *jacea* má být spíše chladnomilná a vázaná na horské a podhorské habitaty, zatímco subsp. *angustifolia* má vykazovat preferenci k teplomilným a nížinným stanovištím poukazuje na fakt, že charakteristiky prostředí, které ovlivňují determinační znaky, jsou korelovány s nadmořskou výškou.

Zároveň ve středních nadmořských výškách existují přechodné formy kombinující znaky obou poddruhů. Tento fakt jen podtrhuje tuto domněnku. Přechodné populace jsou někdy označovány jako *C. jacea* subsp. *jungens* GUGLER.

Přesný rozsah plasticity není znám a je třeba ho zkoumat, vyhodnotit a posoudit do jaké míry je třeba brát tuto plasticitu v úvahu při určování a taxonomickém zpracování skupiny a analýze rozšíření jednotlivých taxonů.

Podle současných znalostí lze na studovanou skupinu nahlížet dvěma alternativními způsoby:

1) Jedná se pouze o jeden taxon, kdy popsané poddruhy jsou jen extrémní morfologické plasticity na gradientu stanovištních podmínek. Přechodné populace pak představují jedince ležící mezi těmito extrémními (v intermediálních podmínkách prostředí).

2) Jedná se o dva odlišné taxony, jejichž rozdíly jsou skutečně dány různou evoluční historií, přechodné populace pak mohou představovat pouze extrémní stavy v okrajových podmínkách prostředí každého z poddruhů a nebo se může jednat o vzájemné křížence.

2 Cíle práce

- 1) Dokumentace rozsahu morfologické plasticity u *Centaurea jacea* subsp. *jacea* v malém klimaticky homogenním území a srovnání této variability s celkovou plasticitou druhu.
- 2) Pomocí kultivačního pokusu zjistit změny v morfologii v závislosti na změně prostředí
- 3) Otestování metodiky molekulárních analýz, použitelné ke zjištění genetické podstaty studovaných poddruhů.

3 Materiál a metody

3.1 Morfologická plasticita

Studium morfologické plasticity doplňuje morfometrickou analýzu okruhu *C. jacea* (Koutecký 2008). K analýze byly použity dva datové soubory. První datový soubor představují vlastní data z populací *Centaurea jacea* subsp. *jacea* v jižních Čechách. Druhý soubor představují data poskytnutá z práce školitele (Koutecký 2008) dokumentující variabilitu *C. jacea* na území České republiky a Slovenska.

3.1.1 *Centaurea jacea* subsp. *jacea*

Ke zjištění rozsahu plasticity byla sbírána data z populací pocházejících z různých typů prostředí v rámci relativně malého území, ve kterém lze předpokládat výskyt jediného taxonu, resp. genový tok mezi jednotlivými populacemi druhu. Celkem bylo změřeno 32 populačních vzorků z Jihočeského kraje (seznam a popis lokalit příloha 1). Z každé studované populace bylo náhodně odebráno 15 plně vyvinutých nepoškozených jedinců v době květu nebo plodu. Nebyli sbíráni jedinci s poškozeným nebo ukousnutým terminálním úborem, protože to silně mění charakter větvení lodyhy. Na kosených plochách byly sbírány rostliny druhé generace. Chrpy často tvoří trsy s mnoha kvetoucími lodyhami, zejména na lokalitách delší dobu neobhospodařovaných. Protože se jedná o jediného jedince, byla z každého trsu odebrána pouze jedna lodyha. Na každé lokalitě byly na poměrové škále 1-3 zaznamenána vlhkost, dále byl pořízen fytoecologický snímek o velikosti 4x4m. V programu Juice 7.0 (Tichý 2002) byly pro každý snímek vypočteny průměrné Ellenbergovy hodnoty pro teplotu, vlhkost, světelné podmínky, pH půdy, obsah živin a kontinentalitu. Na každé rostlině bylo změřeno 19 kvantitativních a 12 binárních znaků a spočítáno 8 poměrů (tab. 2). Byly zahrnuty všechny znaky udávané v literatuře jako důležité pro určování studované skupiny a dále několik znaků, které se zdály jako potenciálně použitelné na základě terénních zkušeností. Všechny znaky s výjimkou zákrovních listenů byly měřeny přímo na čerstvém materiálu, rostliny pak byly vylisovány a uloženy pro doměření zbylých znaků a pro případnou revizi.

Tab. 2: Morfologické znaky měřené na *Centaurea jacea*.

Kvantitativní:	Znak	Popis
PV	počet kvetoucích větví	
PL	počet listů na lodyze	
VN	délka nevětvené části lodyhy	cm; od země po první kvetoucí větev
VV	délka větvené části lodyhy	cm; od první kvetoucí větve po terminální zákrov
VC	celková výška lodyhy	cm; VN + VV
VU	úhel mezi nejdelší větví a hlavní lodyhou	stupně
VD	délka nejdelší větve	cm
VL	počet listů na nejdelší větví	
LD	délka čepele středního lodyžního listu	cm
LS	šířka čepele středního lodyžního listu	cm
LVD	délka čepele středního listu nejdelší větve	cm
LVS	šířka čepele středního listu nejdelší větve	cm
UV	výška zákrovu terminálního úboru	mm
US	šířka zákrovu terminálního úboru	mm
UZ1	šířka nejdelší větve v její neztlustlé části	mm; alespoň 5 cm pod koncovým úborem
UZ2	šířka nejdelší větve v její ztlustlé části	mm; těsně pod koncovým úborem
UZR	rozdíl v šířce nejdelší větve mezi její ztlustlou a neztlustlou částí	mm
ZD	délka středních přívěsků zákrovních listenů	mm
ZS	šířka středních přívěsků zákrovních listenů	mm
Poměry	Znak	Popis
VVC	podíl větvené části na celkové délce lodyhy	VV / VC
VDV	poměr délky nejdelší větve k délce větvené části lodyhy	VD / VV
VDL	délka internodia na nejdelší větví	VD / VL
LDS	poměr délky a šířky čepele středních lodyžních listů	LD / LS
LVDS	poměr délky a šířky čepele středního listu nejdelší větve	LVD / LVS
UVS	poměr výšky a šířky zákrovu terminálního úboru	UV / US
UZ21	ztlustnutí lodyhy (poměr šířky ztlustlé a neztlustlé části)	UZ2 / UZ1
ZDS	poměr délky a šířky přívěsků středních zákrovních listenů	ZD / ZS
Binární	Znak	Popis
VT	tvár větví	0 – přímé, prutovité; 1 – zřetelně prohnuté směrem vzhůru
VB	větvení bočních větví	0 – nevětvené, příp. jen skupinka ± přisedlých úborů na konci; 1 – větvené
OS	šedivé odění střední části lodyhy a středních lodyžních listů	0 – chybí; 1 – přítomno
OH	šedivé odění horní části lodyhy a horních lodyžních listů	0 – chybí; 1 – přítomno

LO	okraj středních lodyžních listů	0 – celokrajné nebo jen drobně zubaté; 1 – laločnaté
LB	tvár báze horních lodyžních listů	0 – široká; 1 – klínovitá
LI	poměr délky středních lodyžních listů a internodií	0 – listy kratší než internodia; 1 – listy delší než internodia
UT	tvár zákrovu terminálního úboru	0 – kulovitý; 1 – vejčitý nebo válcovitý, zřetelně vyšší než široký
UZ	ztlustnutí bočních větví pod úbory	0 – chybí nebo nezřetelné; 1 – zřetelné
ZDO	tvár přívěsků vnějších zákrovních listenů (2. a 3. řada)	0 – kulovité nebo eliptické, celokrajné nebo nepravidelně zubaté; 1 – ± trojúhelníkovité, ± pravidelně třásnité
ZNO	tvár přívěsků vnějších zákrovních listenů (1. řada)	0 – kulovité nebo eliptické, celokrajné nebo nepravidelně zubaté; 1 – ± trojúhelníkovité, ± pravidelně třásnité
ZB	barva přívěsků středních zákrovních listenů	0 – centrální část tmavší než okraj; 1 – centrální část světlejší než okraj

3.1.2 Celková variabilita *C. jacea*

Druhý datový soubor byl získán z předchozí studie školitele. Jedná se o 34 populačních vzorků obou poddruhů a jejich vzájemných přechodů z celého území Česka a Slovenska. Účelem původní studie bylo pokusit se rozlišit udávané taxony v rámci *C. jacea*. Proto bylo nutné odfiltrovat z dat vliv morfologické plasticity, která by mohla rozdíly mezi taxony překrýt. Vzorky proto byly sbírány pouze na jediném „standardním“ typu stanoviště: nekosená osluněná místa a bez extrémních hodnot v ostatních faktorech (např. vlhkost). Lokalizace populací jsou uvedeny v disertační práci školitele (Koutecký 2008), kromě 4 populací, které byly do datového souboru přidány dodatečně. Jejich lokalizace je uvedena v příloze 2.

3.1.3 Úprava dat a výběr znaků

V obou datových souborech byly analyzovány tytéž morfologické znaky, ve studii morfologické plasticity v jižních Čechách byly navíc přidány znaky počet listů a větví. Nejprve byla otestována normalita rozdělení pro jednotlivé znaky. Hodnoty znaků PV, VV, LVS, VL, UZ1, LD, LS, VC, VVC, VDL a LVD byly logaritmičticky transformovány. Pro mnohorozměrné analýzy byly hodnoty všech znaků normalizovány. Pro detekci atypických individuů uvnitř jednotlivých populací byla použita PCA jedinců. Nalezení jedinci (max. 3 na populaci) pak byli vyloučeni z dat pro výpočet průměrných hodnot pro jednotlivé populace. Spočteny byly jak parametrické (Pearsonovy) tak neparametrické (Spearmanovy) korelační koeficienty, jejich hodnoty se téměř neliší (Tab. 3).

Tab. 3: Spearmanovy korelační koeficienty, hodnoty nad 0,5 jsou zvýrazněny tučně.

	PL	PV	VN	VV	VD	VL	VU	LVD	LVS	UZ1	UZ2	LD	LS	UV	US	ZD	ZS	VC	UZR
PL	-	0,52	0,47	0,40	0,28	0,56	-0,11	0,08	-0,14	0,03	0,11	0,04	-0,15	-0,06	-0,19	0,00	-0,05	0,67	0,10
PV	0,52	-	0,07	0,84	0,59	0,55	0,07	0,35	0,17	0,21	0,24	0,26	0,21	0,17	0,09	0,15	0,08	0,56	0,16
VN	0,47	0,07	-	-0,02	-0,19	-0,03	-0,14	-0,30	-0,29	-0,19	-0,12	0,17	-0,12	-0,01	-0,04	-0,05	-0,06	0,78	-0,04
VV	0,40	0,84	-0,02	-	0,77	0,60	0,05	0,49	0,32	0,26	0,30	0,31	0,26	0,25	0,22	0,23	0,12	0,55	0,21
VD	0,28	0,59	-0,19	0,77	-	0,75	0,05	0,68	0,44	0,34	0,39	0,19	0,22	0,21	0,15	0,17	0,12	0,27	0,27
VL	0,56	0,55	-0,03	0,60	0,75	-	0,03	0,51	0,22	0,23	0,26	0,07	0,06	0,11	0,00	0,07	0,04	0,33	0,18
VU	-0,11	0,07	-0,14	0,05	0,05	0,03	-	0,10	0,09	0,06	0,03	0,01	0,07	0,08	0,07	0,07	-0,01	-0,12	0,00
LVD	0,08	0,35	-0,30	0,49	0,68	0,51	0,10	-	0,56	0,32	0,38	0,35	0,34	0,09	0,12	0,08	0,10	0,03	0,27
LVS	-0,14	0,17	-0,29	0,32	0,44	0,22	0,09	0,56	-	0,35	0,36	0,19	0,51	0,25	0,27	0,13	0,18	-0,08	0,24
UZ1	0,03	0,21	-0,19	0,26	0,34	0,23	0,06	0,32	0,35	-	0,55	0,11	0,31	0,20	0,16	0,18	0,12	-0,03	0,11
UZ2	0,11	0,24	-0,12	0,30	0,39	0,26	0,03	0,38	0,36	0,55	-	0,15	0,27	0,16	0,16	0,22	0,19	0,05	0,88
LD	0,04	0,26	0,17	0,31	0,19	0,07	0,01	0,35	0,19	0,11	0,15	-	0,48	0,08	0,14	0,04	0,03	0,32	0,11
LS	-0,15	0,21	-0,12	0,26	0,22	0,06	0,07	0,34	0,51	0,31	0,27	0,48	-	0,25	0,37	0,15	0,22	0,02	0,15
UV	-0,06	0,17	-0,01	0,25	0,21	0,11	0,08	0,09	0,25	0,20	0,16	0,08	0,25	-	0,55	0,32	0,27	0,09	0,07
US	-0,19	0,09	-0,04	0,22	0,15	0,00	0,07	0,12	0,27	0,16	0,16	0,14	0,37	0,55	-	0,27	0,31	0,04	0,09
ZD	0,00	0,15	-0,05	0,23	0,17	0,07	0,07	0,08	0,13	0,18	0,22	0,04	0,15	0,32	0,27	-	0,63	0,08	0,16
ZS	-0,05	0,08	-0,06	0,12	0,12	0,04	-0,01	0,10	0,18	0,12	0,19	0,03	0,22	0,27	0,31	0,63	-	0,02	0,16
VC	0,67	0,56	0,78	0,55	0,27	0,33	-0,12	0,03	-0,08	-0,03	0,05	0,32	0,02	0,09	0,04	0,08	0,02	-	0,07
UZR	0,10	0,16	-0,04	0,21	0,27	0,18	0,00	0,27	0,24	0,11	0,88	0,11	0,15	0,07	0,09	0,16	0,16	0,07	-
VVC	-0,10	0,52	0,69	0,70	0,67	0,42	0,16	0,55	0,44	0,32	0,31	0,09	0,29	0,21	0,23	0,20	0,13	-0,20	0,19
VDV	-0,28	-0,50	-0,22	-0,49	0,16	0,07	0,02	0,16	0,10	0,07	0,06	-0,20	-0,09	-0,11	-0,13	-0,12	-0,03	0,51	0,04
VDL	-0,37	0,11	-0,24	0,30	0,40	-0,30	0,01	0,27	0,32	0,18	0,20	0,18	0,25	0,14	0,21	0,15	0,13	-0,06	0,13
LDS	0,18	-0,07	0,24	-0,09	-0,11	-0,02	-0,03	-0,13	-0,42	-0,28	-0,19	0,09	-0,80	-0,22	-0,30	-0,13	-0,21	0,17	-0,07
LVDS	0,26	0,13	0,08	0,11	0,12	0,24	-0,03	0,24	-0,63	-0,12	-0,07	0,08	-0,30	-0,18	-0,17	-0,04	-0,08	0,13	-0,02
UVS	0,11	0,06	0,02	0,01	0,05	0,10	0,01	-0,04	-0,03	0,02	-0,01	-0,06	-0,11	0,41	0,50	0,00	-0,09	0,05	-0,02
UZ21	0,08	0,02	0,07	0,04	0,04	0,04	-0,05	0,06	-0,01	-0,49	0,45	0,04	-0,06	-0,08	-0,04	0,03	0,07	0,08	0,80
ZDS	0,05	0,06	0,02	0,08	0,02	0,02	0,09	-0,04	-0,07	0,06	0,01	0,00	-0,09	0,02	-0,07	0,33	0,51	0,06	-0,02
ZB	-0,17	-0,03	-0,04	0,01	-0,08	-0,12	0,01	-0,03	0,05	0,03	-0,01	0,10	0,12	0,09	0,14	0,07	0,02	-0,05	-0,03
UT	-0,05	0,00	0,01	-0,02	0,03	0,03	0,03	-0,03	0,02	0,04	-0,05	0,01	0,16	0,32	0,17	0,15	0,16	-0,01	-0,08
ZDO	-0,21	-0,04	-0,07	-0,05	-0,05	-0,12	0,04	0,00	0,03	0,03	-0,06	0,04	0,09	0,07	0,02	-0,06	-0,02	-0,09	-0,09
ZNO	-0,09	-0,03	-0,07	-0,07	-0,07	-0,08	-0,02	0,01	0,00	0,05	0,00	0,00	-0,02	-0,01	-0,04	-0,02	0,01	-0,11	-0,03
VT	-0,09	0,14	-0,16	0,14	0,09	0,02	0,36	0,14	0,11	0,14	0,09	0,00	0,06	0,06	0,06	0,07	0,05	-0,05	0,03
VB	0,23	0,40	-0,19	0,49	0,63	0,54	0,08	0,46	0,30	0,18	0,18	0,08	0,08	0,09	0,06	0,06	0,04	0,13	0,11
OS	0,08	-0,01	0,12	-0,04	-0,04	0,01	-0,07	0,00	0,01	0,02	0,04	0,02	0,04	0,01	-0,05	-0,01	0,06	0,05	0,04
OH	0,23	0,06	0,10	0,02	0,00	0,12	-0,01	0,04	-0,05	0,02	0,03	0,10	-0,03	-0,07	-0,12	0,01	0,02	0,10	0,03
LO	-0,04	0,04	-0,03	0,02	0,00	0,02	-0,06	0,05	0,08	0,04	0,01	0,13	0,37	0,06	0,09	0,10	0,09	-0,03	-0,02
LB	0,17	0,16	0,17	0,12	0,09	0,11	-0,02	0,02	-0,03	-0,04	0,02	0,14	0,01	-0,15	-0,07	-0,02	-0,03	0,21	0,04
LI	0,02	0,02	-0,03	0,04	0,05	0,06	0,04	0,09	0,06	0,08	0,05	0,05	0,04	0,04	0,02	-0,03	-0,02	-0,01	0,02

VVC	VDV	VDL	LDS	LVDS	UVS	UZ21	ZDS	ZB	UT	ZDO	ZNO	VT	VB	OS	OH	LO	LB	LI	
-0,10	-0,28	-0,37	0,18	0,26	0,11	0,08	0,05	-0,17	-0,05	-0,21	-0,09	-0,09	0,23	0,08	0,23	-0,04	0,17	0,02	PL
0,52	-0,50	0,11	-0,07	0,13	0,06	0,02	0,06	-0,03	0,00	-0,04	-0,03	0,14	0,40	-0,01	0,06	0,04	0,16	0,02	PV
-0,69	-0,22	-0,24	0,24	0,08	0,02	0,07	0,02	-0,04	0,01	-0,07	-0,07	-0,16	-0,19	0,12	0,10	-0,03	0,17	-0,03	VN
0,70	-0,49	0,30	-0,09	0,11	0,01	0,04	0,08	0,01	-0,02	-0,05	-0,07	0,14	0,49	-0,04	0,02	0,02	0,12	0,04	VV
0,67	0,16	0,40	-0,11	0,12	0,05	0,04	0,02	-0,08	0,03	-0,05	-0,07	0,09	0,63	-0,04	0,00	0,00	0,09	0,05	VD
0,42	0,07	-0,30	-0,02	0,24	0,10	0,04	0,02	-0,12	0,03	-0,12	-0,08	0,02	0,54	0,01	0,12	0,02	0,11	0,06	VL
0,16	0,02	0,01	-0,03	-0,03	0,01	-0,05	0,09	0,01	0,03	0,04	-0,02	0,36	0,08	-0,07	-0,01	-0,06	-0,02	0,04	VU
0,55	0,16	0,27	-0,13	0,24	-0,04	0,06	-0,04	-0,03	-0,03	0,00	0,01	0,14	0,46	0,00	0,04	0,05	0,02	0,09	LVD
0,44	0,10	0,32	-0,42	-0,63	-0,03	-0,01	-0,07	0,05	0,02	0,03	0,00	0,11	0,30	0,01	-0,05	0,08	-0,03	0,06	LVS
0,32	0,07	0,18	-0,28	-0,12	0,02	-0,49	0,06	0,03	0,04	0,03	0,05	0,14	0,18	0,02	0,02	0,04	-0,04	0,08	UZ1
0,31	0,06	0,20	-0,19	-0,07	-0,01	0,45	0,01	-0,01	-0,05	-0,06	0,00	0,09	0,18	0,04	0,03	0,01	0,02	0,05	UZ2
0,09	-0,20	0,18	0,09	0,08	-0,06	0,04	0,00	0,10	0,01	0,04	0,00	0,00	0,08	0,02	0,10	0,13	0,14	0,05	LD
0,29	-0,09	0,25	-0,80	-0,30	-0,11	-0,06	-0,09	0,12	0,16	0,09	-0,02	0,06	0,08	0,04	-0,03	0,37	0,01	0,04	LS
0,21	-0,11	0,14	-0,22	-0,18	0,41	-0,08	0,02	0,09	0,32	0,07	-0,01	0,06	0,09	0,01	-0,07	0,06	-0,15	0,04	UV
0,23	-0,13	0,21	-0,30	-0,17	-0,50	-0,04	-0,07	0,14	0,17	0,02	-0,04	0,06	0,06	-0,05	-0,12	0,09	-0,07	0,02	US
0,20	-0,12	0,15	-0,13	-0,04	0,00	0,03	0,33	0,07	0,15	-0,06	-0,02	0,07	0,06	-0,01	0,01	0,10	-0,02	-0,03	ZD
0,13	-0,03	0,13	-0,21	-0,08	-0,09	0,07	-0,51	0,02	0,16	-0,02	0,01	0,05	0,04	0,06	0,02	0,09	-0,03	-0,02	ZS
-0,20	-0,51	-0,06	0,17	0,13	0,05	0,08	0,06	-0,05	-0,01	-0,09	-0,11	-0,05	0,13	0,05	0,10	-0,03	0,21	-0,01	VC
0,19	0,04	0,13	-0,07	-0,02	-0,02	0,80	-0,02	-0,03	-0,08	-0,09	-0,03	0,03	0,11	0,04	0,03	-0,02	0,04	0,02	UZR
-	-0,14	0,41	-0,26	0,01	-0,03	-0,02	0,04	0,05	-0,02	0,02	0,01	0,21	0,46	-0,09	-0,07	0,05	-0,04	0,06	VVC
-0,14	-	0,11	0,00	0,01	0,04	0,00	-0,09	-0,09	0,06	0,01	0,02	-0,08	0,08	0,02	-0,03	-0,03	-0,06	0,01	VDV
0,41	0,11	-	-0,14	-0,14	-0,08	0,01	0,02	0,08	-0,01	0,09	0,02	0,09	0,14	-0,06	-0,18	-0,01	-0,01	-0,01	VDL
-0,26	0,00	-0,14	-	0,38	0,07	0,11	0,09	-0,05	-0,16	-0,08	0,03	-0,05	-0,02	-0,05	0,09	-0,30	0,08	0,00	LDS
0,01	0,01	-0,14	0,38	-	-0,01	0,08	0,05	-0,07	-0,05	-0,10	-0,02	-0,01	0,08	-0,03	0,08	-0,05	0,08	0,04	LVDS
-0,03	0,04	-0,08	0,07	-0,01	-	-0,04	0,10	-0,06	0,16	0,10	0,06	0,01	0,03	0,07	0,05	-0,01	-0,08	0,02	UVS
-0,02	0,00	0,01	0,11	0,08	-0,04	-	-0,06	-0,05	-0,10	-0,10	-0,04	-0,05	-0,01	0,03	0,03	-0,04	0,06	-0,03	UZ21
0,04	-0,09	0,02	0,09	0,05	0,10	-0,06	-	0,06	-0,03	-0,03	-0,02	0,02	0,01	-0,09	-0,02	0,02	0,01	-0,01	ZDS
0,05	-0,09	0,08	-0,05	-0,07	-0,06	-0,05	0,06	-	0,06	-0,04	0,01	0,09	-0,08	0,03	0,00	0,03	0,00	0,02	ZB
-0,02	0,06	-0,01	-0,16	-0,05	0,16	-0,10	-0,03	0,06	-	0,06	-0,01	0,01	0,02	-0,03	0,03	0,03	-0,09	0,04	UT
0,02	0,01	0,09	-0,08	-0,10	0,10	-0,10	-0,03	-0,04	0,06	-	0,33	0,09	-0,02	-0,05	-0,08	0,07	-0,02	-0,13	ZDO
0,01	0,02	0,02	0,03	-0,02	0,06	-0,04	-0,02	0,01	-0,01	0,33	-	0,01	-0,06	-0,04	-0,09	0,01	-0,10	-0,05	ZNO
0,21	-0,08	0,09	-0,05	-0,01	0,01	-0,05	0,02	0,09	0,01	0,09	0,01	-	0,08	-0,03	0,05	-0,07	-0,09	0,04	VT
0,46	0,08	0,14	-0,02	0,08	0,03	-0,01	0,01	-0,08	0,02	-0,02	-0,06	0,08	-	-0,07	0,08	-0,02	0,04	0,04	VB
-0,09	0,02	-0,06	-0,05	-0,03	0,07	0,03	-0,09	0,03	-0,03	-0,05	-0,04	-0,03	-0,07	-	0,37	0,01	0,10	0,03	OS
-0,07	-0,03	-0,18	0,09	0,08	0,05	0,03	-0,02	0,00	0,03	-0,08	-0,09	0,05	0,08	0,37	-	-0,02	0,11	0,04	OH
0,05	-0,03	-0,01	-0,30	-0,05	-0,01	-0,04	0,02	0,03	0,03	0,07	0,01	-0,07	-0,02	0,01	-0,02	-	0,06	0,03	LO
-0,04	-0,06	-0,01	0,08	0,08	-0,08	0,06	0,01	0,00	-0,09	-0,02	-0,10	-0,09	0,04	0,10	0,11	0,06	-	0,06	LB
0,06	0,01	-0,01	0,00	0,04	0,02	-0,03	-0,01	0,02	0,04	-0,13	-0,05	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,06	-	LI

Na základě korelací byl proveden následující výběr u znaků, které různým způsobem popisují jednu strukturu, tak, aby znaky v analýze byly co nejvíce nezávislé.

Znaky PL a PV korelují s celkovou výškou rostliny a byly tedy z dalších analýz vynechány. Ze znaků popisujících výšku a větvení rostliny VV, VN, VVC, VC jsou VV a VN výrazně korelované se znakem VC. VC a VVC spolu nekorelují. VN a VV byly vyřazeny.

Ze znaků popisujících boční větve VD, VL a VDL byl pro analýzu s oběma datovými soubory vyloučen znak VDL, pro ostatní analýzy byl znak VDL ponechán a vyloučen znak VL. Ze znaků popisujících vlastnosti lodyžního lisu LD, LS a LDS a listu LVD, LVS a LVDS, jsou znaky popisující šířku listu LS a LVS korelované s poměrem výšky a jsou proto vyloučeny. Ze znaků popisujících úbor UV, US, UVS a UT je opět nejvíce korelovaným znakem šířka úboru (US). Binární znak UT má stejnou výpovědní hodnotu jako UVS. Z této čtveřice byly tedy vyškrtnuty znaky UT a US.

Ze znaků charakterizujících ztlustnutí bočních větví pod úborem UZ1, UZ2, UZR s UZ21 byl ponechán pouze UZR, ostatní byly vyloučeny. Ve znaku UZR došlo odchylnám ve způsobu měření mezi datovými soubory, proto byl tento znak pro analýzy vyžadující oba datové soubory vypuštěn.

Ze znaků charakterizujících zákrovní listeny velikost a tvar přívěsků zákrovních listenů ZD, ZS a ZDS byl ponechán znak ZDS a také korelovanější, zato tradičnější znak, ZS. Z binárních znaků popisujících podobné charakteristiky byly vypuštěny OS a ZDO. Dále byl z analýz vyloučen binární znak ZB, který nebyl prakticky variabilní.

Při srovnání jednotlivých datových souborů nebyly až na výjimky zmíněné výše nalezeny rozdíly, stejné znaky korelují stejně v obou souborech a jsou shodně vyloučeny z ostatních analýz. Znaky ponechané vyžadují stejné transformace. Soubory tedy lze sloučit.

Znaky používané pro analýzy jsou VC, VVC, VU, VD, VDV, VT, VB, OH, LD, LDS, LO, LBK, LVD, LVDS, UV, UVS, ZS, ZDS, ZNO, LI, VL, UZR.

Data zpracována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a redundanční analýzy (RDA) v programovém balíku Canoco for Windows 4.5 (Ter Braak et Šmilauer 2002). Zjištění normality dat a výpočty korelačních koeficientů byly provedeny v programu STATISTICA 9.1 (StatSoft 2009).

3.2 Kultivační pokus

Ke zjištění vztahu prostředí a jednotlivých určovacích znaků byl sestaven a použit kultivační pokus. Ve dvou oddělených pokusech byl zjišťován 1) vliv zastínění 2) vliv sucha.

Z 5 populací *Centaurea jacea* subsp. *jacea* (viz příloha 3) bylo před vyrašením květních lodyh (koncem května) pro každý pokus vykopáno 10 trsů. Každý trs byl rozdělen na dvě poloviny, představující geneticky identické klony. Klony byly zasazeny do různých podmínek prostředí. V případě prvního pokusu (vliv zastínění) byl vždy jeden klon v rámci lokality ponechán v původních podmínkách a druhý byl vysazen do zástinu (okraj porostu stromů) v těsné blízkosti původní lokality. V případě druhého pokusu (vliv sucha) byl vždy jeden klon zasazen zpět na původní lokalitu a druhý přesazen na vybranou osluněnou suchou stráň u obce Úsilné na okraji Budějovické pánve (lokalizace viz příloha 3). Rostlinám byl ponechán rok na adaptaci k novým stanovištním podmínkám a následujícího roku byly rostliny sesbírány na vrcholu vegetační sezóny (srpen). Na rostlinách se změřily stejné znaky a použily stejné transformace jako v předchozí části (kap 3.1.3). Z analýzy vynechány rostliny s poškozeným terminálním úborem nebo jinak poškozené (např. opletené liánami). Data zpracována pomocí redundanční analýzy (RDA).

3.3 Molekulární analýza

Ke zjištění vzájemných genetických vztahů poddruhů použita analýza DNA. Analyzovány vzorky z obou poddruhů a přechodných typů z lokalit použitých k morfometrické analýze (seznam lokalit viz příloha 4). K izolaci DNA byly vypěstovány rostliny ze semen mateřských rostlin použitých k morfometrické analýze školitelem (Koutecký 2008). V případě potřeby se dosbíraly vzorky přímo na dané lokalitě. Zkoumáno bylo po 10 jedincích ze 14 změřených populací, pro srovnání byla zařazena lokalita jedné populace *C. jacea* ze Švédska a několik vzorků jiných druhů ze sekce *Centaurea* sect. *Jacea* (*C. elatior*, *C. carpatica*, *C. phrygia* a *C. stenolepis*).

3.3.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena z listů vysušených v silikagelu metodou CTAB podle následujícího protokolu:

Ke 0,7 mg rozdrceného materiálu přidáno 700 μ l roztoku CTAB (0,1M Tris; 0,02M Na₂-EDTA; 1,4M NaCl; 2% w/v CTAB) a 10 μ l 2-merkptoethanolu promícháno na vortexu a inkubováno 30 min při 60°C. Během prvních minut inkubace přidáno malé množství

polyvinylpyrolidonu (PVP). Po inkubaci přidáno 500 µl směsi chloroform: isoamylalkohol (24:1). Zkumavka 2-3x převrácena. Ponecháno 5 min při pokojové teplotě. Směs centrifugována 10 min při 13 800 rpm.

K přepipetovanému supernatantu přidáno 500 µl vychlazeného isopropanolu, zkumavka 1-2x převrácena a ponechána 30 min v -20°C . Centrifugováno 5 min při 13 800 rpm. Supernatan odstraněn. Přidáno 400 µl vychlazeného 96% ethanolu a inkubováno 15 min v termobloku při 37°C . Centrifugováno 5 min při 13 800 rpm. Supernatan odstraněn. Přidáno 200 µl vychlazeného 70% ethanolu. Ponecháno 5 min při pokojové teplotě. Centrifugováno 5 min při 13 800 rpm. Supernatan odstraněn. DNA vysušena a následně rozpuštěna ve 200 µl TE pufru.

3.3.2 Sekvence ITS

Pro studium genetické variability byla použita sekvence ITS. Tento jaderný úsek je obecně velmi variabilní a představuje dobrý marker pro studium druhové variability.

Pro PCR reakci byly použity následující primery: ITS 1p 5'-CCGTACCATTTAGAGGAAG-3' a ITS 4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'.

Složení reakční směsi pro PCR bylo: PCR voda 3,5 µl, 2x Plain PP Master Mix (Top-Bio) 12,5 µl, primer ITS 1p (2,5 pM) 4 µl, primer ITS 4 (2,5 pM) 4 µl, DNA (konc. 5-10 ng/µl) 1 µl.

PCR byla provedena podle následujícího předpisu: Denaturace při 95°C 5 min; 30 cyklů 1 min 94°C , 1 min 54°C , 1,5 min 72°C ; závěrečná elongace při 72°C 10 min.

Pro sekvenční reakci byl použit primer ITS 4. Celkové množství DNA pro sekvenční reakci představovalo 10 ng. Sekvence provedena na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) v Laboratoři genomiky Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích.

Studovaný úsek neposkytl dostatečně variabilní data, takže tato metoda není pro studovaný problém vhodná. Bylo nutné nalezení jiného dostatečně variabilního markeru.

3.3.3 ISSR

Metoda ISSR (Inter simple sequence repeat) je založena na PCR, kde jsou jako primery využívány mikrosatelitové sekvence. Mikrosatelity (SSR) jsou jednoduché krátké opakující se sekvence několika nukleotidů. Tyto repetitivní jednotky se náhodně vyskytují v celém

genomu u všech eukaryot a liší se počtem opakování. ISSR primery nesou sekvenční motiv komplementární k sekvenci mikrosatelitů. Během PCR dochází k amplifikaci úseků DNA mezi dvěma stejnými mikrosatelitovými repetitivními sekvencemi, které jsou umístěny v řetězci DNA v opačném směru. Výsledkem jsou různě dlouhé úseky DNA mezi mikrosatelity. Metoda poskytuje velmi variabilní data vhodná pro studium této problematiky. V minulosti byla již úspěšně použita např. k determinaci druhů a vzájemných kříženců rodu *Equisetum* (Brune *et al.* 2008) a dokonce k rozlišení variet *Geonoma macrostachys* (Roncal *et al.* 2007).

Metoda byla optimalizovaná pro primery fluorescenčně značené na 5' konci

OW 2 (PET) – GAGAGAGAGAGAGAGAC,

OW4 (6-FAM) – T GAGAGAGAGAGAGAGAYA,

840 (VIC) – GAGAGAGAGAGAGAGAYT.

Složení reakční směsi pro PCR bylo: PCR voda 2 µl, primer (koncentrace 2,5 pM) 2,4 µl, PCR Enhancer (Top-Bio) 0,2 µl, 2x Plain PP Master Mix (Top-Bio) 5 µl, DNA (konc. 5-10 ng/µl) 0,4 µl.

Pro jednotlivé primery byly provedeny samostatné PCR reakce. Průběh PCR reakce je uveden v tabulce 4.

Tab. 4: Průběh PCR reakcí

	OW2	OW 4; 840
Denaturace	94°C, 3 min	94°C, 3 min
5 cyklů s touchdown protokolem (snížením teploty annealingu o 1°C v každém cyklu)	94°C, 1 min	94°C, 1 min
	60°C, 1 min	64°C, 1 min
	72°C, 2 min	72°C, 2 min
32 cyklů	94°C, 1min	94°C, 1min
	55°C, 1min	59°C, 1min
	72°C, 2 min	72°C, 2 min
Závěrečná elongace	72°C, 10 min	72°C, 10 min

Produkty všech tří reakcí pro jeden vzorek byly následně smíchány v poměru 1 : 1 : 1 a délka ISSR fragmentů byla analyzována fragmentační analýzou v automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) v Laboratoři genomiky Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích.

Složení vzorku pro fragmentační analýzu: Hi-Di Formamid 10 μ l, velikostní standard GeneScan 1200LIZ - 0,5 μ l, směs PCR produktů 0,5 μ l.

Výsledky analyzovány v programu GeneMarker 2.7 (SoftGenetics, Inc.) Byla hodnocena přítomnost / nepřítomnost fragmentu určité délky, bez ohledu na intenzitu fluorescence.

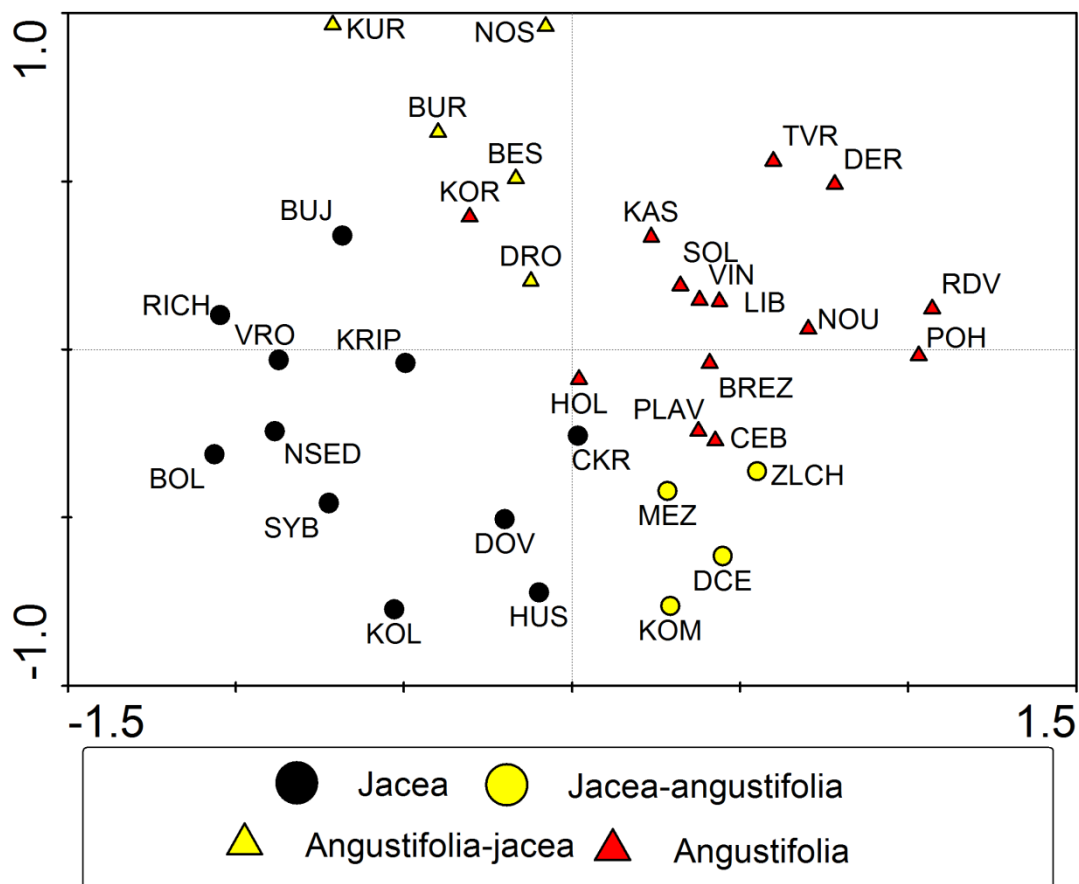
U 10 % vzorků byly provedeny dva nezávislé běhy (PCR + fragmentační analýza) a výsledky byly nezávisle vyhodnoceny. Fragmenty, které nebyly hodnoceny u obou opakování shodně, byly z dat (u všech vzorků) vyloučeny. Byl spočten podíl neshodně hodnocených fragmentů (*error rate*). Následně byly z dat vyloučeny také všechny fragmenty vyskytující se s celkovou frekvencí menší nebo rovnou *error rate*.

Binární data byla zpracována v programu GenAlEx 6.2 (Peakall & Smouse 2006). Genetické vztahy jednotlivých populací byly analyzovány na základě matice genetických vzdáleností pomocí analýzy hlavních koordinát (PCoA) programovém balíku Canoco for Windows 4.5 (Ter Braak et Šmilauer 2002). Vztah jednotlivých jedinců byl analyzován pomocí metody neighbour network v programu SplitsTree 4.1 (Huson & Bryant 2006).

4 Výsledky

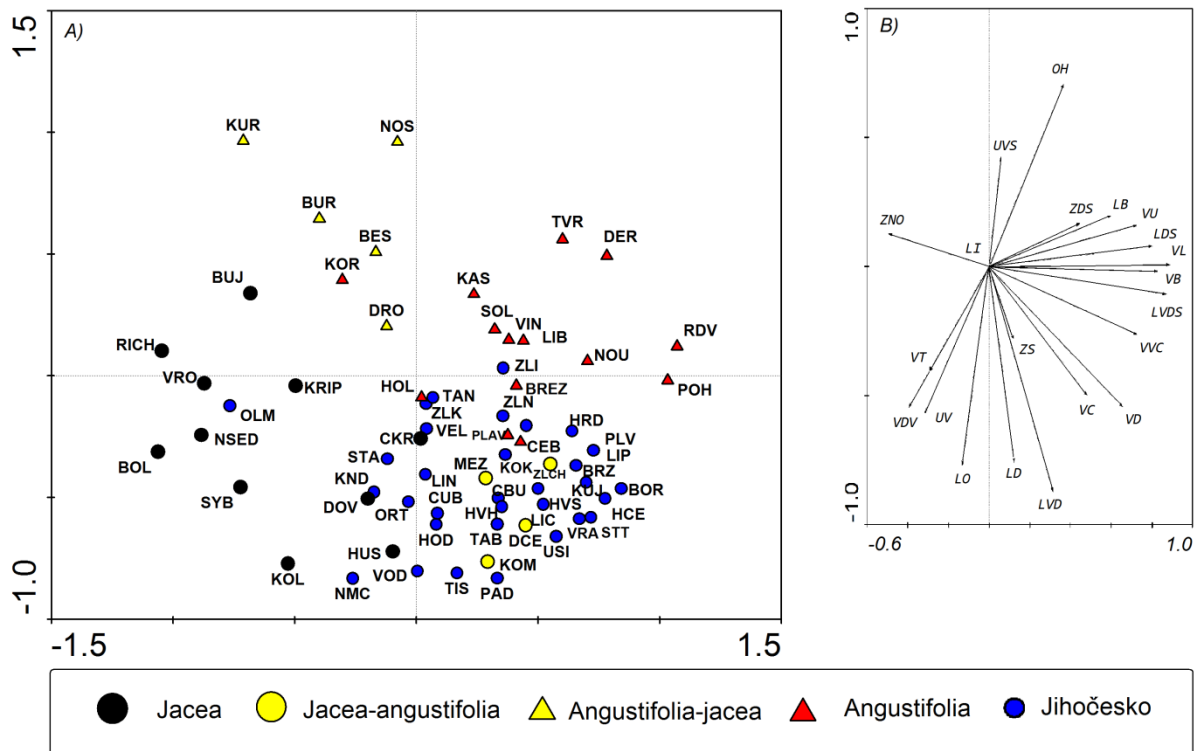
4.1 Morfologická plasticita

Morfologická variabilita byla zkoumána pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) kombinující oba datové soubory (různá stanoviště v jižních Čechách a „standardní“ stanoviště v celém Česku a na Slovensku). V první analýze byla data pocházející z jižních Čech použita jako doplňková (*supplementary*). Ordinační prostor byl tedy definován klasifikovanými populacemi od obou podruhů a jejich vzájemných přechodů (obr. 1). Pasivní promítnutí jihočeských populací umožňuje srovnat jejich podobnost k jednotlivým typům.



Obr. 1: Ordinační diagram PCA. Ordinačního prostor definovaný na základě variability druhu *Centaurea jacea* v širším areálu.

Lokální variabilita *C. jacea* subsp. *jacea* v jižních Čechách plynule vyplňuje přechod od subsp. *jacea* přes přechodné populace *jacea-angustifolia* po subsp. *angustifolia*, přičemž nejvíce se překrývá s netypickými populacemi blízkými *C. jacea* subsp. *jacea*, lišícími se od typických populací charakterem větvení (Obr. 2).

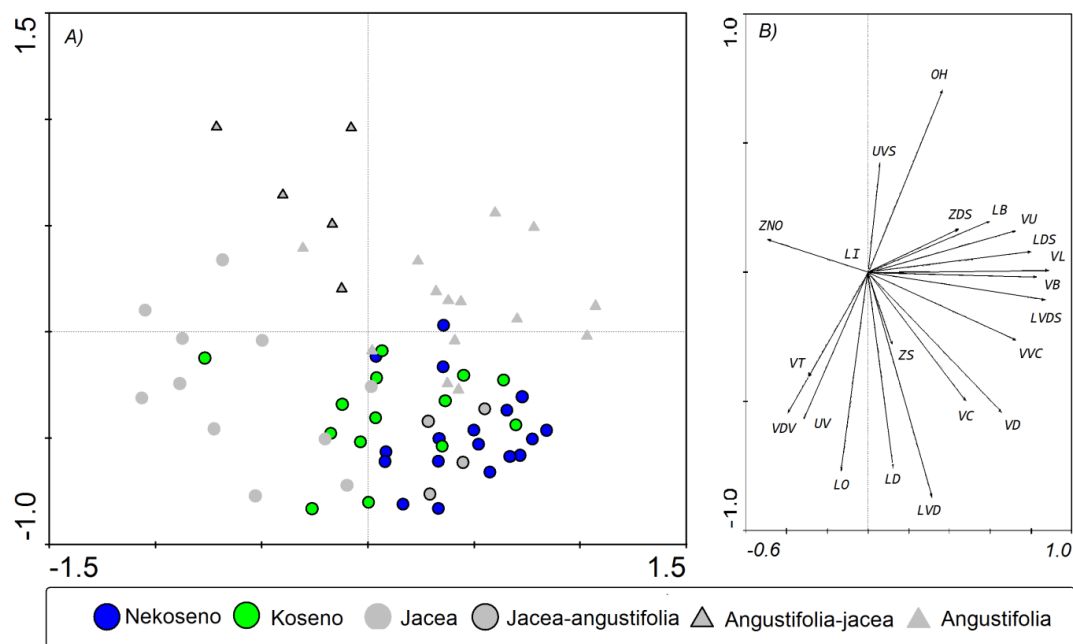


Obr. 2: Ordinační diagram PCA. A) Pasivní promítnutí jihočeských populací do ordinačního prostoru definovaného na základě variability druhu v širším areálu. B) Znaky definující ordinační prostor.

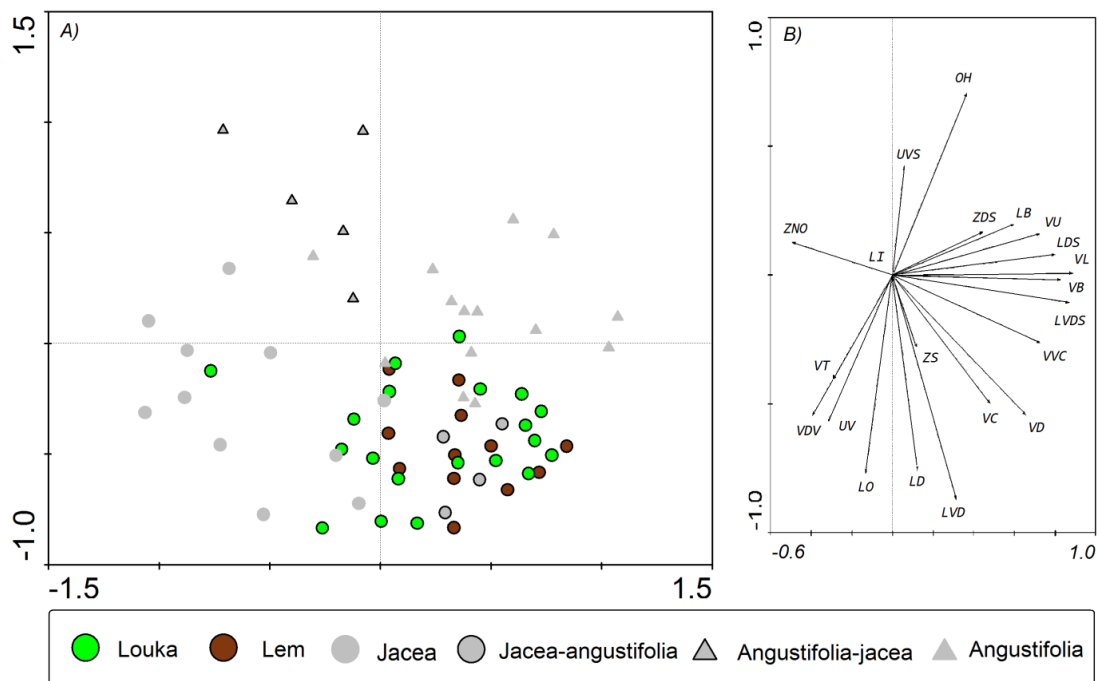
Pro vizualizaci vztahu morfologické variability a stanovištních podmínek byly jihočeské populace klasifikovány podle jednotlivých charakteristik prostředí a zkoumány tyto následující faktory:

- Management - kosené vs. nekosené plochy (Obr. 3)
- Typ stanoviště - luční otevřená společenstva vs. lemová křovinatá (Obr. 4)
- Gradient vlhkosti - sucho vs. střed vs. mokro (Obr. 5)

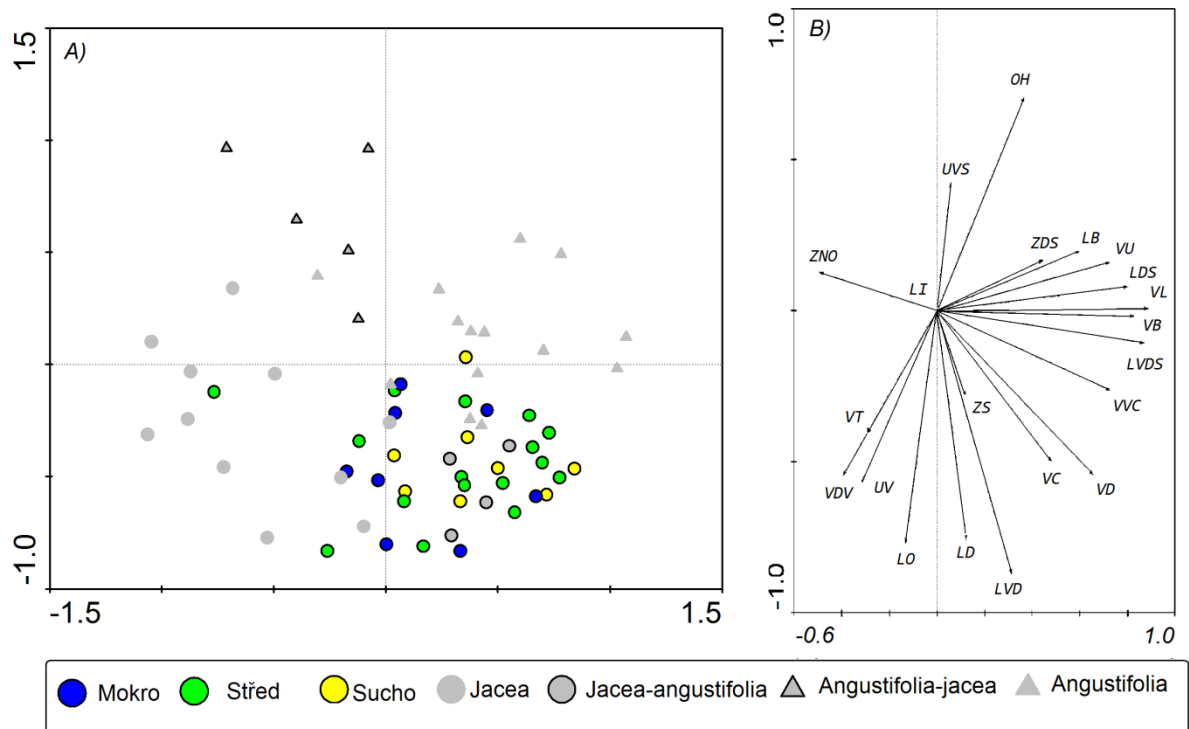
Jediným faktorem, který vykazuje určité rozdíly v rozložení studovaných populací v ordinačním prostoru je typ managementu.



Obr. 3: A) Klasifikace jihočeských populací na základě managementu v ordinačním prostoru definovaného na základě variability druhu v širším areálu. B) Znaky definující ordinační prostor.

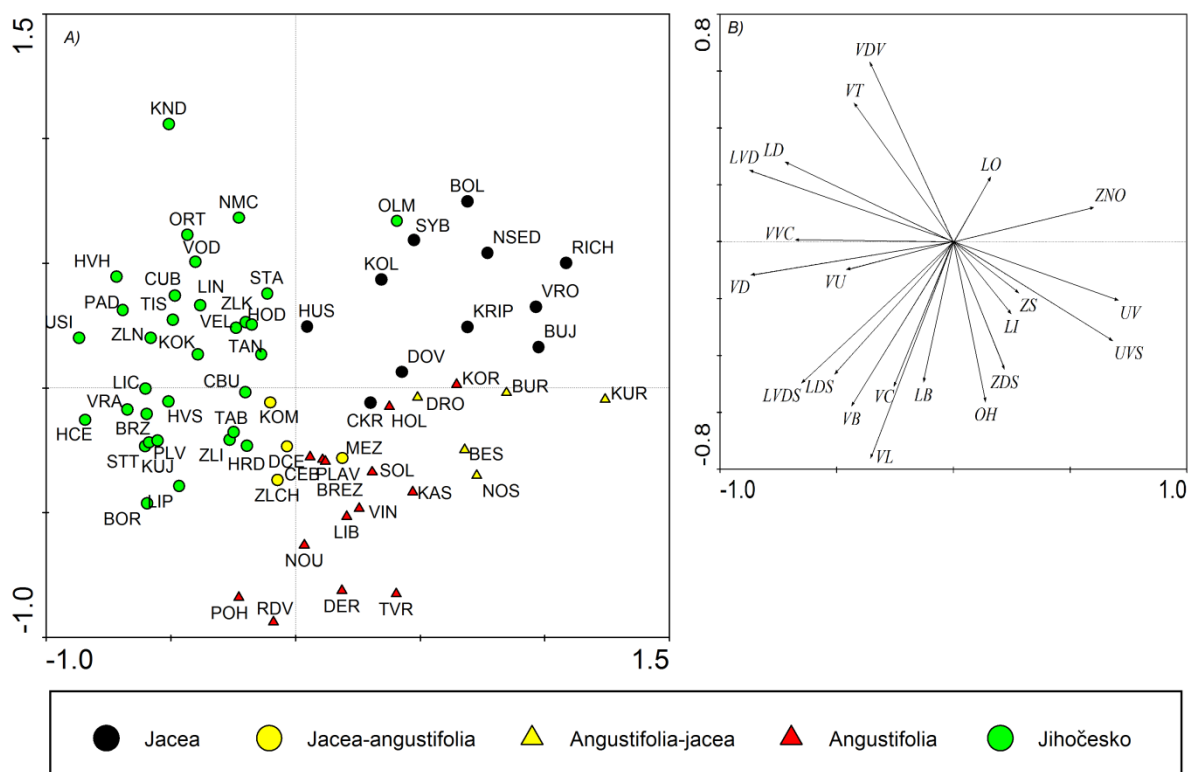


Obr. 4: A) Klasifikace jihočeských populací na základě typu stanoviště v ordinačním prostoru definovaného na základě variability druhu v širším areálu. B) Znaky definující ordinační prostor.



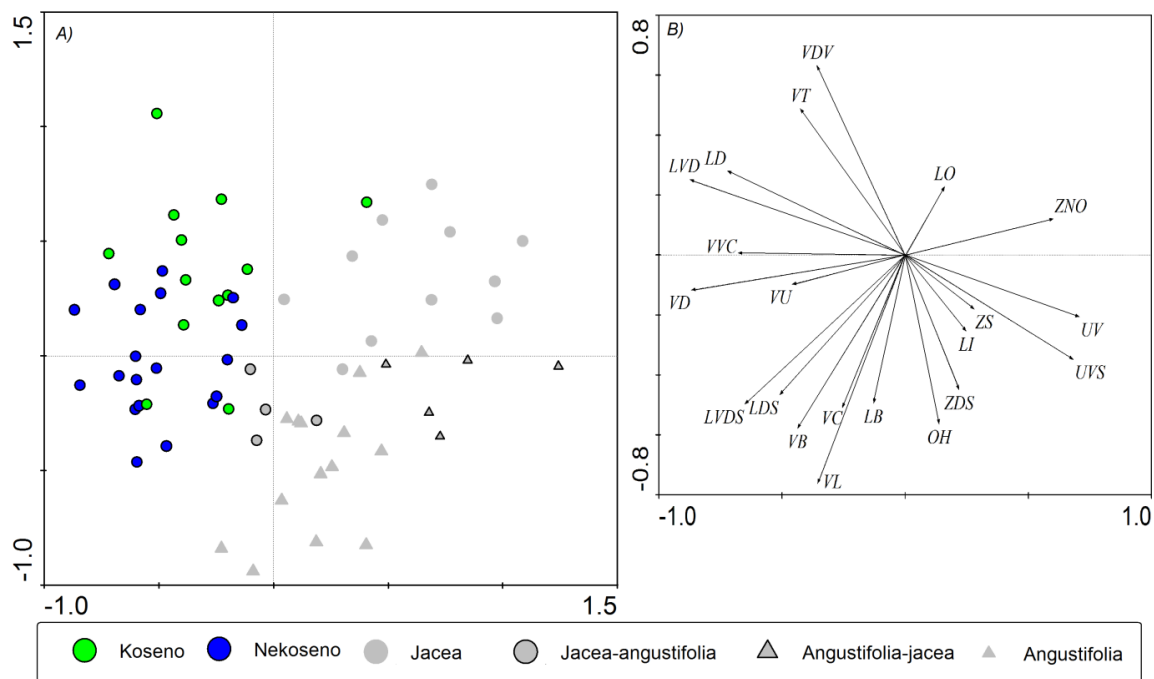
Obr. 5: A) Klasifikace jihočeských populací na základě managementu v ordinačním prostoru definovaného na základě variability druhu v širším areálu. B) Znaky definující ordinační prostor.

Směr variability zjištěný PCA analýzou na základě populačních vzorků (více taxonů) z Česka a Slovenska z víceméně jednoho „standardního“ typu stanoviště se ale může lišit od variability jednoho taxonu dané různými stanovištními podmínkami. Proto byla provedena druhá PCA tak, že všechny populace z obou datových souborů ovlivňují definici ordinačního prostoru. První ordinační osa pak odděluje jihočeské populace subsp. *jacea* od populací toho poddruhu pocházejících ze standardizovaných podmínek. Druhá osa odděluje jednotlivé poddruhy (Obr. 6). Je patrné, že jihočeské populace měly zejména delší listy a byly více větvené (delší větvená část lodyhy, větší délka větví a úhel odvětvení). Tento rozdíl mezi datovými soubory je výraznější než mezipoddruhový, přesto jihočeské populace sledují gradient subsp. *jacea* → subsp. *angustifolia*

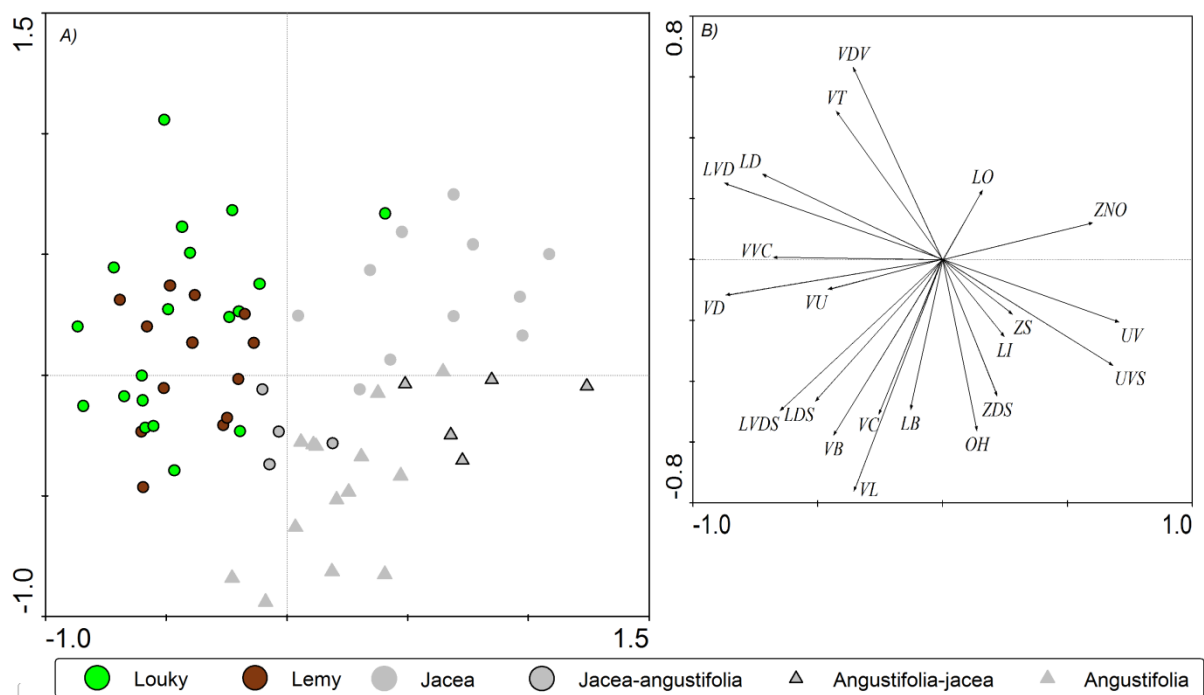


Obr. 6: A) Ordinační diagram PCA, ordinační prostor definován všemi populacemi. B) Znaky definující ordinační prostor.

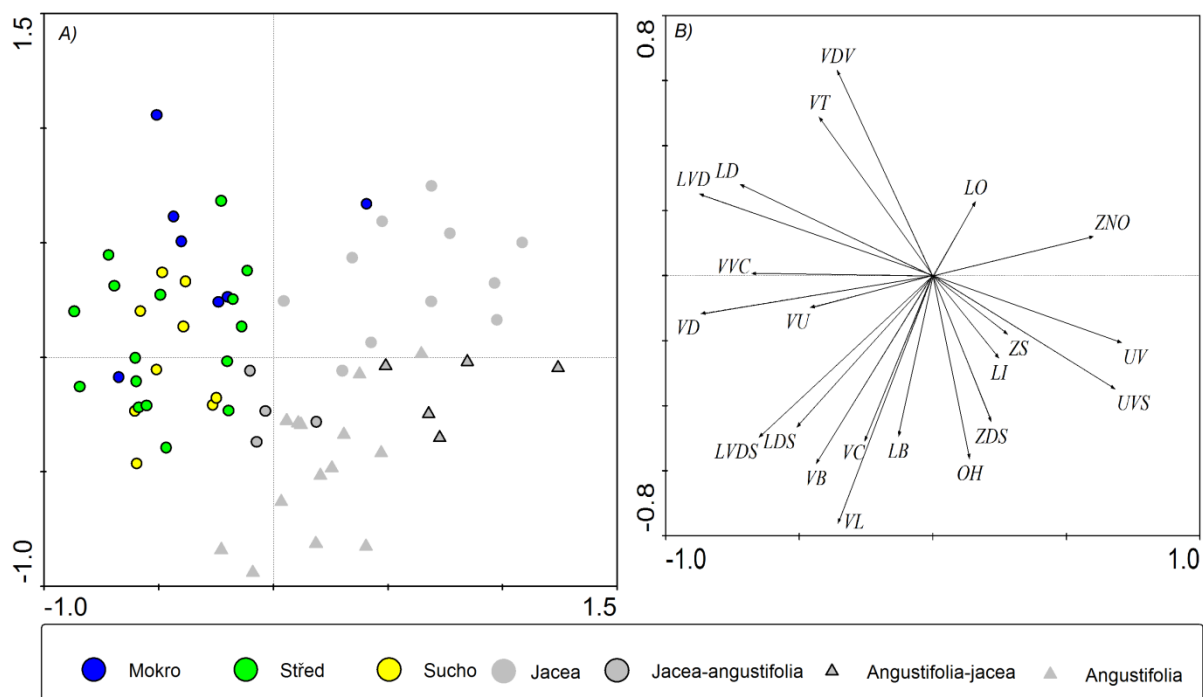
Opět byly vizualizované vztahy morfologické variability a stanovištních podmínek jihočeských populací klasifikovaných podle jednotlivých charakteristik prostředí: Managementu (Obr. 7), typu stanoviště (Obr. 8) a gradientu vlhkosti (Obr. 9). Typ managementu je znovu jediným faktorem, který vykazuje určité rozdíly v rozložení studovaných populací v ordinačním prostoru.



Obr. 7: A) Klasifikace jihočeských populací na základě managementu v ordinačním prostoru definovaném všemi populacemi. B) Znaky definující ordinační prostor.

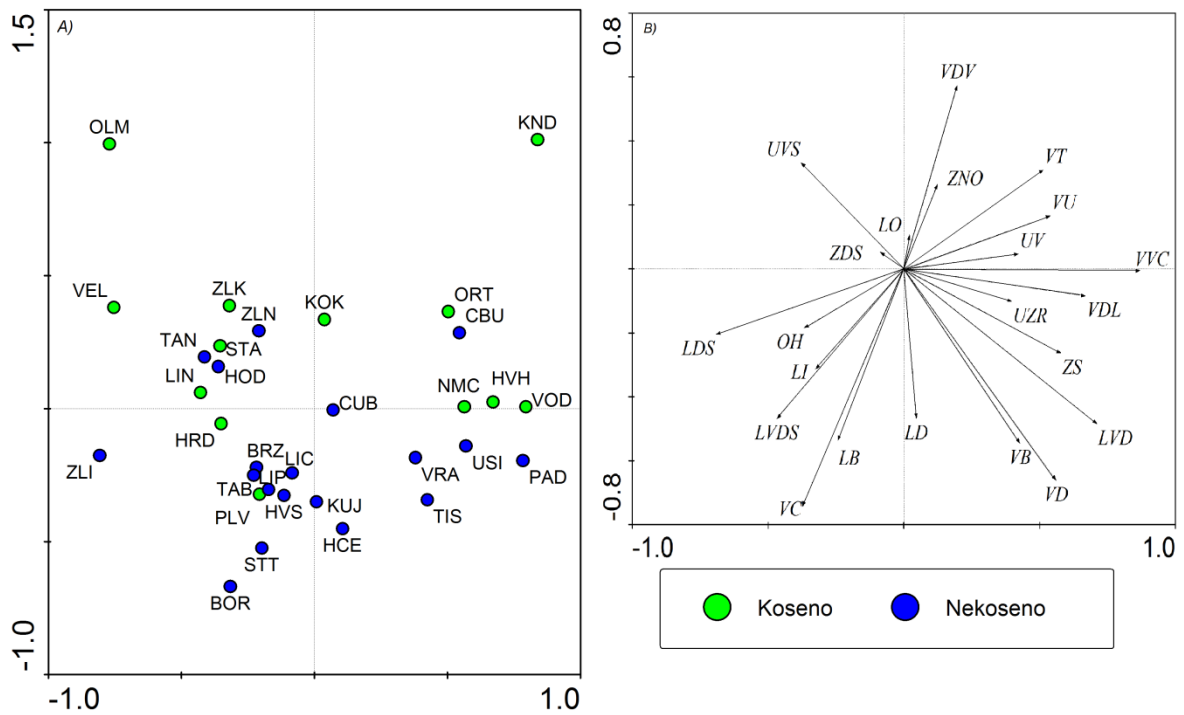


Obr. 8: A) Klasifikace jihočeských populací na základě typu stanoviště v ordinačním prostoru definovaném všemi populacemi. B) Znaky definující ordinační prostor.

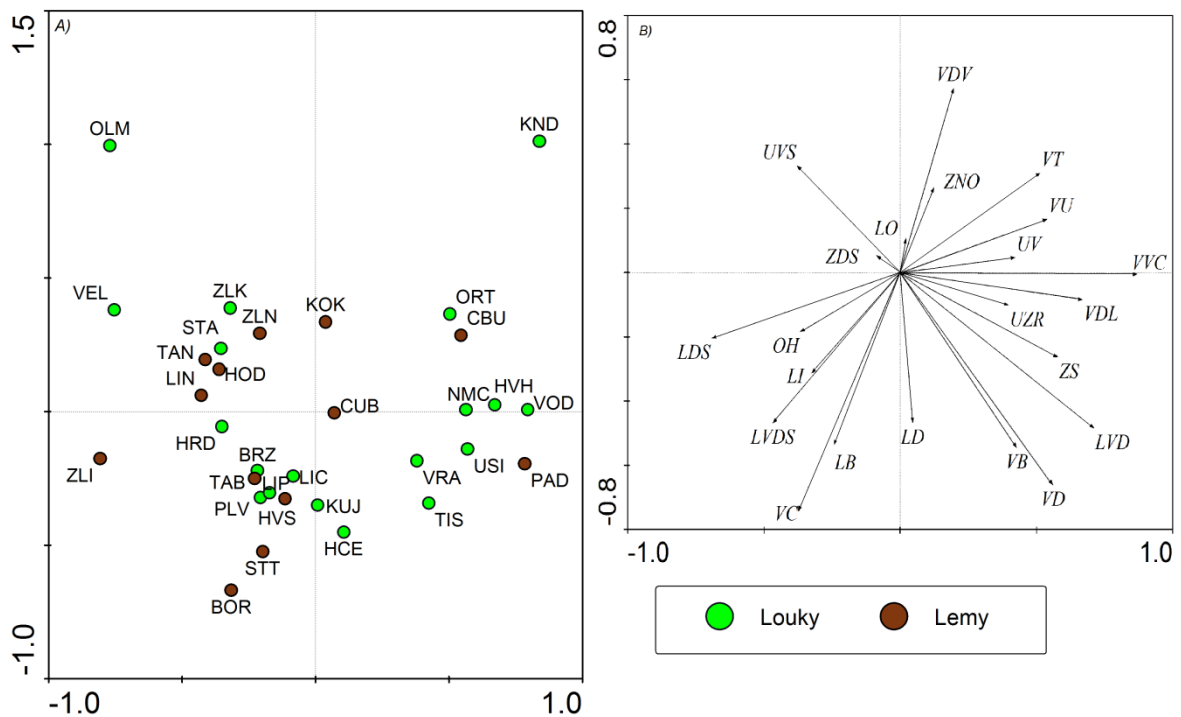


Obr. 9: A) Klasifikace jihočeských populací na základě vlhkostního gradientu v ordinačním prostoru definovaném všemi populacemi. B) Znaky definující ordinační prostor.

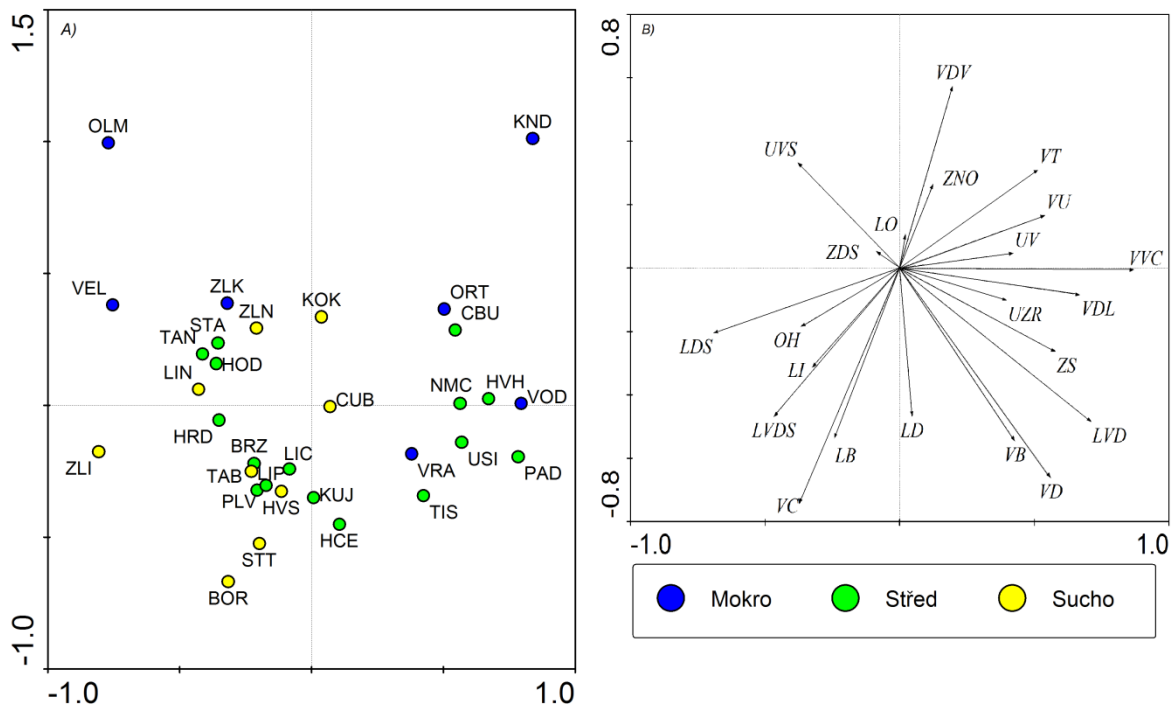
Jako poslední krok byla provedena PCA jihočeských populací samostatně. První osa byla pozitivně korelována s více větvenými rostlinami, výškou úboru, délkou internodií na bočních větvích a negativně korelována s poměrem délky listů k šířce. Populace byly opět klasifikovány podle jednotlivých charakteristik prostředí: management (Obr. 10), typ stanoviště (Obr. 11) a gradient vlhkosti (Obr. 12). Typ managementu netvoří tak výrazné shluky jako v předchozích případech přesto i zde je patrný jistý gradient.



Obr. 10: A) Klasifikace jihočeských populací na základě managementu v jimi definovaném ordinačním prostoru. B) Znamky definující ordinační prostor.



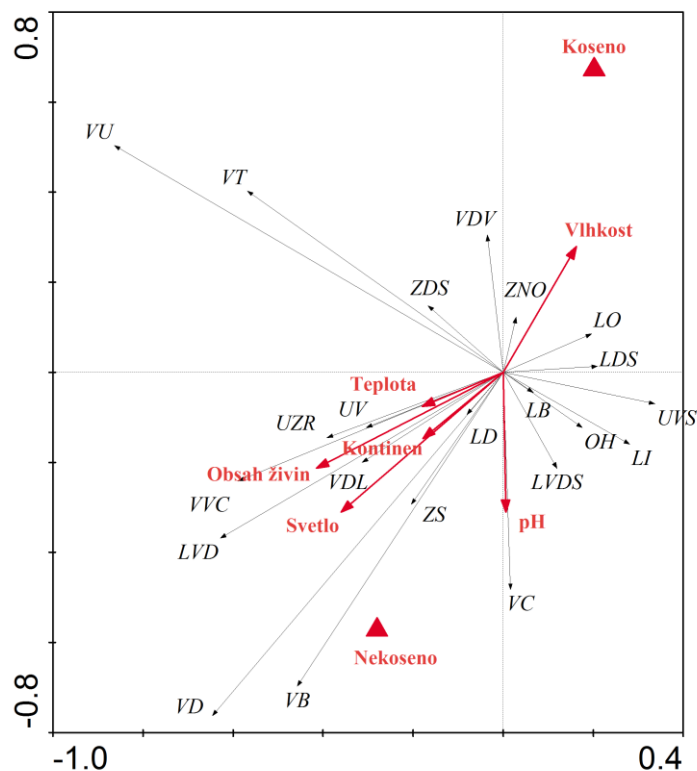
Obr. 11: A) Klasifikace jihočeských populací na základě typu stanoviště v jimi definovaném ordinačním prostoru. B) Znamky definující ordinační prostor.



Obr. 12: A) Klasifikace jihočeských populací na základě vlhkostního gradientu v jimi definovaném ordinačním prostoru. B) Znaký definující ordinační prostor.

4.2 Vliv prostředí

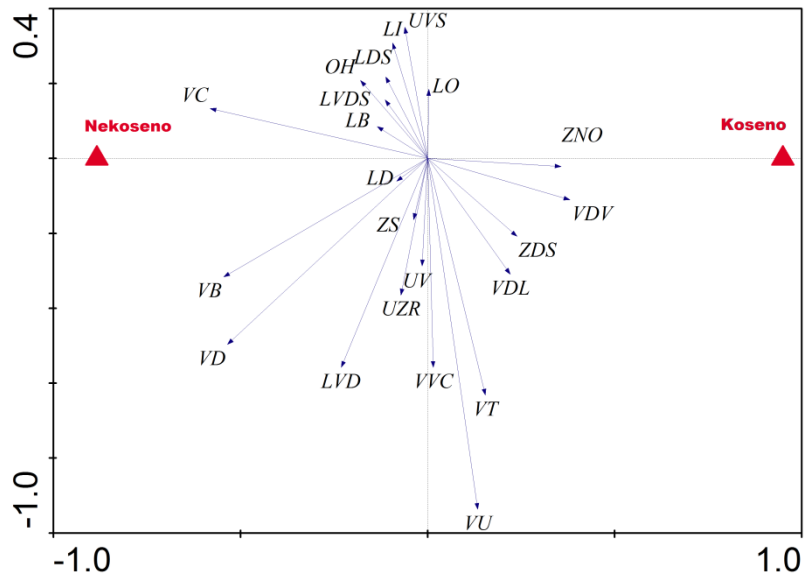
Závislost morfologie rostlin na charakteristikách prostředí byla studována pomocí redundanční analýzy (RDA), kdy jako druhová data sloužily průměry znaků jednotlivých populací a jako vysvětlující proměnné charakteristiky prostředí průměrné Ellenbergovy hodnoty pro každou populaci odvozené z druhového složení vegetace ve fytoecologických snímcích a dále byl zahrnut vliv kosení. Korelace jednotlivých znaků s vlivy prostředí byla vizualizovaná použitím PCA ordinačního diagramu Obr 13. Z ordinačního diagramu vyplývá, že kosení má významný vliv. Ellenbergovy hodnoty s výjimkou pH jsou spolu do značné míry korelovány.



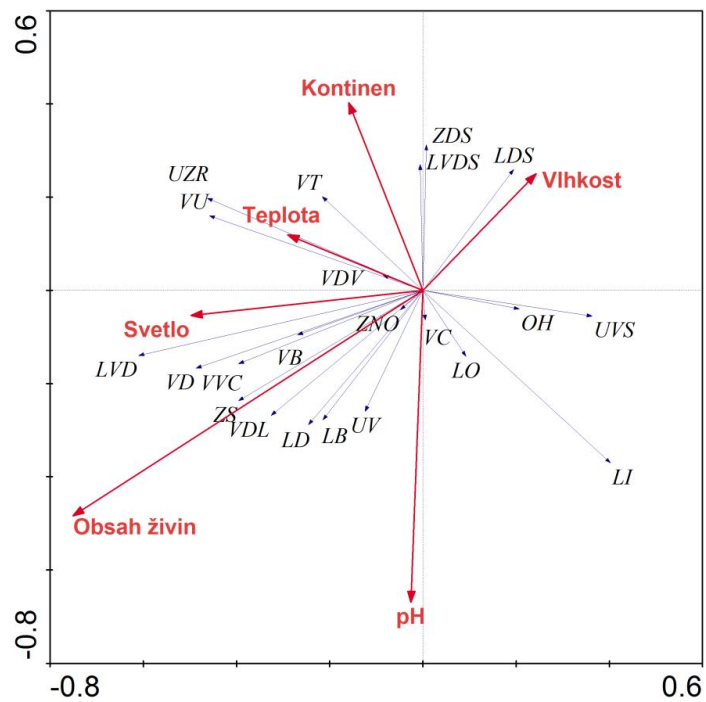
Obr 13: Ordinační diagram analýzy hlavních komponent (PCA). Vztah jednotlivých faktorů prostředí a určovacích znaků.

Z důvodu odlišného charakteru znaku kosení (typ managementu) od Ellenbergových hodnot (abiotické faktory) byl vliv kosení otestován samostatně pomocí RDA, na 5% hladině průkaznosti byl nalezen průkazný vliv ($F = 4,935$ $p = 0,012$). Kosení je pozitivně korelováno s dělenými přírůsky zákrovních listenů, delšími větvemi v poměru s délkou větvení a negativně korelováno s celkovou výškou rostliny, větvením bočních větví a délkou větví (Obr. 14). Překvapivě není s kosením korelována délka listu vůči internodiu.

Následně byla provedena druhá RDA, kde byl vliv kosení použit jako kovariát a za použití forward selection byl testován vliv abiotických faktorů prostředí. Na 5% hladině významnosti byl nalezen průkazný vliv obsahu živin v půdě, vliv ostatních faktorů je neprůkazný. Hodnoty testových statistik jsou uvedeny v tabulce 5. Obsah živin je pozitivně korelován s širším zákrovem, délkou internodií větví, podílem větvené části rostliny a délkou listů. Negativně je korelován s širokými listy (Obr. 15).



Obr. 14: Ordinační diagram RDA. Korelace kosení s determinačními znaky.



Obr. 15: Ordinační diagram RDA s použitím vlivu kosení jako kovariáty. Korelace Ellenbergových hodnot a jednotlivých značek.

Tabulka 5: Výsledky Monte Carlo - permutačního testu při 500 permutacích pro jednotlivé faktory prostředí.

	Marginal Effects		Conditional Effects	
	F	p	F	p
Obsah živin	5,35	0,014	5,35	0,014
Světlo	2,45	0,094	1,65	0,204
Teplota	0,7	0,532	0,49	0,622
Vlhkost	0,65	0,514	0,08	0,964
pH	0,53	0,582	2,19	0,108
Kontinentalita	0,43	0,664	0,39	0,678

4.3 Kultivační pokus

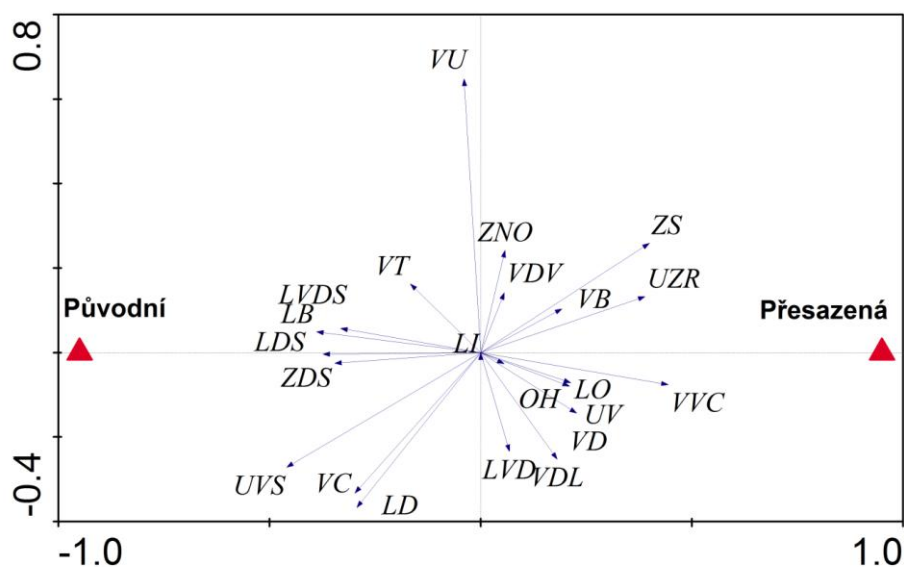
4.3.1 Reakce na zastínění

Zvolená úroveň zastínění, byla pro luční druh jakým je *Centaurea jacea* příliš vysoká. Došlo k úhynu 50% jedinců. Zbylé rostliny přeživaly pouze jako vegetativní listové růžice. Pokus nelze vyhodnotit.

4.3.2 Reakce na sucho

Během konání pokusu podlely dvě původní lokality sukcesním změnám (invaze ostružiníku) a došlo k zahubení rostlin. K vyhodnocení pokusu byl použit relativně malý vzorek 26 párů rostlin. K zjištění vlivu přesazení na suchou lokalitu byla použita RDA, kdy označení dvojice klonů bylo použito jako kovariáta, a v následném Monte Carlo - permutačním testu byly permutace omezeny kovariátami.

Sušší podmínky stanoviště jsou pozitivně korelovány s podílem větvené části lodyhy, ztlustnutím větví, větvením bočních větví a okraji listu a negativně korelovány s poměrem délky k šířce listů a zákrovů. (Obr. 16). Nicméně na 5% hladině významnosti nejsou tyto vztahy statisticky průkazné (počet permutací = 499, $F = 1,431$ $p = 0,246$).



Obr. 16: Ordinační diagram RDA, korelace jednotlivých znaků s lokalitou.

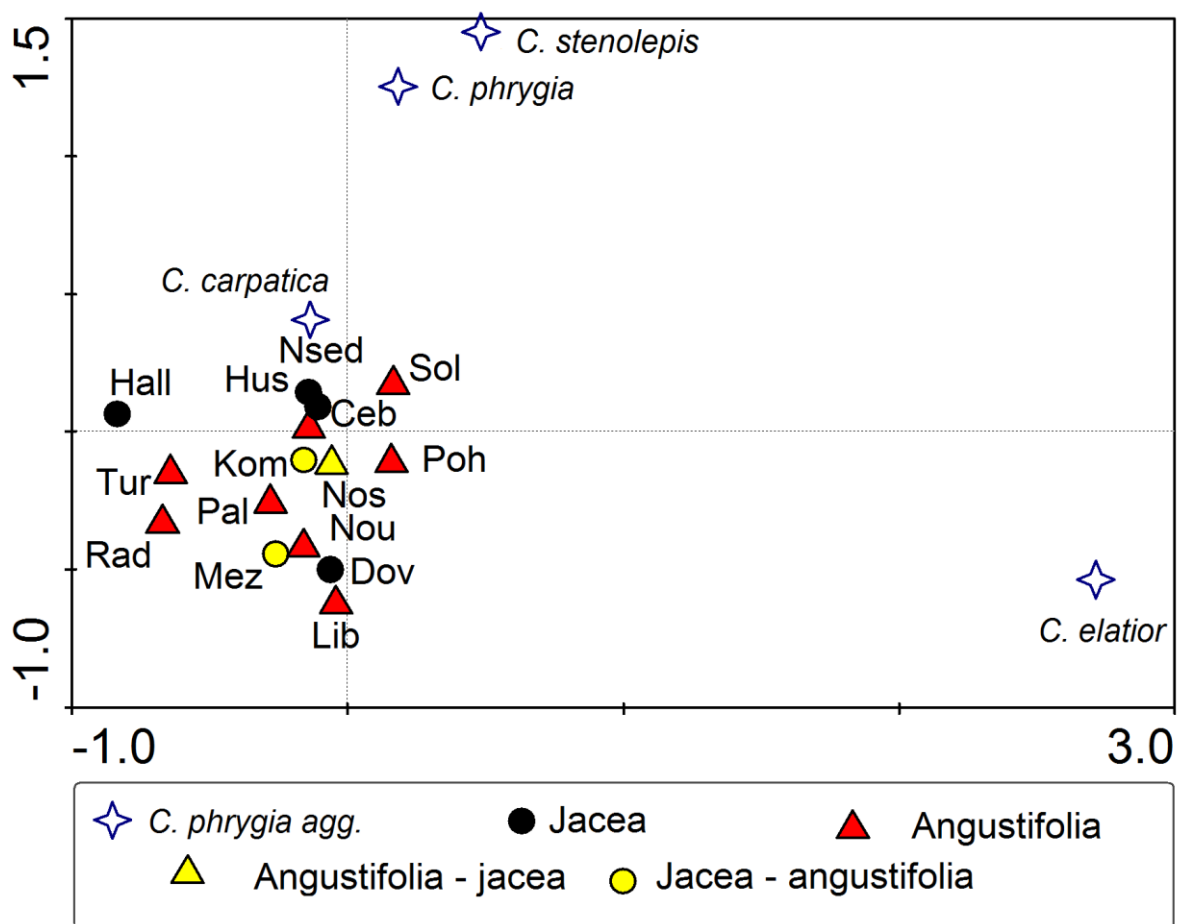
4.3 Sekvence

Ve studovaném úseku ITS nebyla nalezena žádná variabilita. Sekvence studovaného úseku je uvedena v příloze 5.

4.4 Fragmentační analýza

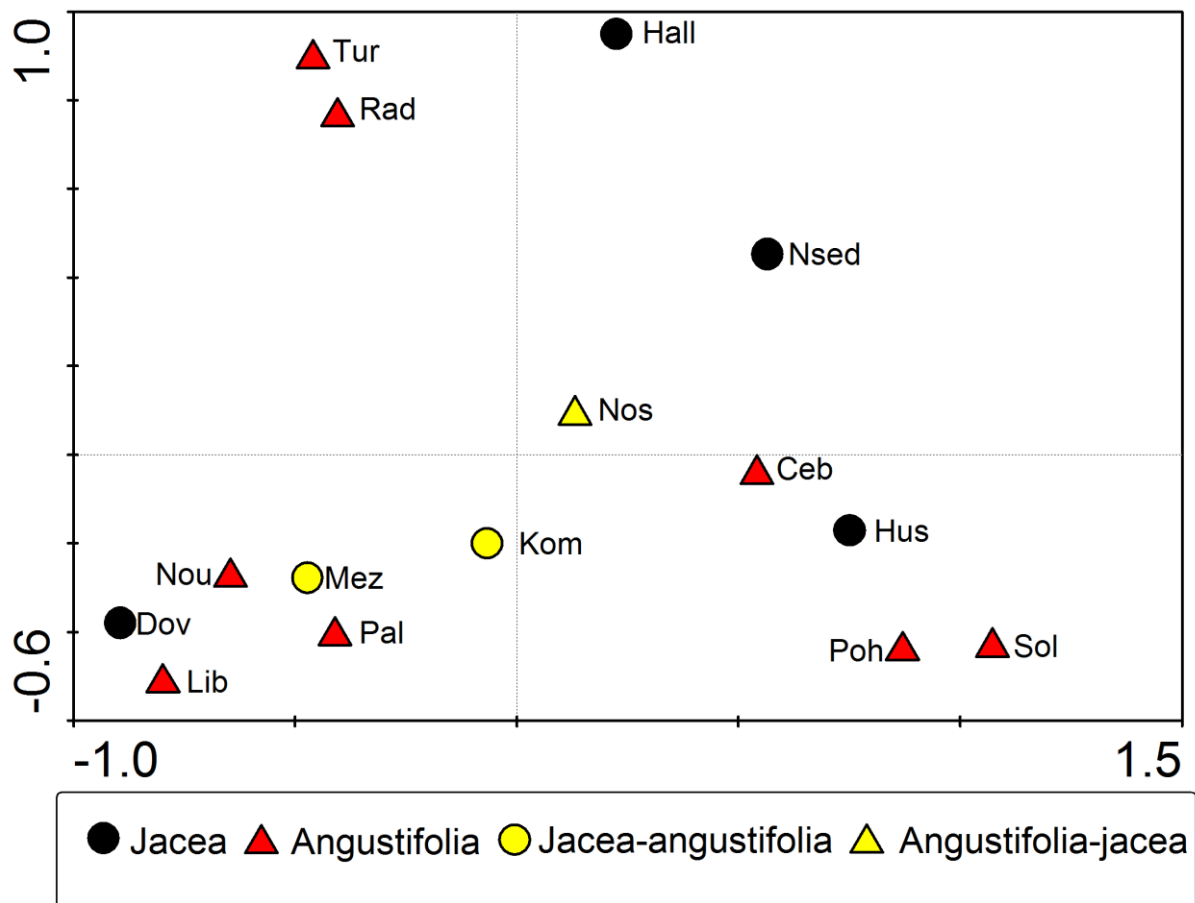
Celkem nalezeno pro primer OW2 – 17 polymorfních lokusů (error rate 12%). Pro primer OW4 20 polymorfních lokusů (error rate 13,3%) a pro primer 840 – 18 polymorfních lokusů (error rate 8,6%).

Pro srovnání mezidruhové a vnitrodruhové variability byla vypočtena matice genetických vzdáleností jednotlivých populací druhu *Centaurea jacea*. Pro srovnání byla zahrnuta jedna geograficky vzdálená populace *C. jacea* ze Skandinávie, morfologicky odpovídající *C. jacea* subsp. *jacea*, a několik vzorků různých druhů z agregátu *C. phrygia* agg. (*C. carpatica*, *C. elatior*, *C. phrygia* a *C. stenolepis*). Byla použita vzdálenost pro binární data v programu GenAlEx 6.3 (Peakall & Smouse 2006). Na základě matice genetických vzdáleností byla spočtena analýza hlavních koordinát (PCoA). Druhy *Centaurea phrygia* agg. jsou geneticky odlišné a v ordinačním diagramu se výrazně oddělují, populace druhu *C. jacea* vytváří kompaktní shluk, a to včetně skandinávské populace (Obr 17).



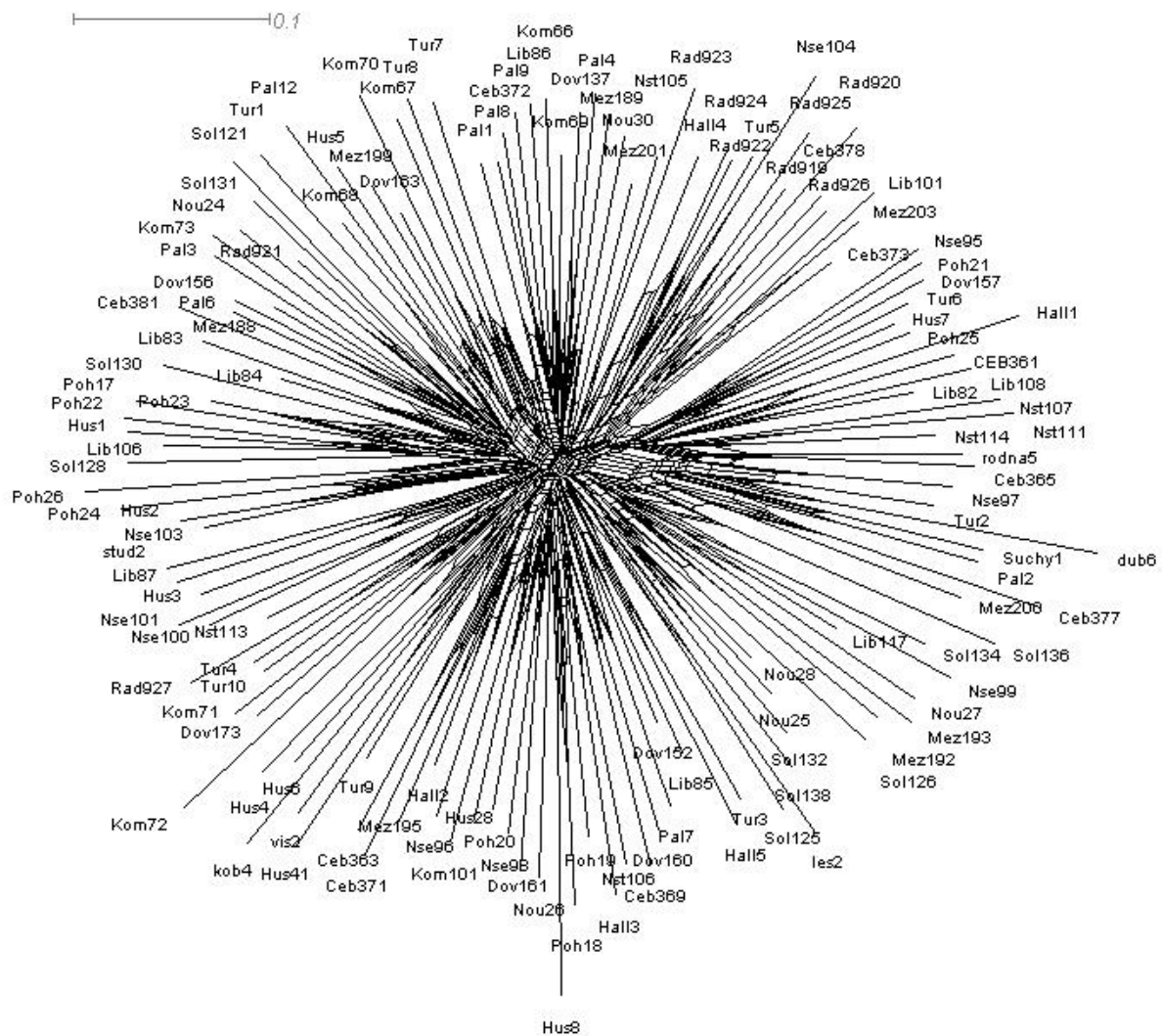
Obr 17: Výsledky PCoA matice genetických vzdáleností populací druhu *Centaurea jacea* a druhů z agregátu *C. phrygia*.

Vzhledem ke značné odlišnosti druhů ze skupiny *C. phrygia* agg., která by mohla překrývat variabilitu uvnitř *C. jacea*, byla pro srovnání genetických vzdáleností jednotlivých populací patřících k oběma poddruhům *C. jacea* a jejich vzájemným přechodům provedena PCoA s použitím pouze matice genetických vzdáleností populací druhu *C. jacea*. Podruhy se v ordinačním prostoru od sebe nijak neoddělují, není zde patrný ani genetický ani geografický gradient (Obr. 18).



Obr 18: PCoA matice genetické vzdálenosti druhu *Centaurea jacea*

Dále byla provedena analýza metodou neighbour network v programu SplitsTree 4.1 (Huson & Bryant 2006). Ani v této analýze nebyly nalezeny žádné definovatelné skupiny v rámci *C. jacea*. Všechny vzorky tvoří jen veliký cluster a jednotliví jedinci z různých populací jsou ve výsledné síti promíšení (Obr. 19). Výsledek ukazuje, že v rámci *C. jacea* nelze nalézt žádnou interpretovatelnou strukturu genetické variability.



Obr 19: Výsledek neighbour network analýzy.

4.5 Shrnutí

Z provedených analýz vyplývá, že v geograficky úzké oblasti jižních Čech se vyskytují populace, které morfologicky odpovídají oběma poddruhům a dále populace, které lze označit jako přechodný typ. Absence kosených ploch ve vzorcích definující původní ordinační prostor pravděpodobně skryla důležitou část vnitrodruhové variability, kterou se podařilo objevit. Kosení má průkazný vliv na některé důležité determinační znaky jako je výška rostliny a tvar zákrovních listenů. Z abiotických faktorů prostředí byl nalezen průkazný vliv obsahu živin v půdě. S touto proměnou koreluje hlavně celkový tvar listů, který je důležitým determinačním znakem mezi poddruhy.

Při molekulární studii se podařilo nalézt a otestovat metodu vhodnou pro studium vnitrodruhové variability. Mezi studovanými populacemi nebyla nalezena žádná variabilita. Poddruhy se od sebe geneticky neliší.

Z výše uvedených důvodů je rozlišování morfotypů na úrovni poddruhů neoprávněné. Pokud lze tyto morfotypy klasifikovat tak pouze jako variety, tedy taxony, které vznikají opakovaně jako odpověď na podobné podmínky prostředí. Pro potvrzení stávajících výsledků a definitivní rozřešení situace je potřeba provést další studie.

5 Diskuze

5.1 Morfologická plasticita

Zjištěný rozsah morfologické plasticity determinačních znaků v geograficky úzké oblasti překrývá variabilitu mezi oběma poddruhy na „standardním“ stanovišti. Některé z determinačních znaků byly korelovány s faktory prostředí. Celkově lze posoudit vliv faktorů následovně:

Míra větvení lodyhy byl znak, který poskytoval největší variabilitu. Při vlastním sběru rostlin bylo nápadné, že velké trsy chrp vytváří několik květních lodyh, které z větší vzdálenosti často habituálně působí jako bohatě větvená subsp. *angustifolia*. Jednotlivé květní lodyhy v trsu jsou však větveny pouze řídce v horní části. Opakem toho jsou rostliny rostoucí v dlažbě, které nemohou vytvářet kompaktní trsy, ale zároveň nejsou limitovány okolní vegetací. Takové rostliny vytvářely obvykle jedinou mohutnou květní lodyhu, od báze bohatě větvenou. Toto pozorování naznačuje, že větvení lodyhy je adaptací na aktuální stav okolní vegetace, a konkurenci o prostor, kdy si jednotlivé lodyhy mohou konkurovat navzájem. V krátkostébelných společenstvech teplých oblastí lze proto očekávat více větvené rostliny, zatímco ve vysokostébelných loukách středních poloh rostliny méně větvené. Tendence k většímu poměru větvené části vykazovali i rostliny v přesazovacím pokusu, i když byl vliv neprůkazný.

Celková výška rostliny a větvení bočních větví jsou znaky negativně korelované s kosením. Při klasifikaci kosené vs. nekosené byl gradient oddělující jednotlivé managementy korelován s větvením bočních větví a celkovou výškou rostliny. Pokosení rostlině odčerpá jisté množství energie, ta obvykle reinvestuje pouze do vzrůstu a již se nedělí. Na kosených plochách tedy může mít ta samá rostlina výrazně jiný habitus než na nekosených. Konkrétní účinky kosení by bylo vhodné ověřit přesazovacím pokusem.

Znakem, který v ordinačním prostoru nejvíce odděluje přechodné typy, je délka bočních větví. Z terénního pozorování lze usoudit, že boční větve dosahují přibližně stejné výšky jako terminální úbor. Pokud dochází k větvení ve vrcholové části rostliny, není možné, aby délka větve dosáhla stejné hodnoty, jako když k větvení dochází od báze lodyhy. Lze také očekávat, že vyšší rostliny budou mít, při stejném poměru větvené a nevětvené části, delší větve než rostliny nižší. Dále lze předpokládat, že delší větve se skládají z více internodií a jsou tedy více listnaté

Délka listu je znak variabilní, k determinaci poddruhů je nutno sledovat celkový tvar listu, který u subsp. *angustifolia* bude čárkovitě kopinatý, zatímco u subsp. *jacea* podlouhle kopinatý. Poměr délky listu k šířce je tedy znak, který odděluje jednotlivé poddruhy. Nicméně je tento poměr negativně korelován s obsahem živin v půdě. V teplejších oblastech, kde se vyskytují úrodnější půdy, jsou listy užší, v chladnějších oblastech na méně úživných půdách mají rostliny listy širší, což odpovídá geografické distribuci poddruhů.

Odění je znak, který hraje roli v rozlišení poddruhu, nicméně v rámci kultivačního pokusu vykazovaly rostliny v sušších podmínkách tendenci k tvorbě chlupů. To by napovídalo předpokladu, že tvorba chlupů je podmíněna prostředím jako ochrana před přílišným zářením a ztrátě vody.

Velikost a tvar úboru byly znaky, které dobře definovali jednotlivé poddruhy. Při srovnání všech populací však tato rozlišovací schopnost nefunguje. Lze předpokládat, že na gradientu podmínek dochází k plynulému přechodu tj. postupnému zvětšování úboru. Velikost úboru může být nepřímo spojena s větvením lodyhy. Pokud rostlina vytvoří velké množství květních lodyh, dojde k několikanásobnému navýšení celkového počtu úborů rostliny. Z energetického i reprodukčního hlediska je pro rostlinu menším poškozením ztráta menšího úboru, proto dělené rostliny neinvestují tolik do jednotlivých úborů, kterých má mnoho. Řídce větvené či nevětvené rostliny musí tuto nevýhodu kompenzovat navýšením počtu květů v úboru. Výsledkem jsou větší úbory s velkým množstvím nahloučených květů v terminální části, čímž může být i změněna morfologie celého úboru na válcovitý. Obecně tedy lze usoudit, že bohatě větvené rostliny budou mít menší úbory než rostliny nevětvené.

Tvar zákrovních listenů je druhým znakem, který umožňuje rozeznat oba taxony i při použití všech populací. Šířka zákrovu je pozitivně korelována s obsahem živin. V přesazovacím pokusu také vykazovala změnu směrem do suché oblasti, platí o ní tedy to co o šířce listu. Rozdělení kopíruje zeměpisný gradient a rozdílné stanovištní podmínky.

5.2 Kultivační experiment

Korelace znaků zjištěné se suchou lokalitou přesně odpovídají daným předpokladům. Neprůkaznost experimentu byla s největší pravděpodobností způsobena nízkým počtem dochovaných rostlin. Dvě vegetační sezóny by měly být dostatečným časovým úsekem, pro adaptaci k novému prostředí, ale není vyloučeno, že k úplné adaptaci, resp. ke stabilizaci po přesazení, a související změně morfologie dochází až po delším časovém úseku.

Ačkoliv výsledky kultivačního experimentu zaostaly za očekáváním, provedení přineslo několik důležitých poznatků pro příští opakování. Rostliny snáší přesazení velmi dobře, je však nutné je zasadit do podmínek, ve kterých jsou schopné tvorby květních lodyh.

Pokus má smysl opakovat za následujících podmínek:

- 1) Experiment je nutné provést na obou poddruzích.
- 2) Zvýšit počet použitých populací, pro případ zničení jedné či více lokalit.
- 3) Studijní lokalita by měla být dlouhodobě stabilním prostředím, kde nedochází k sukcesním či jiným změnám.
- 4) Lze sledovat i postupnou adaptaci rostliny na podmínky. Měření stejné rostliny po dobu 2 až 3 let.

Ze zkoumání lokální morfologické plasticity dále vyplynul výrazný vliv kosení. Bylo by tedy vhodné provést třetí typ experimentu sledující vliv faktoru kosená vs. nekosená lokalita. Zde se dále nabízí dvě možná provedení, a to přesazení z kosené do nekosené a naopak.

5.3 Molekulární analýza

Ačkoliv byla metoda ITS na chrpách na mezidruhové úrovni úspěšně vyzkoušena (Garcia-Jacas 2006), pro studium vnitrodruhové variability neposkytovala dostatečnou variabilitu. Otestovaná metoda ISSR naopak splnila veškerá očekávání. Celkový počet polymorfních lokusů byl srovnatelný s podobnými pracemi používající metodu ISSR (Belaïd 2005, Roncal 2007). Molekulární analýza naznačuje, že mezi studovanými poddruhy není žádná diferenciace což je v souladu s morfologickou částí práce. Bylo by vhodné potvrdit tento závěr další metodou. Nabízí se využití metody AFLP, která byla v rámci *C. jacea* okrajově použita a studované populace z různých částí Evropy se poměrně výrazně lišily (Bassin et al. 2004).

5.4 Shrnutí

Výsledky morfometrické a molekulární analýzy hovoří ve prospěch hypotézy, že v rámci vnitrodruhové variability *Centaurea jacea* se jedná pouze o jeden taxon, kdy popsané poddruhy jsou jen extrémní morfologické plasticity na gradientu stanovištních podmínek. Nicméně výsledky zatím nejsou dostatečně robustní. Pokud se stávající poznatky potvrdí v navazujících analýzách, bude nutné provést změny v klasifikaci podruhů a to buď snížení taxonů na úroveň variet, v případě výskytu znaků fixovaných na určitý typ stanoviště, nebo k úplnému zrušení taxonomické hodnoty stávajících podruhů, v případě, kdy bude nalezená

kontinuální variabilita a nebude existovat vztah mezi typem stanoviště a morfologickými vlastnostmi.

6 Závěr

Studium morfologické plasticity poddruhu *Centaurea jacea* subsp. *jacea* přineslo důkaz, že rostliny přizpůsobují svoji morfologii stanovištním podmínkám. Při srovnání celkové variability druhu tvořily studované lokality plynulý přechod od *C. j.* subsp. *jacea* přes přechodné typy až po *C. j.* subsp. *angustifolia*.

Molekulární studie prokázala, že se studované poddruhy vzájemně geneticky neliší.

Výše uvedené důvody hovoří ve prospěch hypotézy, že studované podruhy jsou pouze extrémy morfologické plasticity na gradientu stanovištních podmínek.

Pro definitivní potvrzení této skutečnosti, je třeba provedení rozsáhlejších kultivačních experimentů, a dokumentace lokální variability subsp. *angustifolia*.

7 Literatura

Hardy O. J., De Loose M., Vekemans X., Meerts P. (2001): Allozyme segregation and inter-cytotype reproductive barriers in the polyploid complex *Centaurea jacea*. *Heredity* 87: 136–145

Hardy O. J., Vanderhoeven S., De Loose M., Meerts P. (2000): Ecological, morphological and allozymic differentiation between diploid and tetraploid knapweeds (*Centaurea jacea*) from a contact zone in the Belgian Ardennes. *New Phytol.* 146: 291–290.

Hayek A. (1918): Kritische Studien über den Formkreis der *Centaurea jacea* L. s. l. *Verh. Zool.-Bot. Ges. Wien* 68: 159–214.

Hellwig F. H. (1996) Untersuchungen zur Phylogenie der Cardueae-Centaureinae (Compositae) unter Verwendung molekularer und morphologisch-anatomischer Merkmale. *Habilitationsschrift Univ. Göttingen*. Göttingen.

Hellwig F. H. (2004): Centaureinae in the Mediterranean history of ecogeographical radiation. *Pl. Syst. Evol.* 246: 137–162.

Hruby J. (1931): Der Formenkreis von *Centaurea jacea* L. ssp. *angustifolia* (Schrank) Gugler in Mähren. *Österr. Bot. Z.* 80:168–170.

Huson D. H., Bryant D. (2006), Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Mol. Biol. Evol.*, 23(2): 254-267.

Jäger E. J., Werner K. (2005): Rothmaler Exkursionsflora von Deutschland. 4. Gefäßpflanzen: Kritischer Band, ed. 10. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 980 p.

Koch W. J. D. (1843): Taschenbuch der Deutschen und Schweizeren Flora. Gebhardt et Reisland, Leipzig, 604 p.

Koch W. J. D. (1844): Synopsis Florae Germanicae et Helveticae, 2 ed., Vol. 2. Gebhardt et Reisland, Lipsia [Leipzig], 604 p.

Koutecký P. (2008): Taxonomická studie středoevropských zástupců *Centaurea* sect. *Jacea*, doktorská disertační práce, PřF JU, 253 p.

Koutecký P. (2009): Taxonomic and Nomenclatural Revision of *Centaurea subjacea* (Asteraceae-Cardueae) and Similar Taxa - *Phyton* Vol. 49/1: 63-76

Kubát K., Hrouda L., Chrtek J jun., Kaplan Z., Kirscher J., Štěpánek J. [eds.] (2002): Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha, 928 p.

Lange D. (1996): *Centaurea* L. 1753, In: Sebald O., Seybold S., Philippi G., Wörz A.: Die Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs. Band 6: 272-296 Eugen Ulmer Verlag, Hannover: .

Meusel H., Jäger E. J. (1992): Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. Band 3. Gustav Fischer Verlag.

Oberdorfer E. (1994): Pflanzensoziologische Exkursionsflora. 7. Auflage. Eugen Ulmer, Stuttgart, 1050 p.

Ochsmann J. (1998): *Centaurea* L., In: Wisskirchen R., Haeupler H., Albers F. [eds.] (1998): Standardliste Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands: mit Chromosomenatlas von Focke Albers. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 765 p.

Peakall R., Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.

Pitcairn M. J., O'Connor R. A., Gendron J. M. (1998). Yellow starthistle: survey of statewide distribution. In: Woods D. M. (ed.) *Biological Control Program Annual Summary, 1997*: 64-65. California Department of Food and Agriculture, Division of Plant Industry, Sacramento.

Poldini L. (1977): *Centaurea forojuliensis*, della sect. *Jacea* D.C. s.str., nuova entita dal Friuli. *Giorn. Bot. Ital.* 111: 63–70.

Roche C. T., Roche B. F. (1991): Meadow Knapweed invasion in the Pacific Northwest, United States of America, and British Columbia, Canada. *Northwest Science* 65: 53–61.

Shubert R., Vent W. (eds.) 1994. Rothmaler, Exkursionsflora von Deutschland. 4. Kritischer Band. 8.

Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena et Stuttgart, 811 p.

STATSOFT (2009): STATISTICA (data analysis software system), version 9.1. StatSoft Inc.,
<http://www.statsoft.com/>

Susanna A., Garcia-Jacas N., Soltis D. E., Soltis P. S. (1995) Phylogenetic relationships in tribe Cardueae (Asteraceae) based on ITS sequences. *Amer. J. Bot.* 82: 1056-1068.

Štěpánek J. (2002): *Centaurea* L. chrpa, In: Kubát K., Hrouda L., Chrtek J jun., Kaplan Z., Kirscher J., Štěpánek J. [eds.]: Klíč ke květeně České republiky: 673-676. Academia, Praha

Štěpánek J., Koutecký P. (2004): *Centaurea* L. chrpina, chrpa, In: Slavík B., Štěpánková J. [eds.]: Květena České republiky. 7: 426-448. Academia, Praha:

Ter Braak C. J. F., Šmilauer P. (2002): CANOCO reference manual and CanoDraw or Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, NY.

Tichý L. (2002): JUICE, software for vegetation classification. *Journal of Vegetation Science* 13: 451-453.

Wagenitz G. (1975): *Centaurea*, In: Davis P. H. [ed.]: Flora of Turkey. 5: 465-585. University Press, Edinburgh.

Wagenitz G. (1987): *Hegi Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Vol. 6/4: 580-1483. Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg.

Wagenitz G., Hellwig F. H. (1996) Evolution of characters and phylogeny of the Centaureinae. In: Hind D. J. N., Beentje H. G. (eds.) *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference*: 491-510, Kew, 1994. Royal Botanical Gardens, Kew.

Wagner J. (1939): Bemerkungen über Centaureen. *Acta Univ. Szeged., Sect. Sci. Nat., Pars. Bot.* 5: 73–110.

8 Přílohy

Příloha 1: Populace měřené v rámci jižních Čech

Zkratka	Lokalita	Charakteristika	Gps souřadnice
CUB	Červený újezd - 100 m od konce obce směrem na Lhotice, lem silnice na pravé straně	suchý, křovinatý lem, kosený	+ 49° 2' 52" + 14° 33' 8"
VEL	Velechvín – 50 m nad vodní nádrží směrem k lesu	Silně podmáčená louka, kosená	+ 49° 3' 4" + 14° 35' 21"
KOK	Kolný – 500 m východně od obce, na obvodu lesního výchozu	Suchý, slunný lem lesa, kamenitý, kosený	+ 49° 3' 35" + 14° 34' 31"
LIC	Libnič – 500 m severně od obce, u mostu na cyklostezce 1107	Vlhčí louka, nekosená	+ 49° 1' 28" + 14° 32' 34"
LIN	Červený újezd 2 – trnková stráň 600 m východně od obce	Slunný křovinatý lem, nekosený	+ 49° 2' 30" + 14° 33' 52"
BOR	Borek – okraj lesa mezi obcemi Borek a Nemanice	Lesní lem, kamenitý, nekosený	+ 49° 1' 16" + 14° 29' 29"
STA	Benešov nad Černou - louka na severním okraji obce při polní cestě do Dluhoště	Mezotrofní louka, kosená	+ 48° 43' 49" + 14° 37' 13"
STT	Dynín - násep 200 m jižně od vlakového nádraží	Výsluný písečný násep, nekosený	+ 49° 8' 24" + 14° 37' 17"
TIS	Brloh – louka při pravé straně cesty směrem na Klukov	Středně vlhká část zastíněné louky, nekosená	+ 48° 55' 25" + 14° 12' 43"
TAN	Lužnice - úhor 100 m severo-severozápadně od Slepíčího vršku	Výsluný úhor, nekosený	+ 49° 4' 18" + 14° 45' 42"
BRZ	Březí - nekosená plocha u poslední chaty směrem k zřícenině Mašek	Zastíněná louka, nekosená	+ 48° 54' 32" + 14° 25' 12"
KUJ	Kamenný Újezd – travnatá plocha u benzinky	Vlhčí opuštěná travnatá plocha	+ 48° 53' 53" + 14° 26' 29"
PLV	Plav - 250 m za obcí u silnice směrem na Heřmaň	Lem obhospodařované louky, kosený	+ 48° 54' 24" + 14° 29' 40"
ORT	Ortvínovice - louka u rybníka	Silně podmáčená louka, kosená	+ 48° 58' 51" + 14° 35' 50"
ZLK	Zliv – louka u rybníka Malý Knapr	Vlhká louka, kosená	+ 49° 4' 40" + 14° 20' 47"
ZLN	Zliv – opuštěná travnatá plocha na okraji lesa u Mydlovarského rybníka	Lesní lem, písčité, nekosený	+ 49° 4' 23" + 14° 21' 10"
ZLI	Zliv – 1 km od nádraží směr Plzeň	Úhor lemující železniční trať, nekosený	+ 49° 4' 17" + 14° 21' 13"
CBU	České Budějovice – Nábřeží na křižovatce ulice Kubatova a Jiráskovo Nábřeží	Rostliny rostoucí z kamenitého zpevnění říčního břehu	+ 48° 58' 53" + 14° 27' 50"
HRD	Zlatá koruna – příkop 200 m od železniční stanice směr České Budějovice	Vlhký, slunný příkop, kosený	+ 48° 44' 40" + 14° 34' 43"
USI	Úsilné – lesní okraj 200 m severně od konce obce	Stinný lem, nekosený	+ 49° 1' 4" + 14° 30' 46"

VRA	Vrábče – louka 200 m severně od železniční stanice	Podmáčená louka, nekosená	+ 48° 55' 5"+ 14° 21' 30"
HCE	Hradce – louka na jižním okraji obce	Louka v zástinu, nekosená	+ 48° 55' 51"+ 14° 21' 42"
LIP	Lipí – 600 m jižně od obce, rozhraní mezi polem a loukou	Vlhký příkop, nekosený	+ 48° 56' 25"+ 14° 21' 27"
PAD	Hráz rybníka olšina	Populace na hrázi rybníka	+ 48° 46' 43"+ 14° 5' 52"
HVS	Hluboká nad Vltavou – Kamenité zpevnění levého břehu Vltavy v obci	Kamenitá, nekosená	+ 49° 2' 55"+ 14° 26' 48"
HVH	Hluboká nad Vltavou – louka na pravém břehu Vltavy směrem k obci Opatovice	Louka, kosená	+ 49° 2' 43"+ 14° 26' 49"
HOD	Hodňov – lesní palouk u nádraží Hodňov	Lesní lem, nekosený	+ 48° 46' 44"+ 14° 6' 13"
OLM	Olšina – mokrá louka, na severním okraji rybníka Olšina	Podmáčená louka, nepravidelně kosená	+ 48° 46' 59"+ 14° 7' 15"
TAB	Dobřejovice – stavební parcela v obci	Úhor, nekosený	+ 49° 4' 0"+ 14° 28' 57"
KND	Kněžské dvory – 500 m severně od vrátnice Bosch	Podmáčená louka, kosená	+ 49° 0' 29"+ 14° 28' 15"
VOD	Bavorovice – Levý břeh Vltavy na jižním okraji obce	Vlhký porost na náplavce, kosený	+ 49° 1' 15"+ 14° 26' 51"
NMC	Nemanice - louka u Voselského rybníka	Mezická louka, kosená	+ 49° 0' 34"+ 14° 29' 56"

Příloha 2 Lokality doplněné k práci školitele (Koutecký 2008)

Zkratka	Země; fyt. okres/oblast – obec: lokalita; nadm. výška; souřadnice (WGS84)
Nou	Česko; 7c. Slánská tabule - Nové Ouholice, nekosená suchá louka asi 0,3 km SSV od železniční zastávky; 180 m n. m.; +50°18'16"+14°19'06"
Nos	Česko; 6. Džbán - Nové Strašecí, louka v oboře Libeň, asi 2,2 km SV od náměstí; 430 m n. m.; +50°10'07"+13°55'10"
Kor	Česko; 78. Bílé Karpaty lesní – Korytná, nekosená suchá stráň nad silnicí do obce, nad odbočkou od hlavní silnice Strání-Veselí n. Moravou, asi 3,3 km JJV od kostela v obci; 540 m n. m.; +48°54'46"+17°40'37"
Rdv	Slovensko; 6. Podunajská nížina – Radava, nekosený travnatý pruh na okraji vinic asi 1 km V od kostela v obci; 145 m n. m.; +48°05'38"+18°18'55"

Příloha 3: Lokality použité pro přesazovací pokus

Lokalita	Umístění	GPS souřadnice	Poznámka
Český Krumlov	Vyšenské kopce, trávníky a křoviny na vápencovém vrchu severně od nádraží	+ 48° 49' 33"+ 14° 18' 59"	Podlehla sukcesi
České Budějovice	Travnatá plocha na jižním okraji bývalého vojenského cvičiště na severozápadním okraji města	+ 48° 59' 22"+ 14° 26' 27"	
Vyhlídky	Okraj lesa 400 m západně od obce Vyhlídky	+ 48° 59' 5"+ 14° 35' 6"	
Břeží	Neobhospodařovaný lem obhospodařované louky u zříceniny Maškovec	+ 48° 54' 7"+ 14° 25' 12"	Podlehla sukcesi
Klukov	Okraj cesty u osady Klukov	+ 48° 55' 22"+ 14° 33' 31"	
Úsilné	Prudký sráz s jihozápadní orientací u silnice 1 km západně od obce Úsilné	+ 49° 0' 37"+ 14° 31' 44"	Společná lokalita pro výzkum vlivu sucha

Příloha 4: Seznam lokalit použitých k molekulárním analýzám

Zkratka	Země; fyt. okres/oblast – obec: lokalita; nadm. výška; souřadnice (WGS84)
<i>C.j. subsp. jacea</i>	
Dov	Česko; 89. Novohradské hory – Dobrá Voda: louky asi 0,5 km SZ od kostela v obci; 650m n. m.; +49,3460; +015,0107
Hall	Střední Švédsko, pobřeží Baltu ca 65 km SV od Uppsaly, Herräng: okraj lesa na pobřeží zálivu ca 0.6 km SV od středu obce, N60° 8'18.17", E18°39'15.56", 5 m n. m.
Hus	Česko; 37h. Prachatické Předšumaví – Husinec: louka na pravém břehu řeky Blanice, asi 0,8 km J od kostela v obci; 510 m n. m.; +49,0472; +013,9847
Nsed	Slovensko; 31. Bukovské vrchy – Nová Sedlica: louky na Z svahu vrchu Rozdiel (654,5), asi 2 km JV od středu obce; 500 m n. m.; +49,0307; +022,5301
<i>C.jacea</i> přechodný typ <i>jacea</i> → <i>angustifolia</i>	
Kom	Česko; 67. Českomoravská vrchovina – Horní Myslová: louka u potoka Z od osady Kopejtkův Mlýn, asi 0,7 km SZ od obce; 500 m n. m.; +49,1700; +015,4153
Mez	Česko; 37p. Novohradské podhůří – Mezilesí: svah nad polní cestou asi 0,4 km V od kapličky v obci; 545 m n. m.; +48,8101; +014,6500
<i>C. jacea</i> přechodný typ <i>angustifolia</i> → <i>jacea</i>	
Nos	Česko ; 6. Džbán - Nové Strašecí, louka v oboře Libeň, asi 2.2 km SV od náměstí; 430 m n. m.; +50°10'07"+13°55'10"
<i>C. j. subsp angustifolia</i>	
Ceb	Česko; 38. Českobudějovická pánev – České Budějovice: travnatá plocha na J okraji bývalého vojenského cvičiště na SZ okraji města; 390 m n. m.; +48,9895; +014,4421
Lib	Česko; 11b. Poděbradské Polabí –Libice nad Cidlinou: podél cesty s červenou turistickou značkou na V okraji NPR Libický luh, asi 1 km JJZ od nádraží v obci; 190 m n. m.; +50,1192; +015,1784
Nou	Česko; 7c. Slánská tabule - Nové Ouholice, nekosená suchá louka asi 0.3 km SSV od železniční zastávky; 180 m n. m.; +50°18'16"+14°19'06"
Pal	Česko; 17b. Pálavské vrchy – Horní věstonice, Nekosená louka na horním okraji vinice, 1 km JVV od obecního úřadu; 350 m n. m.; +48°52'20.014" +16°38'27.433"
Poh	Česko; 18a. Dyjsko-svratecký úval – Břeclav, Pohansko: hrúd za plotem obory mezi Lánskými loukami a Pohanskem, asi 4,9 km JJV od nádraží; 155 m n. m.; +48,7134; +016,9075
Rad	Slovensko; 6. Podunajská nížina – Radava, nekosený travnatý pruh na okraji vinic asi 1 km V od kostela v obci; 145 m n. m.; +48°05'38"+18°18'55"
Sol	Slovensko; 8. Východoslovenská nížina – Solníčka: zbytky luk na okraji polí

	u vyústění cesty z obce na protipovodňovou hráz Latorice, asi 2,6 km S-SSV od kostela v obci; 100 m n. m.; +48,5008; +021,9661
Tur	Slovensko; 6. Podunajská nížina – Tvrdošovce: slanisko na okraji zatopené těžební jámy na S okraji Z části obce, asi 800 m VSV od nádraží; 116 m n. m.; +48,0959; +018,0514
<i>C. stenolepis</i>	
Dub	Česko; 18b. Dolnomoravský úval – Ratíškovice: okraj paseky u žl. turist. zn. asi 2,2 km JJV od kostela v obci; 200 m n. m.; +48,9039 +017,1706
Les	Česko; 78. Bílé Karpaty lesní – Horní Němčí: louky na S svahu vrchu Lesná (696 m), asi 3,9 km JZ od kostela v obci; 630 m n. m.; +48,9028 +017,6531
<i>C. phrygia</i>	
Vis	Česko; 99a. Radhošťské Beskydy – Krásná Visalaje, horní část sjezdovky asi 0.25 km JJV od parkoviště na konci silnice u hotelu Visalaje; 760 m n. m.; +49°30'56"+ 18°31'47"
<i>C. carpatica</i>	
Suchy	Slovensko; 21c. Velká Fatra – Liptovské Revúce, Vyšná Revúca: alpské louky na JV svahu hřebene asi 0,5 km ZJZ od vrcholu Suchý vrch (1549,6), asi 6 km Z od obce; 1520 m n. m.; +48,9083 +019,0842
Rodna	Rumunsko; Rodna - Valea Vinului, Z svah hory Kis-Korongys (1854), asi 3,6 km SZ od soutoku hlavních údolí na S okraji obce; 1680 m n. m.; +47°30'39"+24°48'05'
<i>C. elatior</i>	
Stud	Česko; 83. Ostravská pánev – Studénka: ruderální porost mezi silničkou a žel. tratí asi 0,6 km V od nádraží; 225 m n. m.; +49,7094 +018,0739

Příloha 5: Sekvence studovaného úseku ITS

TCGAAGCCTGCACAGCAGAACGACCCGTGAACATGTAATCACAACCTGGGTGTCGTGGGATTGGGTGCGA
GCCTTAGCCCTGCGATGCTCGTCGGCATCCATTCAAGGTGCCTATCTCTAGGCATCGTGGATGTTTTGTCG
GCACAAAACAAAACCCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACAAAACCTCAAGAAGGGTGCCTCGTG
TTGCCCCGTTTTCGGTGTGCATGCGGGTCGCGGCCTCTCATTAAACCATAAACGACTCTCGGCAACGGATA
TCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGA
ACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA
CGCATCGCGTCGCCCCAGACCATGCTCCCCAGAGGGACGTTTGGTTTGGGACGGAGACTGGCCTCCCGT
GCCGATGGTGCGGTTGGCCTAAAAAGGAGTCCCCTTTGGCGGACGCACGGCTAGTGGTGGTTGTCAAGA
CCTTCGTATCGAGCCGTGGTGATGCTAGGGAGTTGCTCTCTAAAGACCCTAACGTGTCGTTTACGACGAT
GCTTCGA