

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Katedra ekologie



Hybridizace diploidních druhů rodu *Chenopodium*

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

Diplomantka: Bc. Dagmar Boltíková

2015

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Dagmar Boltíková

Ochrana přírody

Název práce

Hybridizace diploidních druhů rodu *Chenopodium*

Název anglicky

Hybridization in diploid *Chenopodium* species

Cíle práce

Práce bude řešit schopnost křížení dvou druhů merlíků (*Chenopodium suecicum* a *C. ficifolium*). Kříženec je v podstatě neznámý a práce bude obsahovat jednak stanovení frekvence výskytu hybridních rostlin pomocí molekulárních markerů, a jednak morfometrickou analýzu jak rodičovských, tak hybridních rostlin.

Metodika

Práce bude složena ze dvou částí (1) vypěstování mateřských (*Chenopodium suecicum* a *C. ficifolium*) a hybridních rostlin a otestování funkčnosti variability v IGS úseku, který se ukázal být velmi dobrým molekulárním markerem, díky výrazné odlišnosti obou druhů způsobené 40 bp inzertem v této oblasti u *C. ficifolium*. (2) Detailní analýza cca 10 směsných populací, která ukáže (a) frekvenci výskytu křížence v přírodě a (b) pokusí se nalézt morfologické znaky spolehlivě diskriminující křížence od obou rodičovských druhů.

Doporučený rozsah práce

cca 35 stran

Klíčová slova

křídelní polymorfismus, morfologie dospělců, *Colon latum*, střední Evropa

Doporučené zdroje informací

- Brandmayr P. 1991: The reduction of metathoracic alae and of dispersal power of carabid beetles along the evolutionary pathway into the mountains. Pp. 363-378. In: Lanzavecchia G. & Valvassori R. (eds): Form and Function in Zoology. Selected Symposia and Monographs U.Z.I., 5. Mucchi, Modena.
- Ikeda H., Kagaya T., Kubota K. & Abe T. 2008: Evolutionary relationships among food habit, loss of flight, and reproductive traits: life-history evolution in the Silphinae (Coleoptera: Silphidae). *Evolution*, 62: 2065-2079.
- Newton A. F. 1998: Phylogenetic problems, current classification and generic catalog of word Leiodidae (including Cholevidae). Pp. 41-178. In: Giachino P.M. & Peck S.B. (eds): Phylogeny and Evolution of Subterranean and Endogean Cholevidae (=Leiodidae Cholevinae). Proceedings of a Symposium (30 August, 1996, Florence, Italy), XX International Congress of Entomology. Torino: Museo Regionale di Scienze Naturali Torino.
- Nishikawa M. 2010: Hind wing polymorphism confirmed in the Coloninae (Coleoptera, Leiodidae). *Elytra*, Tokyo 38: 267-269.
- Szymczakowski W. 1969a: Klucze do oznaczania owadów Polski. Czesc XIX Chrzaszce Coleoptera, Zeszyt 14 Colonidae. PWN, Warszawa.
- Szymczakowski W. 1969b: Die mitteleuropäischen Arten der Gattung *Colon* Herbst. *Entomologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde in Dresden* 8: 303-339.

Předběžný termín obhajoby

2015/06 (červen)

Vedoucí práce

doc. Mgr. Jan Růžička, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 1. 4. 2014

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 1. 4. 2014

prof. Ing. Petr Sklenička, CSc.

Děkan

V Praze dne 10. 04. 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci na téma „Hybridizace diploidních druhů rodu *Chenopodium*“ vypracovala samostatně pod vedením doc. Mgr. Bohumila Mandáka, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

V..... dne.....

Podpis autora

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala doc. Mgr. Bohumilu Mandákovi, Ph.D. za možnost zpracovávat zajímavé téma diplomové práce, za odborné vedení, důležité připomínky a poskytnutí podkladů. Dále bych chtěla velice poděkovat pracovníkům oddělení genetické ekologie, za odbornou pomoc při práci v laboratoři, trpělivost a cenné rady. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za podporu a za to, že mi věřili, nejen v průběhu psaní diplomové práce, ale i po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Tématem diplomové práce byla hybridizace diploidních druhů rodu *Chenopodium*, která byla zaměřena na dva konkrétní druhy *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum*. Křížením těchto dvou druhů vzniká jejich potomek hybrid *Chenopodium* × *gruelli*. Data byla získána vypěstováním mateřských rostlin (*Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*) a sběrem přírodních populací v terénu. Populace byly rozděleny na tři skupiny: umělá hybridizace, frekvence výskytu kříženců v experimentálních populacích a frekvence výskytu v přírodních populacích. DNA vzorky byly získány z listů jednotlivých jedinců DNA izolací za použití kitu DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen). Poté byli testováni polymerázovou řetězovou reakcí pomocí molekulárního markeru ITS nrDNA. Vizualizace výsledků byla provedena gelovou elektroforézou. Potvrzení hybridů společně se svými rodiči se podrobili také morfologické analýze listů a semen. V této analýze byly hodnoceny morfologické odlišnosti hybridů od obou rodičů. Přínosem této práce bylo potvrzení hybridizace dvou diploidních druhů *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*, jejichž potomek se lišil listy a povrchovou strukturou semen od obou rodičů.

Klíčová slova: hybridizace, molekulární marker, *Chenopodium*

Abstract

The theme of this thesis was hybridization in diploid *Chenopodium* species, which was focused on two specific species - *Chenopodium ficifolium* and *Chenopodium suecicum*. The crossing of these two species formed their offspring hybrid *Chenopodium* × *gruelli*. Data were obtained by growing a maternal plants (*Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*) and by collection of natural populations in terrain. Populations were divided into three groups: artificial hybridization, frequency of hybrids in the experimental population and frequency of hybrids in the natural population. DNA samples were obtained from leaves of individual subjects by insulation DNA using kit DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen). Then they were tested by Polymerase Chain Reaction using molecular marker ITS nrDNA. Visualization of the results was performed by gel electrophoresis. Confirmed hybrids along with their parents also underwent morphological analysis of leaves and seeds. In this analysis were evaluated the morphological differences between hybrid and both parents. The contribution of this work was the confirmation hybridization of two diploid

species *Ch. ficifolium* and *Ch. suecicum*, whose offspring differed by leaves and surface structure of seeds from both parents.

Keywords: hybridization, molecular marker, *Chenopodium*

Obsah

1	ÚVOD.....	10
2	CÍL PRÁCE	11
3	LITERÁRNÍ REŠERŽE	12
3.1	Hybridizace.....	12
3.2	Molekulární markery.....	17
3.2.1	Popis použitých molekulárních metod.....	20
3.2.2	Popis struktury jaderné ribozomální DNA.....	23
3.2.3	Molekulární markery v evoluci rostlin.....	24
3.3	Rod <i>Chenopodium</i> (merlík)	29
3.3.1	Charakteristika rodu <i>Chenopodium</i>	29
3.3.2	Taxonomie rodu <i>Chenopodium</i>	32
3.4	Zkoumané diploidní druhy	36
3.4.1	Charakteristika <i>Chenopodium ficifolium</i>	36
3.4.2	Charakteristika <i>Chenopodium suecicum</i>	38
4	METODIKA.....	41
4.1	Sběr dat	41
4.1.1	Umělá hybridizace	41
4.1.2	Frekvence výskytu kříženců v experimentálních populacích.....	42
4.1.3	Frekvence výskytu kříženců v přírodních populacích.....	43
4.2	Molekulární markery.....	45
4.2.1	Vývoj molekulárního markeru	45
4.3	DNA analýzy	47
4.3.1	Izolace DNA.....	47
4.3.2	Měření a ředění koncentrace DNA.....	47
4.3.3	PCR analýza	48
4.3.4	Elektroforéza na agarózovém gelu	50
4.4	Morfologická analýza	51
4.4.1	Tvary listů studovaných druhů.....	51
4.4.2	Semena studovaných druhů.....	51
5	VÝSLEDKY	52
5.1	DNA marker.....	52
5.2	Umělá hybridizace.....	52
5.3	Frekvence výskytu kříženců v experimentálních populacích	53

5.4	Frekvence výskytu v přírodních populacích	54
5.5	Morfologická analýza	54
5.5.1	Tvary listů studovaných druhů.....	54
5.5.2	Semena studovaných druhů.....	56
6	DISKUZE.....	60
7	ZÁVĚR.....	64
8	LITERATURA A ZDROJE	66

1 ÚVOD

Hybridizace je definována jako reprodukce mezi geneticky odlišnými populacemi (Barton et Hewitt 1985), produkující potomstvo smíšeného původu, který se vyskytuje téměř ve všech procesech speciace. Hybridizace může vyvolat interakce zahrnující širokou škálu typů a úrovní genetické odlišnosti mezi rodičovskými formami. Proto důsledky hybridizace hrají důležitou roli v evoluci druhů (Abbott et al. 2013).

Chenopodium (merlík) představuje polyfyletický rod s téměř kosmopolitním výskytem. Zahrnuje převážně jednoleté byliny rostoucí v aridních i semiaridních oblastech, často ve vysokých nadmořských výškách, nevdí jim ani půdy s vyšší koncentrací solí (Fuentes-Bazan et al. 2012). Merlík je rod morfologicky velice variabilní, liší se tvarem listů, strukturou květů, typem květenství i velikostí a barvou pylu (Kühn et al. 1993). Svoji proměnlivostí způsobují mnoho taxonomických nejasností. Vysoká fenotypová plasticita především u polyploidních druhů *Chenopodium* s. str., může vést v některých případech ke speciaci. Vysoký stupeň polyploidie je také často spojována s hybridizací (Fuentes-Bazan et al. 2012).

Tato práce se zabývá diploidními druhy *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum*, u kterých dochází ke křížení a produkují hybridního potomka *Chenopodium* × *gruelli*. Práce se snaží potvrdit, zda tyto druhy skutečně spolu hybridizují a pokud ano, jak se vniklý kříženec morfologickými znaky odlišuje od svých rodičů.

2 CÍL PRÁCE

Diplomová práce je zaměřena na schopnost křížení dvou diploidních druhů *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum*, jejichž kříženec *Chenopodium* × *gruelli* je v podstatě neznámý. Tato práce by měla stanovit frekvenci výskytu hybridních rostlin pomocí molekulárních markerů a na základě morfologické analýzy zjistit odlišnosti mezi rodičovskými a hybridními rostlinami.

Diplomová práce by měla být složená ze dvou částí:

První část:

- Vypěstování mateřských (*Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*) a hybridních (*Ch.* × *gruelli*) rostlin.
- Otestování funkčnosti variability v IGS úseku, který se ukázal být velmi dobrým molekulárním markerem.

Druhá část:

- Detailní analýza cca 10 směsných populací.
- Frekvence výskytu křížence v přírodě pomocí molekulárního markeru (IGS úseku).
- Pokusit se nalézt morfologické znaky diskriminující křížence od obou rodičovských druhů.

3 LITERÁRNÍ REŠERŽE

3.1 Hybridizace

Pojem hybridizace neboli křížení je označení pro rozmnožování dvou jedinců s různými genotypy, jejichž výsledkem je vznik životaschopného potomka, který se nazývá kříženec (hybrid). Kříženec je tedy jedinec vzniklý splynutím dvou gamet obsahující rozdílné alely určitého genu. Tyto alely mohou být kvalitativně shodné, jedná se o homozygota nebo kvalitativně rozdílné, pak jde o heterozygota. Termín hybridizace je tedy úspěšné křížení jedinců ze dvou populací nebo skupin populací, které se od sebe odlišují na základě jednoho nebo více dědičných znaků (Harrison 1990). Podle toho v kolika znacích se liší, mohou být rozděleni na monohybridy, dihybridy a polyhybridy (Briggs et Walters 2001).

Hybridizace je způsobena mezidruhovým a mezirodovým křížením. Jedinci vzniklí hybridizací mohou získat od rodičů nevýhodné znaky, ale také výhodné, které jim umožňují osidlovat nové habitaty nebo okrajové části areálu, ve kterých nejsou rodičovské druhy schopny přežít. Mezidruhová kříženci vznikají v rámci jednoho rodu. V některých skupinách se vyskytují velmi běžně, například rod *Crataegus* z čeledi *Rosaceae*. Tento rod je plně plodný, kříží se s matkou i mezi sebou. V mnoha případech bývá přesné určení druhu značně obtížné někdy dokonce až nemožné. V opačném případě je to velmi vzácný jev, například u čeledi *Apiaceae*. U mezirodových kříženců se mezi sebou kříží různé druhy, patřící různým rodům. Například *Gymnacampsis* (hybrid druhů?) a *Cephalopactis* (hybrid druhů?), které jsou naprosto sterilní, tudíž se jedná o slepou vývojovou větev (Briggs et Walters 2001).

V přírodě může být křížení rostlin nejčastěji omezeno:

- Geografickou izolací – z hlediska geografie není možné, aby se druhy setkaly a došlo tak ke křížení.
- Ekologickou izolací – druhy na stanovištích jsou vázány na různé podmínky, tudíž se nestává, aby se z chladnomilného druhu stal teplomilný. Ke křížení, ale zde dochází a to v pásu, kde se tyto druhy setkávají.
- Sezónní izolací - křížení je omezeno odlišnou dobou kvetením druhů.

Z evolučního hlediska hybridizace pravděpodobně hraje důležitou roli v evolučních novinkách, hlavně při speciaci. Proces speciace může probíhat různými způsoby. Pro zjednodušení jsou rozděleny na pozvolnou a saltační speciaci (Briggs et Walters 2001).

Pozvolná speciace

Pro pochopení proč se rostliny v přírodě mezi sebou kříží je vysvětleno pozvolnou speciací. Jedná se o křížení dvou populací mající stejného společného předka, které osídlují dvě geograficky rozdílná území. Jinými slovy se jedná o alopatrii. Dále se v průběhu času tyto populace postupně a nezávisle mění, jejichž výsledkem jsou potomci, kteří se od sebe morfologicky liší a jsou navzájem reprodukčně izolováni. Jakmile se areály obou druhů opět překryjí, projeví se izolační mechanismy (Briggs et Walters 2001).

K alopatrii může dojít různými způsoby. Pro představu se může jednat o migraci, mutaci, selekci a jiné náhodné vlivy. Velkou roli hrají klimatické změny v období postglaciálu v Evropě a Severní Americe. Tyto změny mají ohromný význam u migrace pro uchycení „nových“ izolovaných populací. Například ponořením pevninských mostů nejspíš došlo ke geografické izolaci „dceřiných“ populací. Dalším způsobem šíření izolovaných populací je dálkový přenos propagulí na „ostrovy“, jako jsou oceánské ostrovy, izolované horské vrcholy, bezodtoková jezera nebo horninové výchozy se zvláštními podmínkami prostředí. Z dlouhodobějšího hlediska mohou být areály rozděleny kontinentálním driftem, který je spjatý s horotvornými procesy (Briggs et Walters 2001).

V přírodních podmínkách mohou nastat různé situace, na základě kterých byly vytvořeny série modelů. Tyto modely se liší mezi sebou působením přírodního výběru a náhodnými jevy. Během vývoje a usídlení nové populace může dojít k drastickému poklesu počtu jedinců, což může vyvolat silný genetický drift. Dalším důvodem, jak se mohou odlišovat od sebe různé modely, je způsob diferenciací. Morfologická diferenciací druhů se vyvíjí buď s genetickými změnami, během kterých se vytvoří izolační mechanismy nebo se morfologická diferenciací a reprodukční mechanismy vyvíjejí odlišnou rychlostí (Briggs et Walters 2001).

Při hledání důkazů různých modelů pozvolné speciace je velkým stížením časová škála stovek generací. Někdy jsou těžko poznatelné biologické druhy od

původní mateřské populace. Je velmi důležité dát si pozor na různá stádia vývoje speciace, ve kterých se druhy mohou nacházet. Je také nutné přihlížet k tomu, že diferenciací populace mohly druhy dojít do pozdějších stádií nebo do stádií různých ekotypů (geneticky odlišitelná populace nějakého druhu adaptovaná na určité podmínky prostředí, ve kterém se vyskytuje, a která se liší od ostatních jedinců téhož druhu). Při podrobně prozkoumaných různých situacích od ekotypů po ostrovní endemity a od lokálních ras po vikarizující druhy, můžeme říci, že se jedná o pozvolnou speciaci. K ověření původnosti druhu mezi různými taxony nám mohou pomoci fakta, jako je jejich rozšíření, morfologie a další znaky, podle kterých můžeme určit společného předka. Rostliny, které jsou cytotaxonomicky dobře prozkoumané, lze podrobit hybridizačním experimentům. Díky těmto pokusům se mohou odhalit genetické rozdíly mezi jednotlivými ekotypy (Briggs et Walters 2001).

Důsledky hybridizace

Důsledky hybridizace mají selektivní nevýhody, ale i výhody vzniklých hybridů. Například máme dvě populace, které se staly sympatrickými po období alopatrického výskytu. Tyto populace se v izolaci mohly natolik změnit, že se budou chovat jako dva biologické druhy. Na společném areálu za stejných podmínek prostředí nebude docházet ke křížení. Hybridizace tedy bude vzácná a výsledkem bude neplodné potomstvo. Obě populace se liší morfologicky, ale i ekologickými nároky. Závěry hybridizačních experimentů povedou k tomu, že izolační bariéry mezi nimi jsou jen částečné nebo vůbec neexistují. Bude záležet na ekologických faktorech, které rozhodnou o osudu přirozeně vzniklých hybridů (Briggs et Walters 2001).

Pokud nebudou existovat přechodné biotopy, kde by byly vhodné podmínky pro obě populace, tak kříženci budou selektivně znevýhodněni. Budou mít méně životaschopných potomků nebo vůbec žádné. Přírodním výběrem čisté populace budou zvýhodněné, a tím potlačí hybridizaci. Současně bude pozitivně selektován každý částečný izolační mechanismus, který by snižoval podíl hybridů v potomstvu. Selekcí se, ale postupně tyto izolační mechanismy zdokonalí. Tento jev se nazývá jako „Wallaceův efekt“ nebo disruptivní selekce (Briggs et Walters 2001).

Naopak když budou biotopy odpovídat podmínkám obou populací, mohou být kříženci evolučně zdatnější. Může nastat situace, kdy kříženci v následujících populacích dosáhnou většího počtu potomků, než potomstvo čistých populací. Skoro všechny

částečné izolační mechanismy vytvořené u alopatrických populací budou potlačeny a jejich odlišnosti se mohou ztratit v množství hybridů a zpětných kříženců. Tyto modely poukazují pouze na extrémní případy (Briggs et Walters 2001).

Pokusem dvou odrůd kukuřice seté (*Zea mays*), u nichž vybral palice s nejmenšími známkami hybridizace a ty následně křížil, zjistil, že v následujících generacích se postupně snižuje podíl cizosprašnosti. Příčinou reprodukční izolace byla rozdílná doba kvetení. Výsledkem experimentu je, že doba kvetení může mít podobný vliv i u planě rostoucích rostlin tam, kde jsou přírodním výběrem kříženci znevýhodňováni (Briggs et Walters 2001).

Po mnoha provedených experimentech lze říci, že disruptivní selekce nabízí možnost speciace. Mezi odlišným prostředím rostlin byl odhalen genový tok a následná disruptivní selekce. Pro vysvětlení máme rostliny rostoucí na výsypkách a rostliny na pastvinách. Po přesazení rostlin z výsypek špatně rostou na pastvinách a rostliny z pastvin na výsypkách vůbec nerostou. Tím pádem můžeme dojít k závěru, že kříženci rodičů ze stejného typu stanoviště, jsou reprodukčně zdatnější. Selekcí dochází k omezení genového toku na křížení v rámci původního biotopu (Briggs et Walters 2001).

Opakem Wallaceova efektu je takzvaná introgrese, které dochází, když jsou hybridy v selekční výhodě. Podle genetika Andersona (1949) pokud dojde přirozenými procesy nebo lidskou činností k narušení biotopů, kde se vyskytují křížitelné druhy, jsou geny jednoho druhu postupně vneseny do druhého spontánním a následným zpětným křížením (Briggs et Walters 2001).

Saltační speciace

Na rozdíl od pozvolné speciace, kdy se druhy mohou pozvolna vyvíjet ze společného předka na základě geografické nebo ekologické izolace, je i jiný způsob, takzvaná saltační speciace. Saltační speciace neboli skokové změny v průběhu evoluce, jsou popsány jako náhlý vznik druhů. Dochází ke změnám v uspořádání a počtu chromozómů. Tyto genetické změny mohou vést k sympatrickému vzniku nových druhů. Nejčastěji při saltační speciaci je vznik polyploidie rostlin (Briggs et Walters 2001).

Polyploidie neboli zdvojení celého genomu nastává v buněčných jádrech, kde se nacházejí více než dvě chromozómové sady. Ploidie se vyskytuje u většiny eukaryot

hlavně u rostlin, méně pak u živočichů (Chen 2007). Nejvíce polyploidních rostlin je krytosemenných (Briggs et Walters 2001), méně nahosemenných cca 2%. Pravděpodobně více než 70% krytosemenných rostlin má polyploidní původ (Wendel 2000). Také se předpokládá, že v minulosti některé druhy prošly procesem polyploidizace ne jednou, ale vícekrát (Van de Peer et al 2009). Častý výskyt polyploidů, mít více sad genetického materiálu, je výsledkem výhodnosti pro adaptivní evoluci (Adams et Wendel 2005).

Typy polyploidie

Polyploidie mohou být rozděleny mnoha způsoby, nejčastěji však na autopolyploidy a allopolyploidy. U autopolyploidie dochází ke zmnožení homologních chromozomových sad v rámci jednoho druhu. Naopak při allopolyploidii dochází ke zmnožení rozdílných chromozomových sad, hlavně během mezidruhově hybridizace (Briggs et Walters 2001, Ramsey et Schemske 2002). Pokud si při rozmnožování diploidních rostlin (AA), vezme od každého rodiče haploidní chromozomovou sadu, vzniknou dvě buňky s diploidním počtem chromozomů, což je výsledek diploidního potomka (AA). Ale když při tomto procesu dojde k narušení průběhu mitózy (např. tepelným šokem) může se stát, že vznikne jediná diploidní buňka, která obsahuje čtyřnásobek haploidní chromozomové sady (AAAA). Takto vzniklý potomek se nazývá autopolyploid. Autopolyploid může vzniknout i splynutím dvou neredukovaných gamet. Autopolyploidizace vede často k neplodnosti hybridů. To je způsobeno během meiózy, kdy dochází u autopolyploida, který obsahuje čtyři homologní chromozomy, k vytvoření multivalentů a v jádrech zůstávají nespárované, osamělé, chromozomy takzvané univalenty. Správně by se měly párovat dva homologní chromozomy a vytvářet bivalenty. Druhý případ je vznik allopolyploida, kdy se dva diploidní druhy postupnou speciací oddělily od společného předka. Splynutím nestejných chromozomových sad AA a BB dojde k vytvoření křížence AB. Tento kříženec je téměř neplodný, který ale může vytvořit malé, biologicky významné množství neredukovaných (AB) vaječných a pylových buněk. Jejich splynutím může vzniknout tetraploidní rostlina AABB. Tento allopolyploid bývá většinou plodný, protože při meióze se v jádře každý chromozom páruje s jediným homologním protějškem (Briggs et Walters 2001).

Dále se také dělí podle množství chromozomových sad. S lichým počtem chromozomových sad jde o anortoploidii a se sudým o ortoploidii. Anortoploidní

jedinci, kteří vznikají převážně křížením rodičů s rozdílným typem ortopolyploidie, bývají sterilní. Příčinou je nerovnoměrné rozdělení chromozómů při jaderném dělení. Naopak ortoploidní jedinci, jsou schopni pohlavního rozmnožování, protože při meióze tvoří stabilní bivalenty (Ritz et al. 2011).

Polyploidy můžeme klasifikovat i podle stáří na paleopolyploidy a neopolyploidy. Paleopolyploidie se vyznačuje starobylými taxony, která v evoluční historii prošla procesem polyploidizace, ale dnes se svými vlastnostmi jeví jako diploidní jedinci. Došlo k rediploidizaci, k přeorganizování a umlčení duplikované DNA. Naopak neopolyploidii zastupují velmi mladí typy polyploidů. (Hilu 1993; Ramsery et Schenke 2002).

Polyploidi nemusí vznikat pouze křížením dvou diploidních druhů, ale i křížením druhů s různou ploidní úrovní. Kříženec se nemusí zrodit jen splynutím dvou neredukovaných gamet, ale také splynutím jedné redukované gamety s neredukovanou. Příkladem je splynutí neredukované gamety ($2n$) s redukovanou ($1n$), jehož výsledkem je triploid (triploidní most - není schopen se dále dělit). Triploid pak má možnost dát vznik dalším polyploidům. Například tím, že triploid ($3n$) potká jinou redukovanou gametu ($1n$), dá vznik tetraploidovi ($4n$). Tetraploid může vzniknout i splynutím dvou neredukovaných gamet ($2n$). Hexaploid zase splynutím redukované a neredukované gamety dvou tetraploidů a podobně (Köhler et al. 2010).

Podle počtu chromozomových sad jsou tedy rozlišováni diploidi, triploidi, tetraploidi atd. Stupeň polyploidie je značen písmenem „x“, které označuje základní sadu chromozómů. Jedná se o číslo chromozomu monoploidního genomu. Typy ploidie jsou pak zapisovány následujícím způsobem: diploid $2n = 2x$, triploid $2n = 3x$, tetraploid $2n = 4x$ atd., podle vzrůstajícího počtu chromozomových sad (Kolano et al. 2008).

3.2 Molekulární markery

Molekulární markery dávají informace o organismu získané na základě analýzy jeho molekul DNA, které jsou vybírány náhodně či cíleně. Typickým znakem všech molekulárních markerů je bezprostřední schopnost detekce alelických variant v sekvenci nukleotidů. V současné době se nejčastěji využívají DNA markery, které jsou variabilnější a mohou charakterizovat celý genom. DNA markery jsou založené na variabilitě v sekvencích DNA (i RNA), neboli polymorfismu. Jejich počet je téměř

neomezený, závisí jen na míře poznání primární sekvence DNA vybraného druhu. Pro získání požadovaného výsledku stačí pouze malé množství biologického materiálu.

Nejlépe využitelnými DNA markery jsou sekvence s těmito vlastnostmi (Řepková et Relichová 2001):

- vysoký polymorfismus,
- častý výskyt v genomu,
- vysoká reprodukovatelnost,
- kodominantní charakter dědičnosti,
- nezávislost na podmínkách prostředí,
- snadné a rychlé testování.

Rozdělení DNA markerů dle využití při mapování genomu:

I. typ – kódující exprimované geny, mohou být kandidátními geny pro QTL (*Quantitative Trait Loci*). Mají nízkou hladinu polymorfismu, jsou málo použitelné pro studie diverzity rodin a populací. Využívají se významně v komparativním (srovnávacím) mapování.

II. typ – vysoce variabilní sekvence DNA. Zde se využívají především mikrosatelity a minisatelity. Tyto sekvence se vyznačují vysokým stupněm polymorfismu (velký počet alel). Díky tomu jsou mikrosatelity vysoce informativní v populačních studiích a při určování rodičovství, a jsou základem pro vazbové mapování genů. Tyto markery nemají přímo vliv na variabilitu znaku, ale mohou být ve vazbě s QTL.

III. typ – jednonukleotidové polymorfizmy (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*), které mohou ležet uvnitř kódujících úseků, ale častěji v nekódujících oblastech - intronech nebo intergenových oblastech. Jsou využitelné pro populační a rodinné studie. Vyskytují se v genomu přibližně každých 500 – 1000 bp. Jejich význam roste s rozvojem automatizace metod skreeningu - *Micro Arrays* (DNA čipy) (Hulák et al. 2006).

Rozdělení DNA markerů dle charakteru svého polymorfizmu:

- Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*).
- Polymorfismus v délce sekvence (SSLP – *Simple Sequence Length Polymorphism*). Zahrnuje mikrosatelity (též označované STR – *Short*

Tandem Repeats) a minisatelity (též označované VNTR – *Variable Number Tandem Repeat*).

- Polymorfismus jednotlivých nukleotidů (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*). Jedná se o bodové mutace. Některé mohou být detekovány jako RFLP. V případě, že neexistuje rozpoznávací místo pro restriktázu, lze k detekci použít DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) nebo SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), případně pouze sekvenování (Hulák et al. 2006).

Metody podle použitých DNA markerů se dělí na:

Metody založené na hybridizaci DNA

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) - polymorfismus délky restričních fragmentů se používá k identifikaci alel na základě přítomnosti či nepřítomnosti specifického restričního místa. Genomová DNA je štěpena restriční endonukleázou, separována elektroforézou a přenesena na pevnou membránu. Po hybridizaci se značenou sondou a vizualizací lze zjistit polymorfismus ve velikosti vzniklých restričních fragmentů DNA (Knoll et Vykoukalová 2002).

Metody založené na polymerázové řetězové reakci

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) polymerázová řetězová reakce je založena na *in vitro* amplifikaci specifických fragmentů DNA o známé sekvenci bází. Podmínkou použití této metody je znalost sekvence v bezprostředním sousedství úseku DNA určeného k amplifikaci. Sekvence tohoto úseku DNA nám však nemusí být známá. Pokud známe sekvence ležící v blízkosti této cílové oblasti je možné touto metodou naamplifikovat určité oblasti genomu z několika málo kopií do řádově biliónů kopií (Knoll et Vykoukalová 2002).

PCR-RFLP metodou se pomocí PCR na základě genomové DNA amplifikuje specifická sekvence. Tento fragment DNA se štěpí restriční endonukleázou (Knoll et Vykoukalová 2002).

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) - délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů slouží k detekci fragmentů DNA získaných štěpením restričními endonukleázami pomocí PCR amplifikace (Knoll et Vykoukalová 2002).

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) - polymorfismus náhodně amplifikované DNA je založen na PCR. Principem je, že primery nasednou na

protiběžné řetězce DNA v amplifikované vzdálenosti od sebe a v tuto chvíli je umožněna amplifikace části DNA mezi nimi. Do amplifikace vstupuje pouze jeden náhodný primer (dekanukleotid), (Knoll et Vykoukalová 2002). Modifikací RAPD je možné použít další metody - RAMPO (*Random Amplified Microsatellite Polymorphism*) a DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), (Řepková et Relichová 2001).

STR (*Short Tandem Repeats*) nebo SSR (*Simple sequence Repeats*) neboli mikrosatelity jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů o délce 1 - 6 nukleotidů. Oblasti přilehlé k mikrosatelitům jsou obvykle unikátní. Můžou být tak navrhnuty primery, které mohou daný mikrosatelitový marker vyhledat. Díky malé velikosti a délkovému polymorfismu jednotlivých lokusů se screening provádí amplifikací lokusů pomocí PCR z okrajových primerů a následnou elektroforézou (Knoll et Vykoukalová 2002).

3.2.1 Popis použitých molekulárních metod

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Polymerázová řetězová reakce je jednoduchá metoda, která amplifikuje *in vitro* požadovaný specifický úsek DNA. DNA vzorku stačí extrémě malé množství. Typická vlastnost DNA-polymerázy je schopnost rozpoznat jednořetězcovou DNA jako templát a současně se navázat na deoxyribonukleozidtrifosfáty (dNTP). Na jednovláknovou DNA se také naváže krátký oligonukleotid (primer), který způsobí, že polymeráza se připojí těsně za tento segment a pomocí energie v trifosfátech dNTP katalyzuje syntézu komplementárního nukleotidového řetězce. Úsek nukleotidové sekvence, který je určen k amplifikaci, je vymezen dvěma primery. Tyto primery jsou komplementární k sekvencím ležící na krajích množného úseku na opačných vláknech DNA tak, že jsou orientovány svými 3'-konci k sobě. Po přidání polymerázy a nukleotidů probíhá syntéza nových vláken protisměrně. Principem PCR je kopírování sekvence templátu v několika po sobě jdoucích cyklech, kde se v každém cyklu zdvojnásobí počet kopií (Zima et al., 2004).

Složení roztoku pro PCR

- Templát (matrice) - DNA obsahuje požadovaný úsek, který chceme namnožit (amplikon).

- dNTP - deoxyribonukleozidtrifosfáty, které slouží k syntéze polynukleotidového řetězce a společně s *Taq* polymerázou syntetizují nové vlákno. Poměr nukleových bází (C, G, T, A) v dNTP by měl být ve stejném množství.
- Dvojice primerů („forward“ a „reverse“) jsou krátké oligonukleotidové jednořetězcové specifické úseky DNA, které ohraničují amplikon. Primery by neměly být mezi sebou komplementární, protože tím může dojít k překrytí dvou nebo tří bází a způsobit tak vznik oligodimerů.
- Komerčně dodávaný pufr.
- MgCl₂ a kvalitní redestilovaná voda.

PCR reakce je složena ze tří základních fází: denaturace, zchlazení a extenze.

Prvním krokem je denaturace, kdy se zahřeje dvouřetězcová DNA na vysokou teplotu (92 - 95 °C). Vysokou teplotou dochází k rozvolnění dvoušroubovice a vzniknou tak dvě jednořetězcové DNA.

Dalším krokem je zchlazení („annealing“), kde dochází k nasednutí primerů. Správné navázání primerů je nejdůležitější pro úspěch celé PCR. Krátké primery rychleji přisednou na jednořetězcovou DNA než komplementární vlákno. Teplota se obvykle pohybuje mezi 45 a 60°C, ta se liší podle délky a vlastností primerů (složení bází apod.). Tyto dva kroky trvají většinou kolem 30 sekund.

Poslední fází je extenze, při níž se syntetizují nové řetězce navazující na 3'-konce primerů. Díky *Taq* polymeráze je reakce katalyzována při teplotě 72°C. *Taq* polymeráza se používá, protože je stabilní při vysokých teplotách. Je izolována z termofilní gramnegativní bakterie *Thermus aquaticus*. Podle délky sekvence tato fáze většinou probíhá 30 - 90 sekund.

Tyto tři kroky se pravidelně opakují. Každý krok přibližně trvá 1 - 2 minuty. Počet cyklů se obvykle pohybuje kolem 20 - 40ti, přičemž množství nasyntetizovaných sekvencí geometricky přibývá (2ⁿ; n = počet cyklů), ve skutečnosti je tento počet nižší v důsledku postupné degradace enzymů (Zima et al., 2004).

Důležitá pravidla PCR analýzy

Nejdůležitější pro úspěch reakce je správná volba primerů. Obecně pro jejich správnou volbu je nutné dodržet některá pravidla. Významnou roli hraje délka primerů.

Nejčastěji se pohybují okolo délky 17 až 25 bází. U příliš dlouhých a nepurifikovaných primerů může dojít ke zvýšení počtu nesprávně zařazených bází do oligonukleotidu, to může způsobit selhání PCR. Dalším pravidlem je shodnost sekvence primerů se sekvencí templátu v místě jejich vazby. To platí hlavně pro poslední bázi na 3' -konci primeru. Sekvence primerů by se měla skládat s neopakujícími se sekvencí, aby nedocházelo k nasednutí primerů na více různých místech. Dále by se mělo předcházet k tvorbě sekundárních struktur primerů, tím že se dá pozor na sekvenční komplementaritu uvnitř primerů. Významnou roli hraje i teplota, při níž primery nasedají k templátu. Měla by se co nejvíce shodovat pro oba použité primery a zároveň být podobná teplotě tání templátu (Zima et al., 2004).

Pro správné proběhnutí PCR je mimo jiné důležitá koncentrace $MgCl_2$. Tyto hořčíkové ionty zajišťují správnou funkci polymerázy. Přesnou koncentraci je dobré předem vyzkoušet, protože při příliš nízké koncentraci se může stát, že PCR neproběhne nebo je její výtěžek velmi nízký. Při druhém extrému, kdy je koncentrace příliš vysoká, může dojít k rozmazání proužků na gelu při elektroforéze nebo dokonce i k zmnožení nespecifických fragmentů (Zima et al., 2004).

Dalším důležitým faktorem pro PCR je nastavení teploty. Teplota má vliv na navázání primerů. Vyšší teplota zajišťuje specifičnost primerů ke komplementární sekvenci vazebného místa na matricové DNA. Zvyšuje se tím přesnost PCR. Ovšem příliš vysoká nebo naopak nízká teplota může zkreslit výsledky PCR (Zima et al., 2004).

Tato metoda je velmi citlivá a tak se nemůže opominout riziko kontaminace. Kontaminaci se dá předejít dodržáním některých pravidel. Tím, že je použita kvalitní, čistá a koncentrovaná DNA a také je pracováno se specifickými primery, které jsou speciálně vytvořeny pro konkrétní druh. Dále je důležité pracovat ve sterilním prostředí, což v mém případě bylo dodrženo a pracovní prostor byl vždy v laminárních boxech sterilizován UV světlem. Samozřejmě se pracovalo s vyklávanými zkumavkami, špičkami na pipety a dalším potřebným materiálem vždy ve sterilních rukavicích. Aby se zamezilo kontaminaci, místnost, kde se připravují směsi pro PCR, je oddělena od místnosti, kde se pracuje s produkty rostlinného materiálu.

Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda, kde dochází k pohybu záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje molekul DNA jsou nukleové kyseliny, které se vyznačují záporně nabitými fosfátovými skupinami. Pomocí této metody se molekuly DNA oddělují díky rozdílné rychlosti pohybu molekul DNA v gelu, které jsou nepřímo úměrné velikosti molekuly DNA (Zima et al., 2004).

Elektroforéza se provádí na vhodném médiu, které je nejčastěji tvořeno gelem. V mé diplomové práci byl použit agarózový gel (AGE - *Agarose Gel Electrophoresis*). Gel je tvořen sítí polymerních molekul s póry, kterými se molekuli DNA pohybují různou rychlostí v závislosti na velikosti fragmentů. Malé fragmenty doputují na gelu dále, protože se pohybují rychleji. Pomocí agarózového gelu, díky jeho pórovitosti, jsou separovány částice na základě jejich elektrického náboje (Zima et al., 2004).

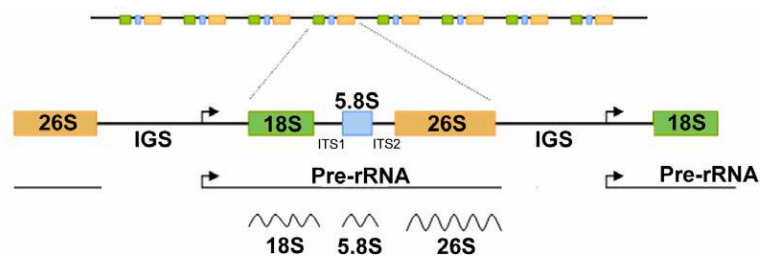
Postup elektroforézy

Nejprve je namíchána zahřátá směs agarózy a pufru. Poté je přidána barvicí látka (ethidium bromid) a směs je nalita do elektroforetické vaničky. Ztuhlý agarózový gel je dále vložen do elektroforetické vany. Vzorky jsou nanášeny na gel pipetou do startovacích jamek, které jsou vytvořeny ztuhnutím gelu elektroforetickými hřebeny. Je nutno špičku pipety zanořit co nehlouběji do jamky, protože jsou zaplavené pufrem a mohlo by dojít ke kontaminaci sousedních jamek. Do jamek jsou pipetovány zkoumané vzorky s nanášecím pufrem (loading buffers), který způsobí klesání vzorku ke dnu jamky. Jakmile jsou vzorky naneseny, spustíme elektroforézu. Podmínky nastavení elektroforézy jako délka trvání, napětí a proud atd. se liší v závislosti na typu elektroforézy. Elektroforetickou vanu uzavřeme a připojíme ke zdroji (Zima et al. 2004). Po skončení elektroforézy je gel vyjmut z elektroforetické vany i vaničky a vložen do UV transluminátoru. Vzorky díky přítomnosti ethidiiu bromidu (fluorescenční barvivo) při osvětlení UV zářením zviditelňuje separované vzorky.

3.2.2 Popis struktury jaderné ribozomální DNA

Jaderná ribozomální DNA (nrDNA) se skládá z velké a malé podjednotky, které tvoří tzv. transkripční jednotku. V eukaryotním jaderném genomu jsou dvě velké ribozomální podjednotky 5.8S rDNA a 28S rDNA a jedna malá podjednotka 18S rDNA. V jadérku dochází k přepisu rDNA na rRNA velké i malé podjednotky ribozómu. Struktura transkripční jednotky je vysoce konzervovaná. Úseky transkripční

jednotky, které nejsou součástí ribozómu, se nazývají přepisované regiony. Konce transkripční jednotky jsou ohraničeny vnějšími přepisovanými regiony (ETS - External Transcribed Spacer) a sekvence jednotlivých rRNA jsou odděleny dvěma vnitřními přepisovanými regiony (ITS1 a ITS2 - Intrnal Transcribed Spacer), (Hillis et Dixon 1991). Jednotlivé transkripční jednotky jsou odděleny nepřepisovanými mezigenovými regiony (IGS - Intergenic Spacer, Obr. č. 1), (Wang et al. 2003). Regiony IGS se vyvíjejí nejrychleji a podstatná část jejich sekvence je tvořena různým počtem opakujících se subrepetic. Konzervovanou doménou IGS je oblast promotoru, od kterého začíná transkripce. Díky vysoké variabilitě na úrovni primární struktury DNA, a to i mezi blízce příbuznými druhy je IGS, respektive jeho části, vhodným molekulárním markerem pro taxonomická studia (Mayer et al. 2006).



Obr. č. 1: Ribozomální DNA jednotka, která kóduje geny pro tři největší ribozomální RNA (18S, 5.8S a 26S). Kódující oblasti jsou odděleny mezigenovými mezerníky (IGS) a geny pro jednotlivé ribozomální podjednotky od sebe navzájem oddělují dva přepisované mezerníky (ITS1 a ITS2), (Chen a Pikaard, 1997)

3.2.3 Molekulární markery v evoluci rostlin

Molekulární markery usnadňují studium genetické informace obsažené v molekulách DNA nebo proteinech. Molekulární markery ve srovnání s jinými typy dat mají několik výhod:

- poskytují informace o genotypu,
- nezávislé na podmínkách prostředí,
- předpoklad selektivní neutrality,
- jsou univerzální,
- jsou snadno od sebe rozeznatelné (Krak 2012).

Univerzální jsou proto, že každý živý organismus obsahuje DNA a bílkoviny. Díky tomu lze zjistit při nedostatku morfologických znaků evoluční vztahy i mezi vzdáleně příbuznými skupinami organismů. Dále molekulární znaky obsahují nesmírné množství informací, dokonce i u organismů, které mají vysoce redukovanou morfologii.

Molekulární znaky jsou diskrétní a jejich specifické pozice jsou velmi dobře definovatelné a snadno od sebe rozpoznatelné na základě:

- DNA sekvencím (složené ze čtyř nukleotidových bází),
- proteinovým sekvencím (složené z 21 aminokyselin),
- studiu tandemově opakujících se DNA oblastí (založené na existenci alel, které se skládají z přesného počtu opakování),
- polymorfie, v místě restrikce analýzy (přítomnost či nepřítomnost pozice rozpoznané specifickou endonukleázou) atd. (Krač 2012).

Není pochyb o tom, že morfologie a fyziologie živých organismů má genetický základ a jejich fenotyp může být ovlivněn dalšími faktory (faktory vnějšího prostředí, genomovými a epigenetickými změnami), které mohou z evolučního hlediska zkreslit výsledky těchto dat (Krač 2012).

Díky různým molekulárním přístupům je možno studovat fylogenezi druhu, nejčastěji sekvenováním DNA. Za pomoci molekulárních markerů, které jsou početné, relativně snadno identifikovatelné a vysoce informativní, je možno zjistit vztahy mezi blízkce příbuznými taxony. Pro zjištění určitého druhu je nejvhodnější použití nekódujících úseků takzvaných vnitřně přepisovaných regionů (ITS - *Internal Transcribed Spacers*). Pro tyto účely je vhodná organelová a jaderná DNA. Nicméně každý z těchto markerů má své výhody a nevýhody, které jsou výsledkem evoluční dynamiky a jejich dědičnosti.

Organelová DNA je nejdéle používaným molekulárním markerem v rostlinné fylogenezi. Nejčastěji se pracuje s chloroplastovou DNA (cpDNA). Hlavním rysem cpDNA je, že se dědí uniparentálně. U vyšších rostlin se ve většině případů cpDNA dědí po matce. Samozřejmě existují výjimky. Například nahosemenné rostliny dědí chloroplastovou DNA po otci, dále se také můžeme setkat s biparentální dědičností např. u *Silene vulgaris*. Charakteristika chloroplastové DNA je:

- uniparentální dědičnost,
- haploidní,
- nedochází k rekombinaci (Krač 2012).

Tím, že nedochází k rekombinaci, se eliminuje intraindividuální variace. Intraindividuální variace snižuje množství vnitrodruhové a intrapopulační variability a také čas fixace cpDNA haplotypů ve srovnání s diploidními a rekombinačními genomy

(Birky 1988). Chloroplastový genom má zachované uspořádání genů a jejich pořadí je obdobné se vzdáleně příbuznými taxony (Olmstead et Palmer 1994, Drouin et al. 2008), což je dobré pro vývoj univerzálních primerů přilehlých k variabilním intronům a intergenovým regionům (Taberlet et al. 1991, Shaw et al. 2005, 2007). Velkou nevýhodou cpDNA je v případě hybridního původu některých zkoumaných taxonů. Což je ve většině případů způsobeno uniparentální dědičností. Tento marker totiž není schopen najít druhého z rodičů (Krač 2012). Nevýhody jako je haploidie, uniparentální dědičnost a nedostatek rekombinace má za následek, že se cpDNA přenáší do dalších generací pouze v jednom kusu - jako jeden lokus. Proto, i když se jedná o nekódující cpDNA oblasti, nelze je považovat za nezávislé zdroje fylogenetické informace. Chloroplastová DNA se spíše využívá ke zjištění geografických cest rostlin než k fylogenezi druhů. Příčinou je introgrese nebo hybridizace některých druhů (Krač 2012).

Jako výhodnější se jeví sekvence nukleárního genomu. Hlavní výhodou proti cpDNA je, že se dědí biparentálně a má vyšší evoluční rychlost (Small et al. 2004). Nejpoužívanější nukleární marker pro fylogenezi je vnitřně přepisovaná oblast (ITS) z nukleárního ribozómu DNA (nrDNA ITS). V letech 1998 a 2003 byl zveřejněn výsledek fylogenetické studie u 66% rostlin pomocí jaderné ribozomální DNA (nrDNA ITS), díky kterým byly zjištěny výhody použití jaderné ribozomální DNA. Důvody popularity nrDNA ITS jsou (Alvarez et Wendel 2003):

- více kopií markeru,
- vysoce konzervativní,
- relativně krátký.

Jaderná ribozomální DNA obsahuje markery s více kopiemi, které jsou přítomny v genomu. Jedná se o stovky až tisíce kopií, které jsou upořádány v jedné nebo ve více tandemově opakujících se oblastí. Z tohoto důvodu je snadná jejich amplifikace. Dalším výhodou je konzervativnost kódujících oblastí přilehlých k ITS, které umožnily navrhnutí univerzálních primerů (White et al. 1990). ITS sekvence jsou relativně krátké (500 – 700 bp), které jsou vhodné pro návrh primerů. Z toho vyplývá, že krátké ITS sekvence jsou snadněji namnoženy pomocí PCR dokonce i z částečně degradovaného či starého materiálu (Alvarez et Wendel 2003).

Jako ostatní genové rodiny (skupiny příbuzných genů) i nrDNA oblasti podléhají spřažené evoluci (concerted evolution). Tím dochází k homogenizaci genů, jejichž

příčinou je nahromadění mutací, které způsobují nerovnoměrný crossing – over a vysokofrekvenční genovou konverzi. Výsledkem je, že téměř všechny opakující se kopie v genomu jsou často geneticky uniformní (Krak 2012). Toto zjištění bylo dlouho považované za hlavní rys nrDNA (Baldwin et al. 1995, Elder et Turner 1995). Nedávné studie ukázaly, že mechanismy (nerovnoměrný crossing – over a genová konverze) nefungují tak přesně, jak se předpokládalo. Spřažená evoluce může být nedokončena nebo může zcela selhat v případě některých hybridů či allopolyploidů. Taková informace může být dokonce výhodná, pokud se jedná o evoluční historii hybridů. Z těchto informací je možné získat hybridní genom obou rodičovských linií. To ale není tak jednoduché, protože se hybridní genom rodičovských kopií může měnit. Jsou prozkoumány tři takovéto situace:

- rodičovské kopie bez změny,
- rodičovské kopie se změnami,
- jedna rodičovská kopie odstraněna.

Faktory ovlivňující zákonitosti spřažené evoluce doposud nejsou dostatečně pochopeny. Zdá se, že je důležité umístění a počet nrDNA, dále také způsob rozmnožování, generační doba a čas od hybridizace (Alvarez et Wendel 2003). U nepohlavně rozmnožujících se taxonů (meióza se považuje za nezbytnou k rekombinaci), u taxonů s dlouhou generační dobou a nedávných hybridů by měla být přítomna kompletní nebo alespoň částečně kompletní nehomogenizovaná rodičovská sekvence. Nehomogenizované sekvence jsou často nalezeny u recentních nebo u mladších hybridů (př. *Tragopogon*). Kompletní homogenizace byla pozorována po několika generacích u nedávných hybridů (*Armeria*), (Krak 2012).

V rostliném genomu by mohl být přítomen více než jeden nrDNA lokus. Počet těchto míst se může lišit dokonce i mezi blízkými příbuznými taxony a mohou být odlišné vzhledem k jejich původu. Některý z těchto míst může být homologický napříč studovaným taxonem. V takovém případě jejich sekvencové variace budou reprezentovat evoluční vztahy mezi organismy, z kterých byly izolovány (tzv. ortologní sekvence). Na druhou stranu některý z těchto míst může být zdvojen, v některých ze studovaných genomů. V takovém případě sekvence neodráží speciální proces, ale zdvojení a podobnost se sekvencemi z jiných taxonů (paralogní sekvence), (Krak 2012).

Podle výše uvedených zkušeností je spřažená evoluce nepředvídatelný proces, který by mohl vážně ovlivnit rekonstrukci fylogenetických vztahů. Zahrnutí paralogních

genů do fylogenetické analýzy může mít za následek chybné odhady taxonomických vztahů (Doyle 1992). Rovněž kompletní homogenizace z jedné rodičovské sekvence může odstranit důležitý důkaz o původu hybridů či speciaci druhů jako cpDNA. Přes všechny tyto nepříjemnosti, ITS zůstává jako cenný zdroj fylogenetických informací (Krač 2012).

Další zdroj markerů pro určení nižší taxonomické úrovně jsou geny s malým počtem opakování („low copy“ LCNG). Tyto markery jsou v nekódujících úsecích (př. intronech) z funkčního proteinu kódovacích genů. LCNG jsou široce užívány, zejména v případech, kde jiné markery (cpDNA, nrDNA) špatně fungují. Často při zkoumání blízkých vztahů nebo při hybridní speciaci. Výhoda LCNG je biparentální dědičnost. Protože geny s malým počtem opakování (v ideálním případě se vyskytuje v genomu jedna jediná kopie) jsou méně náchylné k spřažené evoluci (Small et al. 2004). Vzhledem k obrovskému množství kódujících genů přítomných v rostlinných genomech, představují potenciálně neomezený zdroj markerů. Dalším velmi důležitým rysem je více nepropojených míst, které mohou být použity pro fylogenetické rekonstrukce jako např. hybridizace či linie původu, způsobenou rychlou diverzifikací z polymorfních předků. Na druhou stranu je několik vážných skutečností, které odrazují vědce v použití LCNG markerů. Tím, že jejich evoluční dynamika není uniformní; v různých skupinách rostlin se mohou vyskytovat nezávislé genové duplikace a delece a opis specifického genu může být vysoce variabilní mezi těmito skupinami. Nekódující intronové oblasti nemusí často vykazovat vyšší variabilitu než nrDNA, a proto neobjasní příbuzenské vztahy. Navíc jejich variace se mohou podstatně lišit v různých skupinách, taktéž se může lišit i celková variabilita různých LCNG uvnitř stejné sady vzorků. Kvůli genům s malým počtem opakování, tyto markery v porovnání s nrDNA mohou být citlivé ve větší míře k populačně genetickým procesům (př. genetický drift, selekce), eliminují alely ze studovaného genomu nebo způsobují alelickou ne-monofylii (neúplné linie původu) v rámci druhu. Podle posaných vlastností by LCNG neměly být považovány za univerzální markery (Krač 2012).

Navzdory všem potížím, potenciál LCNG markerů s největší pravděpodobností zůstane bez redukce. Nicméně další snaha v rámci času a financí musí být investována k pilotním studiím, které odhalí evoluční dynamiku (Small et al. 2004). Pilotní studie by měly být založené na malém počtu (raději diploidních) jedinců, kteří pokryjí komplexně

genetickou variabilitu studované skupiny. Fylogeneze založená na nrDNA a cpDNA může dále přispět k analýzám a k interpretaci dat.

3.3 Rod *Chenopodium* (merlík)

3.3.1 Charakteristika rodu *Chenopodium*

Rod *Chenopodium* patří do čeledi laskavcovité (*Amaranthaceae* Juss.). Čeleď *Chenopodiaceae* zahrnuje přibližně 100 rodů a 1700 druhů, které se vyskytují v mírných a subtropických oblastech na obou polokoulích (Kühn et al. 1993). V rodu *Chenopodium* nalezneme více než 135 taxonů (Fuentes-Bazan et al. 2012).

Většinou se jedná o jednoleté byliny rostoucí v aridních nebo v semiaridních oblastech, tolerují i půdy s vyšším obsahem solí. Přes tuto toleranci ve srovnání s jinými rostlinami osidlující suché prostředí, postrádají typickou stavbu těla, která by se dala očekávat v těchto podmínkách. Jako je například list s věčitou parenchymatickou pochvou kolem cévního svazku a mezofylem radiálně uspořádaným kolem věčité pochvy (tzv. Kranz typ) a nepoužívají C4 fotosyntézu, ačkoliv se u jiných druhů čeledi *Amaranthaceae* nachází (Jacobs 2001).

Mnoho druhů rodu *Chenopodium* jsou morfologicky proměnlivé téměř ve všech zkoumaných znacích, což způsobuje řadu taxonomických problémů. Tato fenotypová plasticita se především týká polyploidních druhů *Chenopodium* s. str., která v některých případech může vést ke speciaci. Vysoký stupeň polyploidie je často spojována s hybridizací. Druhy mezi sebou hybridizují se stejnou i různou ploidní úrovní (Fuentes-Bazan et al. 2012). Na tento problém jsou i odlišné názory autorů. Mandák et al. 2012 ve své práci shrnují, že pokud k hybridizaci mezi různými ploidními vůbec dochází, tak velmi vzácně.

Polyploidní původ druhů přírodních populací je velmi složité odhalit (Briggs et Walters 2001). Nejvíce pozornosti se věnuje *Ch. album*, protože v rámci druhu zahrnuje různé ploidní úrovně. Zjištěním evoluce tohoto druhu by pomohlo ke klasifikaci celého rodu. Gangopadhyay et al. (2002) se pokusil objasnit původ hexaploidní formy *Ch. album* za použití *Ch. murale* s dvěma diploidními a jedním hexaploidním zástupcem *Ch. album*. Dle výsledků nejvyšší stupeň podobnosti projevovali diploidní formy *Ch. album* a nejvíce se odlišoval *Ch. murale*. Ačkoliv je *Ch. murale* diploidní, měl větší podobnost s hexaploidem, než s diploidem zástupce *Ch. album*. Na základě toho byla vytvořena hypotéza, že hexaploidní forma vznikla kombinací všech těchto

diploidů. Nejprve došlo k hybridizaci dvou diploidních *Ch. album*, z čehož vznikla dnes neznámá tetraploidní linie, která se pak zkřížila s *Ch. murale*.

Původ *Ch. album* s. str. je přesto stále nejasný. Mandák et al. (2012) na základě experimentálního křížení a průtokové cytometrie odhadovali frekvenci hybridizace mezi druhy s odlišnou polyploidní úrovní. Domnívali se, že *Ch. album* vznikl z diploidního a tetraploidního druhu. Ale tetraploidní původ druhů také není objasněný. Díky pozdější fenologie *Ch. strictum* (na podzim) ve srovnání s diploidními druhy, kteří kvetou v létě, je téměř zřejmé, že nedochází mezi těmito druhy ke křížení. Podle velikosti genomu tetraploidních jedinců, stanovený průtokovou cytometrií, nahrává k tomu, že nevznikli autopolyploidizací diploidních druhů. Dále podle Mandáka et al. (2012) mohou nastat čtyři různé možnosti původu hexaploidních *Ch. album*: (1) splynutí neredukované a redukované gamety dvou diploidních druhů a následná polyploidizace hybridního triploida, (2) hybridizace diploidního druhu s tetraploidním druhem a následná polyploidizace hybridního triploida, (3) splynutí neredukovaných gamet diploidního a tetraploidního druhu a (4) splynutí neredukované a redukované gamety dvou tetraploidních druhů. Porovnávali skutečnou velikost genomu *Ch. album* se spočítanými teoretickými velikostmi genomu, které by měly rostliny vzniklé jednotlivými navrženými možnostmi. Jako nejpravděpodobnější se ukázala možnost křížení diploidního (*Ch. suecicum* nebo *Ch. ficifolium*) a tetraploidního druhu (*Ch. strictum* nebo *C. striatiforme*). Z experimentálního křížení druhů různých ploidních úrovní nezvešli žádní triploidi, proto byly vyloučeny první dvě možnosti. S největší pravděpodobností tedy *C. album* s. str. vzniklo splynutím neredukovaných gamet diploidního a tetraploidních druhu.

U druhů rodu *Chenopodium* podle chromozómových počtů se nejčastěji vyskytuje úroveň diploidní ($2n = 2x = 18$) tetraploidní ($2n = 4x = 36$) a hexaploidní ($2n = 6x = 54$). Typickým diploidním zástupcem je *C. glaucum*, tetraploidním *C. strictum* a hexaploidní *C. opulifolium*. Na základě těchto počtů bylo určeno základní chromozómové číslo $x = 9$. Samozřejmě existují výjimky, jako jsou tetraploidi *C. multifidum* s 32 chromozómy, oktaploid *C. anthelminticum* s 64 chromozómy se základním chromozómovým číslem $x = 8$ (Kolano et al. 2008).

Morfologie

Jak už bylo řečeno, jedná se převážně o jednoleté byliny, zřídka se vyskytují i jako vytrvalé byliny a vzácněji jako keřky. V raném stádiu vývoje bývají hustě pokryté drobnými měchýřkovitými nebo žláznatými chlupy, které mohou být silně aromatické. Nejčastější typ lodyhy je vzpřímený méně pak plazivý. Lodyha je jednoduchá i bohatě větvená, oblá nebo hranatá a může mít podélné barevné pruhy. Mají jednoduché listy obvykle řapíkaté a jejich postavení na stonku je střídavé. Jejich tvary jsou různé: celistvé, celokrajné, zubaté až laločnaté. Květy jsou převážně oboupohlavné umístěné v klubičkách v úžlabí listů, také mohou vytvářet složitá květenství (lichoklasy nebo vidlany). Okvětí je nejčastěji tři až pětičetné, které bývá volné nebo srostlé až k vrcholu. Okvětní lístky jsou tenké, na vnější straně mohou být kýlnaté. Počet tyčinek je (1-) 5, zřídka mohou chybět. Semeník je kulovitý až vejcovitý nebo zploštělý tvaru. Počet blizen je obvykle 2 (- 5). Nažka je zcela anebo částečně uzavřená v okvětí, která je uložena vodorovně nebo svisle. Blanité oplodí má průhlednou až bělavou barvu a je volné či srostlé s osemním. Osemní je hladké nebo s různou charakteristickou skulpturou. Semeno má tvar kulovitý až zploštělý (Hejný et Slavík 1990).

Rod *Chenopodium* je velmi proměnlivý, což je problematické při odlišování jednotlivých druhů mezi sebou. Proto je doporučováno sbírat větší počet rostlin jednoho druhu k posouzení celé variability. Některé druhy se liší tvarem listu i na jedné a téže rostlině. Dokonce některé sterilní rostliny mohou být zaměněny s rodem *Atriplex*. Tyto rostliny jsou morfologicky velmi variabilní ve tvaru listů, morfologií semen, výškou a v mnoha dalších znacích. Nejdůležitějšími rozlišovacími znaky jsou:

- tvar květenství,
- odění,
- morfologie okvětí,
- morfologie plodů,
- tvar listů.

Na základě těchto rozlišovacích znaků, je dobré rostliny sbírat dobře vyvinuté, plodné se zachovalými listy hlavní lodyhy, což bývá problém, protože v době dozrávání plodů jsou většinou opadavé (Hejný et Slavík 1990).

Výskyt a význam

Rod *Chenopodium* je kosmopolitně rozšířen (Hejný et Slavík 1990). Druhy se vyskytují v pobřežních biotopech, v zásaditých nebo slaných biotopech a rudéralech severní a jižní Afriky, Austrálie, Evropy, a Severní a Jižní Ameriky. Obecně je to jeden z nejrozšířenějších synantropních rostlin na světě (Mandák et al. 2012). Ve střední Evropě je často nalezneme na obnažených půdách, na říčních a rybníčných pobřežích, hlavně na ruderálních stanovištích. Jedná se o pionýrský rod, který kromě osídlení stanoviště plní i funkci asanační. Nesnášejí zastínění a není konkurenčně silný proti vytrvalým rostlinám (Hejný et Slavík 1990). V dalších částí světa se merlíci objevují spíše v pouštích, polopouštích a v horských oblastech bohatých na živiny (Chu et al. 2003 in Wu et al. 2003, Clemants a Mosyakin 2003a,b)

S druhy merlíků se hojně setkáme jako s plevelem, například merlík bílý (*Chenopodium album* L.), dále merlík mnohosemenný (*Chenopodium polyspermum* L.), merlík zvrhlý (*Chenopodium hybridum* L.) nebo merlík fikolistý (*Chenopodium ficifolium* Smith), (Fajmon et Simonová 2008). Řada druhů je využívána jako hospodářská plodina: merlík bledý (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), merlík čilský (*Chenopodium quinoa* Willd) a *Chenopodium berlandieri* subsp. *nuttalliae* (Saff.) H. D. Wilson & Heiser (Fuentes-Bazan et al. 2012). Také jistě stojí zmínka o druzích, které se uplatňují v medicíně, například merlík zední (*C. murale* L.) a merlík vonný (*C. ambrosioides* L.). Látky obsažené v těchto merlicích mají antimikrobiální, antimykotické, protizánětlivé, antioxidační, antiparazitické, antivirové, protinádorové, analgetické, diuretické a imunostimulační účinky (Kokanova-Nedialkova et al. 2009).

3.3.2 Taxonomie rodu *Chenopodium*

Taxonomie merlíků je velmi složitá, kvůli jejich proměnlivosti. Na základě výsledků chloroplastové DNA je podčeleď *Chenopodioideae* označována za monofyletickou skupinu (Kadereit et al., 2003; Müller et Borsch, 2005). Naopak rod *Chenopodium* díky fylogenetické studii podle Fuentes-Bazan et al (2012a) je polyfyletickou skupinou.

Taxonomicky je rod *Chenopodium* zařazen podle APG III (2009) do:

kryrosemenných rostlin - **Angiosperms**,

větve: **eudicots**,

větve: **core eudicots**,

řádu: *Caryophyllales* Juss. ex Bercht. et J. Presl (1820),

čeledi: *Amaranthaceae* Juss. (1789).

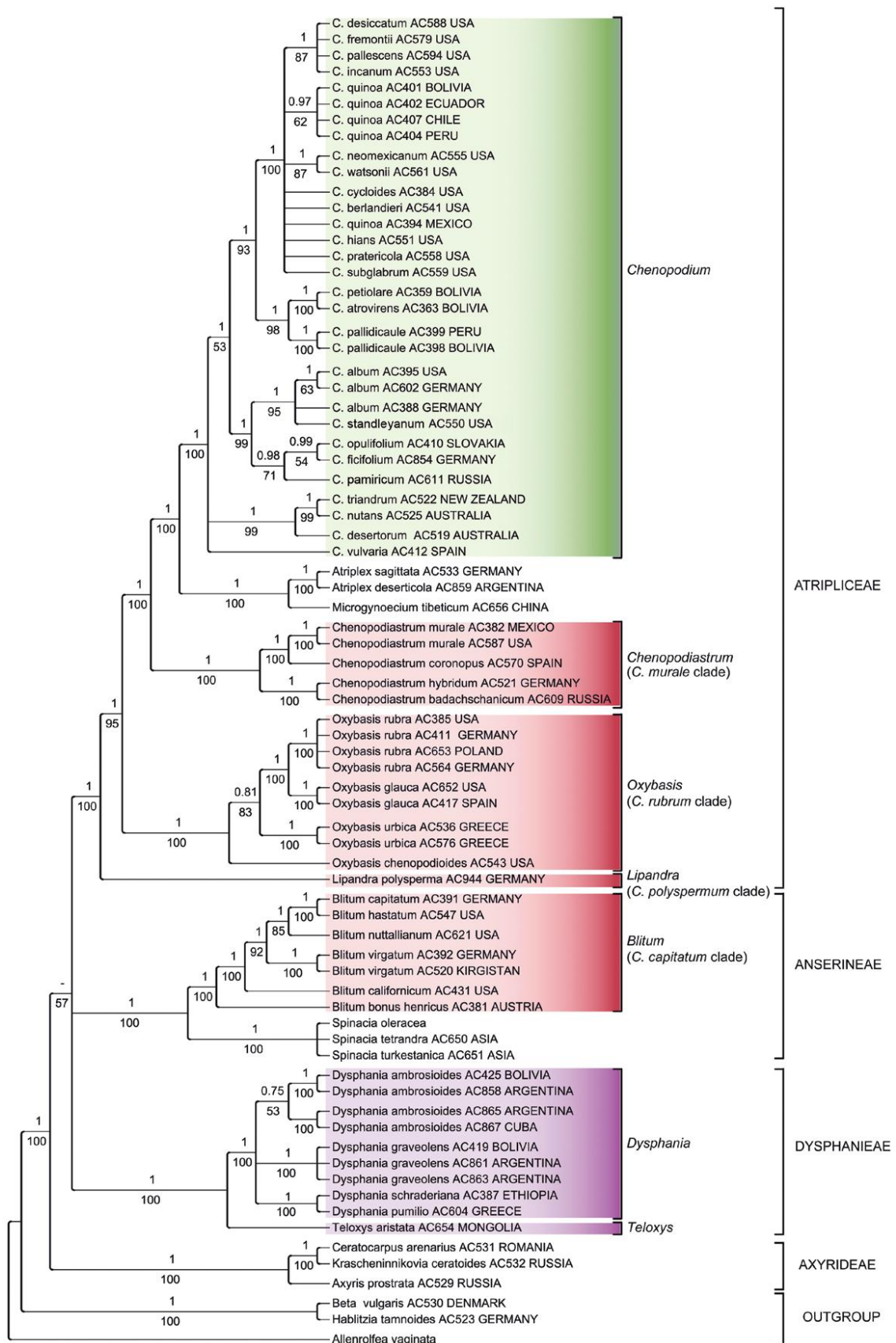
Podle počtu tyčinek, byl rod *Chenopodium* v roce 1753 (Linnaeus) charakterizován dvěma rody *Blitum* L. a *Chenopodium*. Aellen (1960) rozdělil rod *Chenopodium* do 13 sekcí, kam zahrnul i rod *Blitum*. Aellenovo rozdělení rodu bylo jednou z nejkompexnějších prací. Vzhledm k velké morfologické variabilitě rodu postupem času a vývojem různých metod došlo ke změnám v taxonomii.

Během vývoje Scott (1978) rod *Chenopodium* rozšířil o dva podrody *Ambrosia* A. J. Scott a *Chenopodium*, ty dále na šest a devět sekcí. Uotila (2001) člení rod do tří podrodů: *Blitum*, *Chenopodium* a *Ambrosia*. Větší zásah do taxonomie provedl Clemants a Mosyakin (2003). Ty podrod *Blitum* dále rozdělili do pěti sekcí a podrod *Chenopodium* na dvě sekce, z nichž se sekce *Chenopodium* člení do osmi podsekcí. Dále z podrodu *Ambrosia* vyjmuli aromatické druhy merlíků do samostatného rodu *Dysphania*, kterou rozdělili do tří sekcí a ty ještě do tří podsekcí. Na základě molekulární analýzy (Kadereit et al. 2003) byla podčeleď *Chenopodioideae* rozdělena na čtyři větve. Později (Kadereit et al. 2010) byla provedena další analýza, která podčeleď rozřadila do pěti větví: *Atripliceae*, *Chenopodieae* I, *Chenopodieae* II, *Axyrideae* a *Dysphanieae*.

Nejnovější studie podčeledi *Chenopodioideae* rozčlenila do čtyř tribů (*Atripliceae*, *Anserineae*, *Dysphanieae* a *Axyrideae*) na základě velmi podrobné molekulární fylogenetické analýzy (Fuentes-Bazan et al 2012). Podle výsledků bylo zjištěno, že rod *Chenopodium* se skládá ze šesti větví: *Chenopodium* s. str., *Chenopodiastrum* (= větev *C. murale*), *Oxybasis* (= větev *C. rubrum*), *Lipandra* (= větev *C. polyspermum*), *Blitum* (= větev *C. capitatum*) a *Dysphania-Teloxys*. Také bylo zjištěno, že rod *Chenopodium* je parafyletickou skupinou vůči dalším rodům podčeledi *Chenopodioideae*.

Do prvního tribu *Atripliceae* se řadí větev *Atripliceae* s. str., která je reprezentována *Atriplex* L. a *Microgynoecium* Hook. f. *Atriplex* L. a *Microgynoecium* Hook. f. jsou sesterské k větvi *Chenopodium* s. str. *Chenopodiastrum* (= větev *C. murale*) zahrnuje blízké příbuzné druhy *C. murale* a *C. coronopus* a ty mají příbuzenský vztah k *C. hybridum* L. a *C. badachschanicum* Tzvelev. Sesterský ke všem předchozím je *Oxybasis* (= větev *C. rubrum*). Součástí této větve jsou *C. rubrum*,

C. glaucum a *C. urbicum*. Ke všem třem je sesterský *C. chenopodioides*. *Lipandra* (větev *C. polyspermum*) je sesterská k *C. rubrum*, *C. murale*, *Atripliceae* s. str. a *Chenopodium* s. str. Druhý tribut *Anserineae* zahrnuje dvě sesterské linie *Spinacia* a *C. capitatum* L. Ambrosi. Do třetího tribu *Dysphanieae* se člení *Dysphania* a *Teloxys* Moq. Poslední tributem je *Axyrideae*, jehož součástí jsou *Axyris* L., *Ceratocarpus* Buxb. ex L. a *Krascheninnikovia* (Obr. č. 1), (Fuentes-Bazan et al 2012).



Obr. č. 1: Fylogenetický strom podčeledi *Chenopodioideae* založený na molekulární analýze *trnL-F* a *matK/trnK*. Barevná škála zobrazuje jednotlivé větve (Fuentes-Bazan et al 2012b).

3.4 Zkoumané diploidní druhy

Studovanými druhy byli diploidní ($2n = 2x = 18$) jedinci *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum* a jejich možný kříženec *Chenopodium* × *gruelli*.

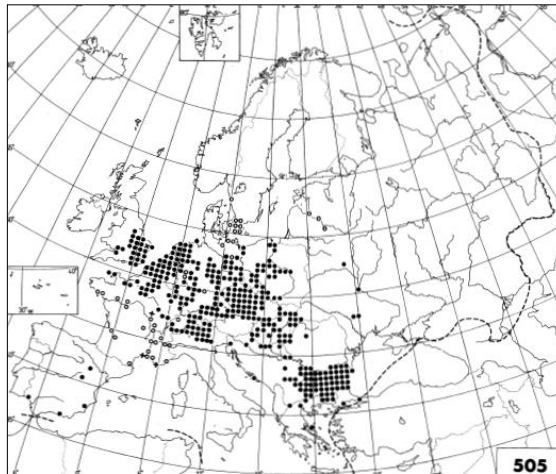
3.4.1 Charakteristika *Chenopodium ficifolium*

Morfologie

Chenopodium ficifolium (merlík fikolistý) je jednoletý pozdní jarní plevelný druh. Lodyha je vzpřímená až vystoupavá, může být 1,5 až 1,7 m vysoká, řídce až hustě větvená, nezřetelně vícehranná. Listy mají barvu světle zelenou, čepel je 2,0 - 2,5(- 4,0) krát delší než široká, úzce kosníkovitá a na přední straně pomoučená. Dolní listy jsou výrazně řapíkaté, trojlaločné s klínovitou bází, postranní úkrojky má kratší než prostřední. Tento postranní úkrojek bývá dlouhý, často úzký se zvlněnými až zoubkatými okraji někdy s celokrajnými. Špičky úkrojků bývají obrácené k hlavní žilce nebo ven. Čepel horních listů bývá řapíkatá, nevýrazně trojlaločná až kopinatá, zubatá až celokrajná a také špičatá. Květenství je bohatě rozvětvené, jedná se o rozvolněnou licholatu s četnými listeny 5 - 20květými klubíčky. Květy jsou malé, v průměru 1,3 - 1,8 mm a pomoučené. Okvětí je do jedné poloviny srostlé. Počet tyčinek je 4 - 5. Plodem je nažka s okrouhlým obrysem. V průměru mají rozměr 0,8 - 1 mm. Na povrchu se nachází blanité oplodí. Po jeho odstranění je semeno lesklé šedočerné až šedohnědé s jemnými dolíčky na povrchu. Osemení odděleně jamkované, každá jamka je čtyř- až mnohoúhelníkovitá s radiálními brázdami či bez nich. Tento druh se rozmnožuje pouze generativně. Kveté od července do září a jedna rostlina na sobě může mít až několik tisíc nažek. Dozrálé nažky vysemení v okolí mateřské rostliny a v dalším roce, po promrznutí půdy, vyklíčí (Hejný et Slavík 1990).

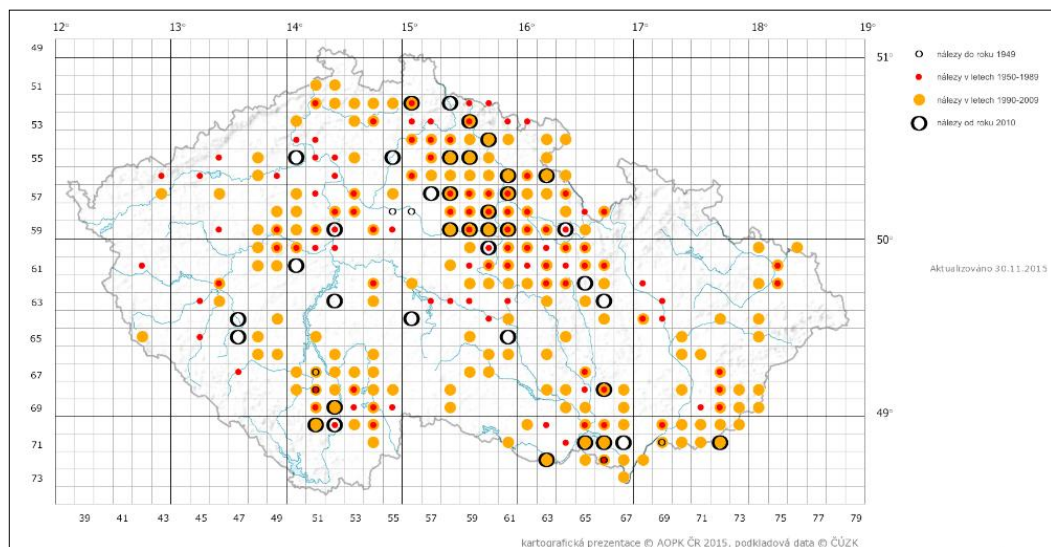
Ekologie

Chenopodium ficifolium je původně rozšířen od jižní Evropy po východní Asii, druhotně se vyskytuje v celé Eurasii a v Severní a Jižní Americe (Obr. č. 2).



Obr. č. 2: Výskyt druhu *Chenopodium ficifolium* v Evropě (Jalas et Suominen 1988).

U nás je hojný v nižších polohách v teplejších oblastech, méně pak na ostatních území (Obr. č. 3). Roste hlavně na ruderalních stanovištích, na okrajích hnojišť, silážních jam, smetištích, okrajích cest, kompostech, polích, zahradách i na obnažených dnech rybníků, v pomalu tekoucích vodách a v terénních depresích apod. Roste převážně ve společenstvech svazu *Sisymbrium officinalis* a v cenózách svazu *Chenopodium glauci* a *Bidention tripartiti*. Preferuje bohaté půdy na amoniakální dusík. Je to méně významný plevelný druh (Hejný et Slavík 1990, www.jvsystem.net).



Obr. č. 3: Mapa výskytu *Chenopodium ficifolium* v ČR (www.portal.nature.cz).

Variabilita

Merlík fikolistý je velmi proměnlivý ve výšce, větvení, velikosti listů, zubatosti okraje listů a ve skulptuře osemení. Podle Aellena jsou rozlišovány dva poddruhy: *Ch. ficifolium* subsp. a subsp. *blominanum*, které jsou původem z Indie a Asie. Poddruh

Ch. ficifolium subsp. je charakteristický znaky: většími, širšími dopředu či ven obrácenými postranními úkrojky listů a osemení s pravidelnými šestihrannými jamkami. Naproti tomu poddruh *Ch. blominanum* subsp. se liší malými ven obrácenými postranními úkrojky a osemení s nepravidelnou skulpturou (Hejný et Slavík 1990).

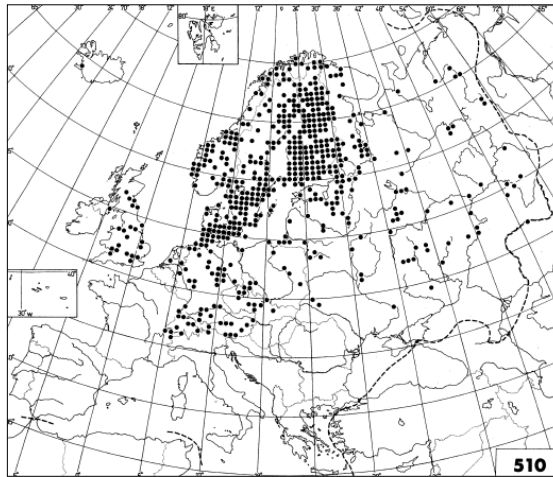
3.4.2 Charakteristika *Chenopodium suecicum*

Morfologie

Chenopodium suecicum (merlík švédský) je jednoletá světlezelená nebo sivozelená bylina, v mládí řídce pomoučená. Lodyha bývá vzpřímená o výšce 0,4 - 0,9 (- 1,30) metrů a je šikmo odstále větvená. Lodyha je nezřetelně vícehranná, rýhovaná, barvu má většinou světle zelenou nebo žlutavou se zelenými až šedozeleými pruhy a na podzim má v paždí listů někdy nachové skvrny. Listy jsou velmi tenké a mohou být řapíkaté, střídavé, nejspodnější někdy vstřícné a oboustranně v mládí pomoučené. Na podzim listy mnohdy červenají nebo žloutnou. Čepel dolních a středních listů je široce vejčítá až kosníkovitá, obvykle slabě trojlaločná s vrcholem tupě špičatým až špičatým a s okrajem nejčastěji hustě a ostře zubatým. Čepel horních listů je úzce kosočtverečná, vejčítá nebo kopinatá. Směrem k vrcholu se listy postupně zmenšují. Horní listy mají tvar zubatý až celokrajný bez postranních úkrojků. Květenství je licholata s krátkými řídkými větvemi, s množstvím drobných řídkých vrcholičnatých stopkatých klubíček a častými jednotlivými květy. Okvětí je do poloviny srostlé. Okvětní lístky jsou vejčité, na vrcholu tupé až tupě špičaté, člunkovitě prohnuté. Obvykle mají světle zelenou barvu s bělavými okraji. V době zralosti semen červenají nebo žloutnou. Na hřbetu jsou kýlnaté až křídlaté. Obsahuje pět tyčinek. Obrys nažek je kruhovitý, na obvodu zaoblený a rozměr v průměru činí 1,1 - 1,4 mm. Nažky jsou uloženy na květním lůžku vodorovně. Tenké oplodí má barvu bělavou nebo žlutavou. Osemení se vyznačuje mělkým paprskovitým ryhováním až zbrázděním (Hejný et Slavík 1990).

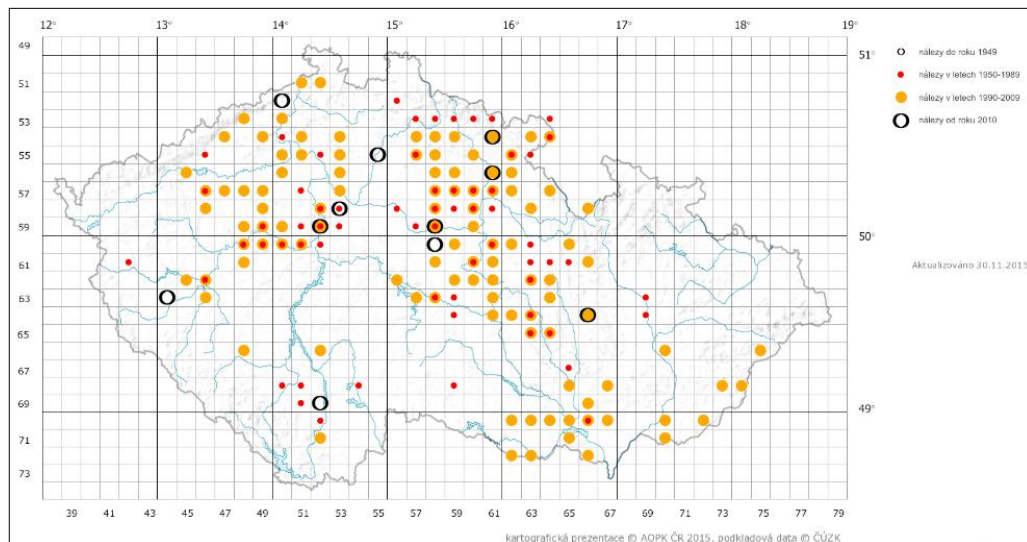
Ekologie

Merlík švédský se vyskytuje v oblastech severní polokoule, převážně v mírném a boreálním pásmu. Osidluje téměř celou Evropu, kromě mediteránní oblasti, kde doposud nebyl zaznamenán. Dalším územím, kde tento druh roste, je na většině Sibíři, na jihovýchodě po ostrov Honšú, ojediněle i v Číně a severozápadně v Severní Americe (Obr. č. 4).



Obr. č. 4: Výskyt druhu *Chenopodium suecicum* v Evropě (Jalas et Suominen 1988).

V České republice roste hojně až roztroušeně v termofytiku a mezofytiku (Obr. č. 5). V horách se vyskytuje spíše ojediněle. Má rád místa obdobně jako merlík fíkolistý. Může být tedy spatřen na ruderalních stanovištích jako je hnojiště, na kompostech, skládkách, v okolí železniční tratě, na okrajích cest, v okopaninách apod. V kulturách se vyskytuje ve společenstvech řádu *Polygono-Chenopodietalia*, mimo kultury zejména ve společenstvech svazů *Sisymbrium officinalis*. Vyhledává půdy hojné na minerály a organické živiny. Nevadí mu ani nadměrně bohaté půdy se čpavkovým dusíkem. (Hejný et Slavík 1990).



Obr. č. 5: Mapa výskytu *Chenopodium suecicum* v ČR (www.portal.nature.cz).

Variabilita

Merlík švédský je velmi proměnlivý druh hlavně ve velikosti a tvaru lodyžních listů. Ve více znacích se projevují změny populace od severu k jihu. Například v jižních

částech areálu se odlišují menšími semeny, zubatějšími a trojlaločnatými listy, někdy dokonce mají v paždí větví červené skvrny. Pro přesnější údaje by bylo vhodné rozmanitost druhu blíže prozkoumat. Svou variabilitou bývá zaměněn s merlíkem bílým (Hejný et Slavík 1990).

4 METODIKA

Experimentální výzkum diplomové práce byl prováděn od dubna 2014 až do srpna 2015 v Botanickém ústavu Akademie věd v Průhonicích. Část výzkumu probíhal na pokusné zahradě v průhonickém areálu Chotobuz a část v laboratořích populační genetiky. Výzkum byl zaměřen na hybridizaci dvou diploidních druhů *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum*.

4.1 Sběr dat

Na tento výzkum byla použita semena *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum* z přírodních populací a semena z dřívějšího experimentu hybridních rostlin. Tato semena byla vypěstována na pokusné zahradě v průhonickém areálu Chotobuz. Na základě semen z přírodních populací a semen z umělé hybridizace byl výzkum rozdělen na dvě skupiny. Třetí skupinu zahrnovaly rostliny sebrané z přírodních lokalit, které se skládaly z druhů *Chenopodium ficifolium*, *Chenopodium suecicum* a *Chenopodium* × *gruelli*. *Chenopodium* × *gruelli* je hybrid vzniklý křížením *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum*. Na základě poskytnutých a sebraných dat jsou tyto tři skupiny níže popsány.

4.1.1 Umělá hybridizace

Výzkum umělé hybridizace byl prováděn roku 2013 na pokusné zahradě v průhonickém areálu Chotobuz doktorem Petrem Vítem. Na jaře roku 2013 se nejprve od semene vypěstovaly pokusné rostliny dvou diploidních druhů (*Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*). Po vypěstování se vybraly čtyři druhy rostlin - dva druhy *Chenopodium ficifolium* a dva *Chenopodium suecicum*. Těsně před tím než vykvetly, se společně tyto druhy zabalily do dvojitého monofilu. Pod monofilem byla vždy jedna rostlina od každého druhu (*Ch. ficifolium* + *Ch. suecicum*). Vzhledem k tomu, že jsou to větrosprašné rostliny, vše ostatní se ponechalo na přírodě. Při sběru semen bylo jasné, že v potomstvu bude mix semen vzniklých křížením a samoopylením mateřské rostliny.

S takto vzniklými semeny jsem následující rok dále pracovala. Semena byla nejprve ručně očištěna a poté dána na vlhký filtrační papír (Obr. č. 6). Očištěná semena v Petriho misce byla vložena k naklíčení do lednice. Semena klíčila (Obr. č. 7) v lednici o teplotě 5 °C. Zpočátku vzorky byly ponechány, za stálého pozorování, v lednici zhruba dva až tři týdny. Postupně podle klíčivosti byly přesazovány do sadbovače na pokusné zahradě. Vždy po přesazení byl zbylý rostlinný materiál vrácen zpět do lednice

a nechal se dále naklíčit. Během klíčení rostliny nebyly přihnojovány, pouze zalévány podle potřeby.



Obr. č. 6: Čištění semen a dávání do Petriho misky.



Obr. č. 7: Klíčení semen v Petriho misce.

Z větších semenáčků pak bylo možné podle morfologických znaků určit, zda se jedná o křížence či nikoliv. Celkem bylo vysázeno 252 klíčků mateřské rostliny *Chenopodium ficifolium*, z nichž se uchytilo 112 semenáčků. Podle morfologie listů možných hybridů bylo přesázeno 25 rostlin. Z mateřské rostliny *Chenopodium suecicum* bylo sazeno 199 klíčků, vyrostlo 75 rostlin. Z těchto semenáčků bylo taktéž podle morfologie listů určeno 69 možných kříženců *Chenopodium suecicum*.

Pro můj další výzkum bylo zapotřebí z vypěstovaných rostlin odebrat listy. Ty byly vkládány do čajových sáčků a každému jedinci bylo přiděleno specifické číslo. Listy v čajových pytlících byly vloženy do plastové krabičky se silikagelem, kde se list vysušil. Silikagel je granulovitá, pórovitá forma oxidu křemičitého, který má schopnost pohlcovat vlhkost. S usušenými listy se dále pracovalo, viz kapitola 4.3.1.

4.1.2 Frekvence výskytu kříženců v experimentálních populacích

Pokus byl uskutečněn pomocí semen sebraných z přírodních populací z roku 2013. Použitá semena *Chenopodium ficifolium* byla sebrána z pěti lokalit a semena *Chenopodium suecium* ze čtyř lokalit. Použitá semena *Chenopodium ficifolium* pocházela z lokalit: Týnec nad Labem, Nový Bydžov, Rejšice, Praha a obec Virt (Slovensko). Semena *Chenopodium suecicum* měla původ z lokalit: Nový Bydžov, Rohovládova Bělá, Rejšice a Švermov.

Příprava semen a jejich klíčků byl stejný, jako je popsáno v kapitole 4.1.1. Celkem bylo do sadbovače vysázeno 2466 rostlin, z toho se jich uchytilo 1081. Velká úmrtnost byla bohužel způsobena silným deštěm, který rostliny zlámal. Když přeživší

rostliny povyroستly, byly podle náhodného i nenáhodného výběru přesázeny do větších květníků a vypěstovány do fáze dospělosti (Obr. č. 8).

Z populace *Chenopodium ficifolium* bylo náhodně vybráno 45 jedinců. DNA analýz se zúčastnilo 21 jedinců. V čisté populaci *Chenopodium ficifolium* z množství 975 rostlin byli podle morfologie listů určení pouze dva možní hybridi z lokality Týnec nad Labem.

Chenopodium suecicum velmi špatně klíčilo a tím se prodloužila doba přesazování. Celkové množství klíčků bylo 244, z toho vyrostlo 106 semenáčků. Podle morfologických znaků zde nebyl rozpoznán ze 106 rostlin žádný možný hybrid a tak do květníků pro další analýzy byli přesázeni pouze 4 jedinci z lokality Švermov.

Všechny rostliny v květnících byly označeny svým specifickým číslem. Každý den byly rostliny kropeny ostřikovačem a občasně je bylo potřeba vyplít. Z jedinců byly opět odebrány listy a vkládány do silikagelu.



Obr. č. 8: Pěstování do fáze dospělosti studovaných druhů.

4.1.3 Frekvence výskytu kříženců v přírodních populacích

Na přelomu měsíců červen, červenec bylo navštíveno pět lokalit v přírodě v okolí Prahy. Sběr probíhal pod odborným dozorem panem Mandákem. Jednotlivé druhy (*Chenopodium ficifolium*, *Chenopodium suecicum* a *Chenopodium* × *gruelli*) byly rozpoznávány podle morfologie listů. Zkoumané druhy (*Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*) jsou od sebe v přírodě morfologicky dobře rozlišené, přičemž kříženec *Chenopodium* × *gruelli* Aellen sdílí morfologické znaky obou rodičů (Aellen 1971–1972). Na každé lokalitě byla snaha nasbírat kolem 50 položek daného druhu. Všechny

nashbírané byliny byly uchovány jako položky. Opět bylo z každého jedince odebráno dohromady 3 až 5 listů z horní, střední a spodní části rostliny. Listy byly dále uchovány stejně, jako je tomu v kapitole 4.1.1.

První lokalitou byla Praha - Bubeneč, Císařský ostrov, kde se rod *Chenopodium* nacházel v okolí mostu, podél řeky a nejvíce v místech, kde byl návoz půdy. Z této lokality bylo sebráno 50 jedinců *Chenopodium ficifolium* a 41 jedinců *Chenopodium suecicum*. Druh *Chenopodium* × *gruelli* nebyl nalezen.

Druhá lokalita byla v Podbořanech, 1,6 km severovýchodně od kostela v obci, kde byl umístěn areál skládky stavebních sutí. Na této lokalitě se nacházelo mnoho druhů rodu *Chenopodium*. Ve velmi malé míře bylo zastoupení *Chenopodium ficifolium*, kde bylo nalezeno pouze 9 rostlin. Mnohem lépe na tom byl druh *Chenopodium suecicum*, celkem 53 položek. V areálu stavebních sutí opět nebyl spatřen druh *Chenopodium* × *gruelli*.

Poblíž Podbořan jsme navštívili další lokalitu, Podbořanský Rohozec. Lokalita se rozprostírala cca 2 km jihovýchodně od kostela v obci na poli na severním okraji rybníka Velký Rohozec. Pole muselo být delší dobu neobdělávané, protože se tu rod *Chenopodium* hojně vyskytoval. Celkem bylo sebráno 50 jedinců *Chenopodium ficifolium* a i *Chenopodium suecicum*. Zde se zadařilo a byl nalezen i hybrid *Chenopodium* × *gruelli*, kterých bylo celkem odebráno 30 položek. Osm nalezených jedinců bylo na lokalitě ponecháno do reprodukční fáze. Rostliny byly označeny, abychom je byli schopni zhruba po měsíci najít a odebrat z nich semena.

Po měsíci byl docela problém vyznačené hybridy nalézt, protože z 0,5 m rostlin vyrostly všechny druhy rodu *Chenopodium* do výšky 1,5 až 2,0 m. Nakonec se podařilo nalézt pět jedinců *Chenopodium* × *gruelli* a jejich semena byla sebrána. Rovněž se z každého jedince odebraly i vzorky listů.

Předposlední lokalita u Vrané nad Vltavou podél silnice k Vranému, přesněji mezi Vraným nad Vltavou a Javorem bylo posbíráno 50 jedinců *Chenopodium ficifolium* a 50 jedinců *Chenopodium suecicum*. *Chenopodium* × *gruelli* byl opět bez nálezu.

Poslední lokalita Hostivice se vyznačovala volnými plochami severně od Nádražní ulice. *Chenopodium* × *gruelli* se zde nevyskytoval. Z druhu *Chenopodium ficifolium* bylo celkem odebráno 46 položek a z *Chenopodium suecicum* 50 položek.

Bylo velmi náročné najít v přírodě hybridy rodu *Chenopodium*, ale nakonec jsme byli úspěšní a já tak mohu dokázat či vyvrátit pomocí DNA analýz, že se *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum* samovolně mezi sebou v přírodě kříží.

4.2 Molekulární markery

Molekulární marker nám na základě analýzy jeho molekul DNA poskytuje informaci o genotypu organismu. Pomocí DNA markerů lze jednoduše detekovat rozdíly v genetické informaci, které jsou součástí sledovaného jedince. Markery tedy vypovídají o genetické podobnosti populací, druhů a jedinců.

4.2.1 Vývoj molekulárního markeru

Pro tento výzkum byl molekulární marker vytvořen v roce 2008 v Botanickém ústavu Akademie věd v Průhonicích. Pro vývoj molekulárního markeru byl použit hybridní jedinec *Chenopodium* × *gruelli* - kříženec druhů *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum*. Nejprve se zjišťovala variabilita v jednom nekódujícím úseku jaderné ribozomální DNA (nrDNA) tzv. intergenetický spacer (IGS nebo nrDNA IGS). Pomocí primerů se amplifikovala část nrDNA IGS u obou druhů merlíků (Obr. č. 9).



Obr. č. 9: Alignment sekvencí nrDNA IGS – sekvence *Ch. ficifolium* je delší o 44 bp než sekvence *Ch. suecicum*.

Pomocí sekvenování se zjistilo, že se oba druhy liší inzercí / delecí o délce 44 párů bází (bp). U jejich kříženců, minimálně u generace F1, by tedy měly být přítomny obě sekvenční varianty, což bylo potvrzeno pomocí PCR a klonováním.

Na základě těchto sekvenčních dat byly určeny nové primery (Obr. č. 10), v blízkosti této inserce / delece (primery ChX195F a ChX243R). Nové primery byly designované proto, aby se zkrátila délka PCR produktu a rozdíl mezi *Chenopodium suecicum* a *Chenopodium ficifolium* byl lépe viditelný (původní délka produktů byla cca 700 bp, s použitím nových primerů cca 230 bp). Produkt u *Ch. ficifolium* má délku 228 bp, u *Ch. suecicum* 184 bp. Experimentální amplifikací několika rostlin od obou druhů a jejich hybridů, bylo zjištěno, že jsou délkové rozdíly dobře viditelné na 2 - 2,5% agarózovém gelu.



Obr. č. 10: Lokalizace primerů ChX195F a ChX423R, používaných k identifikaci hybridů pomocí PCR (černé šipky), šedé obdélníky znázorňují sekvence nrDNA IGS, inserce o délce 44 bp charakteristická pro *C. ficifolium* je znázorněna červeně.

Průběh DNA analýzy v roce 2008

Celkem testovaných vzorků bylo osm, jejichž izolací DNA byla získána DNA jednotlivých jedinců. Optimalizace teploty hybridizace bylo provedeno PCR konkrétního vzorku (-45S-IGS-NOR-F/45S-IGS-NOR-R-). Testovaná teplota se pohybovala okolo 55 - 56 °C. Tímto způsobem byly získány nové primery Primer F (45S-IGS-NOR-F) a Primer R (45S-IGS-NOR-R). Pro otestování primerů pomocí PCR, byly primery naředěny: Primer F (45S-IGS-NOR-F) - 10 µl do 90 µl ddH₂O a Primer R (45S-IGS-NOR-R) - 10 µl do 90 µl ddH₂O (destilovaná, deionizovaná voda). Byl také namíchán deoxyribonukleozidtrifosfát (dNTP) v poměru 10 ul A + 10 ul G + 10 ul C + 10 ul T + 460 ul ddH₂O. Podle množství vzorků, byl smíchán takzvaný „Master Mix“, což je směs pro PCR (více kapitola 4.3.3).

PCR profil: Cycler Eppendorf Gradient (program IGS)

95°C – 3 min	(úvodní delší denaturace)
95°C – 30 s	(denaturace pro každý cyklus)
50°C – 30 s	(zchlazení a nasedání primerů)
72°C – 60 s	(extenze – syntéza DNA)
72°C – 10 min	(finální extenze)
4°C – END	(konec programu)

Celkem bylo opakováno 35 cyklů. Vzorky byly vizualizovány pomocí 1% agarózové elektroforézy. Na gel byly dávány 2µl PCR produktu (testovaných primerů) a 50ng z 50bp DNA ladder (velikostní marker), což je žebřík, který slouží pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů.

4.3 DNA analýzy

4.3.1 Izolace DNA

DNA vzorky byly získány z vlastně nasbíraných a usušených listů z *Chenopodium ficifolium*, *Chenopodium suecicum* a *Chenopodium* × *gruelli*. Vzhledem k většímu množství vzorků byla DNA izolována pomocí kitu DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen), která umožňuje vyizolovat 192 vzorků nejednou. Tyto kity jsou komerčně vyráběné soupravy, které jsou vybavené potřebným materiálem (roztoky a plastickým materiálem). Sada DNeasy Plant Handbook (Qiagen) obsahuje i podrobný manuál. Vzorky byly izolovány podle protokolu Frozen Plant Tissue. Jelikož bylo pracováno s usušenými listy, bod s tekutým dusíkem byl z protokolu vynechán. Do dvou sad zkumavek (2 × 96) byla vložena jedna wolframkarbidová kulička a následně 10 - 15 g rostlinného materiálu. Připravené zkumavky s rostlinným materiálem byly umístěny do homogenizátoru Tisseu Lyseru II (Qiagen), kde došlo k nadrcení listů. Homogenizátor byl nastaven na rychlost 30 Hz přibližně jednu minutu. Pro zahřátí pufru (AP1), který byl součástí sady kitu, byl použit termoblok The Cube Dry Bath Incubator (Thermo Scientific). K oddělení pevného rostlinného materiálu od roztoku byla využita centrifuga Heraeus Multifuge X3R (Thermo Fisher Scientific) s rotorem na 2 × 96 vzorků. V posledním kroku bylo přidáno 2 × 50 µl promývacího AE pufru kvůli většímu výtěžku koncentrace DNA z izolovaných vzorků. Pro zachování vlastností získané DNA, byly vzorky uchovávány v mrazáku při teplotě -20 °C.

4.3.2 Měření a ředění koncentrace DNA

Pro další práci se získanou DNA byla potřeba změřit její koncentrace. K tomu byl použit spektrofotometr NanoDrop 2000 od firmy Thermo Scientific. Aby byla změřena koncentrace DNA, vzorky byly nejprve vyndány z mrazáku do pokojové teploty. Zhruba po deseti minutách byly vloženy do centrifugy Heraeus Multifuge X3R (Thermo Fisher Scientific) s rotorem na 2 × 96 vzorků. Na spektrofotometr byly nanešeny 2 µl pufru AE ze sady DNeasy Plant Handbook, jako standart Blank. Poté byly postupně na něj napipetovávány 2 µl jednotlivých vzorků vyizolované DNA. Po každém měřeném vzorku, byl spektrofotometr očištěn buničinou. V programu NanoDrop 2000 byly vzorky vyhodnoceny a pod svým specifickým číslem uloženy se zjištěnou koncentrací DNA v µl. Podle požadované hodnoty koncentrace DNA byly

vzorky naředěny ddH₂O (destilovaná, deionizovaná voda). Koncentrace byla vypočítána vzorcem:

$$\frac{10 \text{ ng}/\mu\text{l}}{\text{koncentrace DNA } \mu\text{l}} \times \text{objem } 20 \mu\text{l}$$

4.3.3 PCR analýza

Před přípravou roztoků pro PCR byly zkoumané vzorky vyndány z mrazáku a po rozmrznutí krátce centrifugovány v přístroji Centrifuge 5430R (Eppendorf).

Poté byly připraveny roztoky pro PCR. Byl namíchán deoxyribonukleozidtrifosfát (dNTP), což je směs všech čtyř nukleotidů (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin). Tato směs byla připravena do zkumavky Eppendorf tak, že od každého nukleotidu bylo použito 20 μl a přidáno do 920 μl ddH₂O (destilovaná, deionizovaná voda). Používané primery Chx 195 F a Chx 423 R byly také naředěny, v poměru 10 μl Chx 195 F a 10 μl Chx 423 do obsahu 90 μl ddH₂O.

Pro zachování vlastností a funkcí byly všechny potřebné roztoky pro PCR uchovávány v mrazáku (-20 °C). Před použití tedy bylo nutné z mrazáku roztoky vyndat do pokojové teploty. Jednalo se o DNA templát, ddH₂O, pufr, MgCl₂, dNTP a dvojici primerů. Po rozmrznutí roztoků vše probíhalo ve sterilním prostředí ve flowboxu. Podle množství vzorků, byl namíchán takzvaný „Master Mix“, což je směs pro PCR. Tato směs kromě uvedených materiálů (viz výše) obsahuje navíc *Taq* polymerázu.

Příprava „Master Mixu“: do zkumavky Eppendorf bylo napipetováno potřebné množství ddH₂O, pufru, MgCl₂ a dNTP. Zkumavka byla s obsahem vložena do přístroje Vortex Mixer VX-200 (Labnet International, Inc.), který zajistil dostatečné promíchání roztoku. Poté byly přidány naředěné primery ChX 195 F a ChX 423 R a roztok se stočil na malé centrifuze Spectrafuge Mini Centrifuge C1301 (Labnet International). Nakonec do zkumavky byla přidána *Taq* polymeráza. Ta byla po celou dobu v mrazáku, což bylo důležité pro její správnou funkci při PCR. *Taq* polymeráza byla špičkou pipety lehce promíchána v připravovaném roztoku. Přesný obsah „Master Mixu“ pro jeden vzorek je uvedeno v tab. č. 1. Vždy bylo mícháno o 4 vzorky „Master Mixu“ navíc, kvůli možné chybě při pipetování.

Tab. č. 1: Obsah Master Mixu pro 1 vzorek.

<i>Chenopodium</i>	
MM	1x
H ₂ O	14.4
10xbuffer	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	2.5
dNTP (2 mM)	2.5
Primer F (10 μM)	0.5
Primer R (10 μM)	0.5
Taq polymerase (5U/μl)	
Fermentas	0.1
Template (20 ng)	2.0
Reaction Volume	25
template 10 ng/μl (1.0 μl)	

Předposledním krokem bylo do předem připraveného platička multikanálovou pipetou dodat 23 μl „Master mixu“ do každé jamky a poté ještě přidat 2 μl DNA příslušného vzorku. Poslední fází bylo přelepení platička průhlednou slídou a vložení do přístroje Mastercycler Pro S (Eppendorf). Tento programovatelný cykler je schopen rychle měnit teplotu dle nastavení programu.

Program na přístroji Mastercycler Pro S (Eppendorf) byl nastaven:

- 1) 95°C – 3 min (úvodní delší denaturace)
- 2) 95°C – 30 s (denaturace pro každý cyklus) ↘
- 3) 53°C – 30 s (zchlazení a nasedání primerů) → 35x
- 4) 72°C – 30 s (extenze – syntéza DNA) ↗
- 5) 72°C – 10 min (finální extenze)
- 6) END (konec programu)

V prvním bodě je denaturace prodloužena, aby došlo k rozpojení delších fragmentů templátové DNA. V dalších bodech jako templát jsou použity nově namnožené kratší fragmenty. V bodě čtyři je cyklus ukončen a vrací se zpět k bodu dva. V bodě dva, tři a čtyři celkem proběhne 35 cyklů. Výsledkem opakováním cyklů je velké množství kopií fragmentů. O několik minut je delší i poslední krok, který vyloučí výskyt neúplných fragmentů kratší délky. Pro můj experiment byl tento program pro PCR vytvořen odborníky molekulární biologie v Botanickém ústavu Akademie věd v Průhonicích.

4.3.4 Elektroforéza na agarózovém gelu

Agarózový gel může být připraven v různé hustotě, v mém případě byl použit 1,5% - 2 % gel práškové agarózy (SERVA). Vhodná velikost použité elektroforetické vaničky (ELFO) testováním výsledků byla o rozměrech 10×10 (Tab. č. 2). V Erlenmeyerově baňce smíchán poměr směsi práškové agarózy a pufru TAE (Tris-acetate-EDTA), na digitální váze Kern 272 (KERN and Sohn GmbH). Připravená směs byla vložena na několik minut do mikrovlnné trouby. Během zahřívání bylo s roztokem jednou až dvakrát zamícháno. Roztok byl povařen, dokud obsahoval vlákna agarózy. Po vyjmutí z mikrovlnné trouby byl zkontrolován objem gelu, v případě nedostatku byl dolit destilovanou vodou nebo pufrem TAE do požadovaného objemu a zchlazen přibližně na 60°C. Dále do Erlenmeyerovi baňky bylo přidáno 3 – 4 µl, dle velikosti gelu, ethidium bromidu. Dokonale promíchaný gel byl vylit do důkladně omyté elektroforetické vaničky. Vzniklé bubliny v gelu byly odstraněny směrem ke stěnám a co nejdále od slotů, do kterých byly nanášeny vzorky. Do gelu byl následně zanořen elektroforetický hřeben a byl ponechán ke ztuhnutí (cca 15 min.). Mezitím bylo na parafilm připraveno 0,5 µl Loading Dye Solution (Fermentas), který způsobí klesání vzorků ke dnu jamky, do kterého bylo ještě přidáno 3 µl DNA jednotlivých vzorků z PCR reakce. Po ztuhnutí gelu byl elektroforetický hřeben opatrně vysunut a potopen do elektroforetické vany (Clever Scientific, Ltd.) s pufrem TAE. Do vzniklých jamek, které byly zatopené pufrem, byla pipetována směs DNA. První jamka vždy obsahovala velikostní marker GeneRuler 50bp DNA ladder (Fermentas), což je žebřík, který slouží pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů a do druhé jamky byl dáván kontrolní vzorek hybridů. Špičku pipety bylo zapotřebí co nejlouběji zanořit do jamky, aby nedošlo ke kontaminaci se sousedními vzorky. Když byly vzorky připraveny, elektroforéza byla spuštěna připojením ke zdroji (Power supply MP-250V a MP-300V, Cleaver Scientific, Ltd.). Elektroforéza byla nastavena na 30 minut s napětím 120 voltů. Po 30 minutách byl gel vyjmut z elektroforetické vany i vaničky a vložen do UV transluminátoru: InGenious (SynGene). V počítačovém programu GeneSnap (SynGene) byly vzorky na gelu vyexportovány jako obrázek ve formátu jpg. Vzorky byly vidět díky přítomnosti ethidiu bromidu, což je fluorescenční barvivo, které při osvětlení UV zářením zviditelňuje separované fragmenty DNA. Takto byly získané všechny výsledky vzorků.

Tab. č. 2: Potřebné množství 1× TAE pufru (ml) a agarózy (g) na přípravu agarózového gelu při použití odlišných elektroforetických vaniček (ELFO) a odlišné hustotě gelu.

ELFO	1× TAE pufr	Množství agarózy pro přípravu agarózového gelu		
		1%	1,5%	2%
10 × 10 cm	50 ml	0,5 g	0,75 g	1 g

4.4 Morfologická analýza

4.4.1 Tvary listů studovaných druhů

Z experimentálních populací, z každé rostliny, bylo odebráno 3 až 5 listů. Listy byly odebrány z horní, střední a spodní části rostliny, které byly vylisovány. Vylisované listy byly rozděleny podle druhu na tři skupiny *Chenopodium ficifolium*, *Chenopodium suecicum* a *Chenopodium* × *gruelli*. Rozdíly listů každé skupiny byly pomocí skeneru naskenovány. A nakonec pro lepší vizualizaci, byl vytvořen obrázek, kde jsou všechny tři druhy listů jednotlivých jedinců vidět najednou.

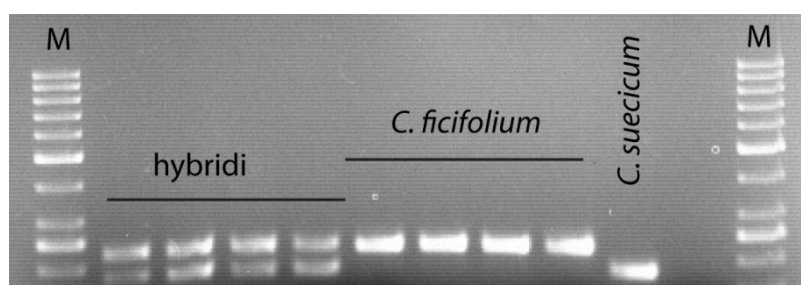
4.4.2 Semena studovaných druhů

Dále podle morfologických znaků byla zkoumána semena přírodních populací *Chenopodium ficifolium*, *Chenopodium suecicum* a *Chenopodium* × *gruelli*. Semena byla pečlivě očištěna a pak sledována pod světelným mikroskopem (stereomikroskop Olympus SZX 12 s barevnou chlazenou digitální kamerou Olympus DP70). Vybraná semena byla následně vyfotografována pomocí programu QuickPHOTO MICRO 2.3 s nastavbou Deep Focus 3.1 od české firmy Promicra, který byl propojen se světelným mikroskopem. Detailnější snímky byly vytvořeny na skenovacím elektronovém mikroskopu FEI Quanta 200 ESEM metodou LV (Low Vacuum) a ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy).

5 VÝSLEDKY

5.1 DNA marker

Při potvrzení hybridních druhů byly na agarózovém gelu zobrazeny dva bands (proužky), což je výsledkem, že se jedná o křížence druhů *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* (Obr. č. 11).



Obr. č. 11: Fotografie agarózového gelu zobrazující výsledky PCR s použitím primerové kombinace ChX195F/423R, M = velikostní standard.

Celkový počet analyzovaných jedinců bylo 600. Z umělé hybridizace z 93 jedinců podle DNA analýz bylo potvrzeno 17 hybridů *Chenopodium* × *gruelli*. Z toho 4 kříženci pocházeli od mateřské rostliny *Chenopodium ficifolium* a 13 hybridů od matky *Chenopodium suecicum*. V přírodních populacích z celkového počtu 480 jedinců bylo analyzováno 35 kříženců *Chenopodium* × *gruelli*. Z 27 vzorků skupiny kříženců experimentálních populací, na základě DNA analýz, nebyli potvrzeni žádní hybridy.

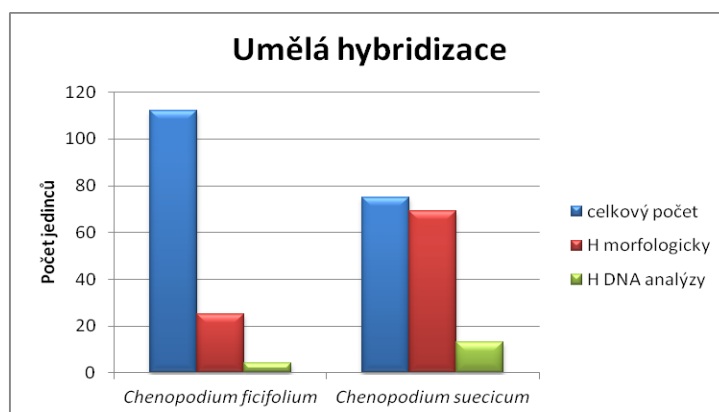
5.2 Umělá hybridizace

Výzkum umělé hybridizace byl prováděn ze čtyř rostlin dvou druhů rodu *Chenopodium*: 2 druhy mateřské rostliny *Chenopodium ficifolium* a 2 druhy rovněž z mateřské rostliny *Chenopodium suecicum*.

Celkem bylo použito 451 semen, z nichž se uchytilo 187 klíčků. DNA analýzu podstoupilo 94 jedinců. Výsledky jsou reprezentovány pomocí grafu umělé hybridizace (Obr. č. 12), který zobrazuje potvrzené hybridy z dvou mateřských rostlin *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum*. Modré sloupce znázorňují, kolik semenáčků vyrostlo v sadbovači. Celkový počet *Chenopodium ficifolium* bylo 112 a *Chenopodium suecicum* 75. Červené sloupce charakterizují možné hybridy obou druhů, kteří byli vybráni na základě morfologie listů ze semenáčků. Počet možných hybridů byl 25 z mateřské rostliny *Chenopodium ficifolium* a 69 z mateřské rostliny *Chenopodium suecicum*. Zelené sloupce pak znázorňují potvrzené křížence, díky provedeným DNA analýzám. Nakonec mateřská rostlina *Chenopodium ficifolium* s *Chenopodium suecicum*

(otec) zplodila 4 hybridy (*Chenopodium* × *gruelli*). Kdežto z mateřské rostliny *Chenopodium suecicum* s *Chenopodium ficifolium* (otec), bylo odhaleno 13 kříženců.

Pokud tyto dvě byliny zkřížíme uměle, dochází ke vzniku jejich kříženců. Podle morfologických znaků bylo vybráno více možných hybridů od matky *Chenopodium suecicum* než od matky *Chenopodium ficifolium*. Tím pádem se mohlo očekávat více hybridů od matky *Chenopodium suecicum*. Matka *Ch. suecicum* se v mém experimentu ochotněji křížila s *Ch. ficifolium*, čímž podporuje vyšší potenciál vzniku hybridů *Chenopodium* × *gruelli*.



Obr. č. 12: Výsledky umělé hybridizace (H morfologicky = hybridů určení podle morfologie listu, H DNA analýzy = hybridů podle výsledků DNA analýz)

Zbýlých 21 jedinců *Chenopodium ficifolium* a 56 jedinců *Chenopodium suecicum* podle DNA analýz vyšli jako čistí jedinci. Je tedy zřejmé, že z mateřské rostliny *Chenopodium ficifolium* opět vznikly druhy *Chenopodium ficifolium* a tak tomu bylo i u druhého druhu.

5.3 Frekvence výskytu kříženců v experimentálních populacích

Populace mateřských rostlin *Chenopodium ficifolium* pocházela z pěti populací. DNA analýz se zúčastnilo náhodně a nenáhodně vybraných 21 jedinců. Nenáhodný výběr se týkal 2 semenáčků z jedné populace (lokalita Týnec nad Labem). Ti se morfologií listů jeví jako kříženci. Ovšem po získání jejich DNA a následnými analýzami se tyto hybridy nepotvrdili. Podle DNA se jednalo o čisté druhy *Chenopodium ficifolium*. Frekvence výskytu z mateřské rostliny ze zbývajících čtyř populací taktéž nepotvrdila žádného křížence.

Druhý druh *Chenopodium suecicum* měl původ ze čtyř populací. Z vybíraných 106 semenáčků se žádný morfologicky neprojevoval jako možný hybrid. Výzkum byl

realizován na 4 jedincích pouze z jedné populace (lokalita Švermov). Hlavním důvodem malého množství rostlin bylo kvůli jejich neochotě naklíčit a tím se zpozdil jejich vývoj a možnost s nimi dále pracovat. Experiment byl tedy proveden pouze se 4 jedinci tohoto druhu. Všichni 4 jedinci vyšli jako čisté populace *Chenopodium suecicum*.

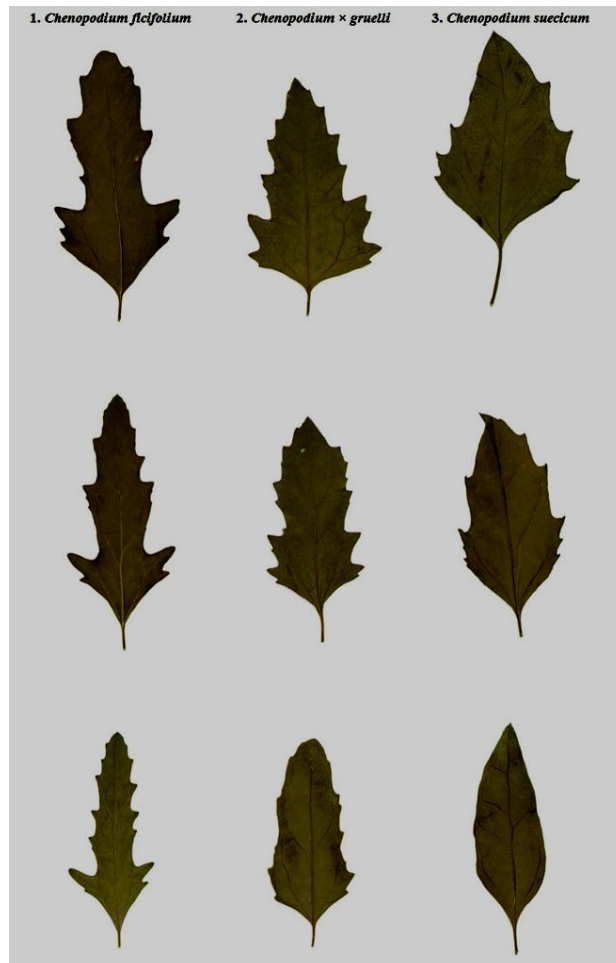
5.4 Frekvence výskytu v přírodních populacích

Celkem bylo navštíveno pět lokalit (viz kapitola 4.1.3). Výsledky první lokality Praha - Bubeneč, Císařský ostrov nezaznamenalo žádného možného hybridu, ačkoliv se zde nacházelo dostatek obou druhů *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum*. I přes množství obou druhů nedošlo ke zkřížení. Na druhé lokalitě se vyskytovalo málo jedinců *Chenopodium ficifolium*, tudíž po provedení DNA analýz se ani tady nepotvrdili hybridy. Je velkým předpokladem, že v důsledku nedostatku jednoho druhu, nemohlo dojít ke zkřížení. Zajímavější byla další lokalita Podbořanský Rohozec. Podle morfologie listů byl nalezen možný hybrid *Chenopodium* × *gruelli*. Těchto hybridů bylo nasbíráno 35 položek. Výsledky DNA analýz, u všech 35 jedinců, skutečně potvrdily, že se jedná o křížence *Chenopodium ficifolium* + *Chenopodium suecicum*. Výsledky zbývajících dvou lokalit, Vraná nad Vltavou a Hostivice, na tom byly obdobně jako první lokalita Praha - Bubeneč, Císařský ostrov. I přes dostatečné množství dvou zástupců *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum*, nebyli potvrzeni hybridy.

5.5 Morfologická analýza

5.5.1 Tvary listů studovaných druhů

Pro lepší představivost byly výsledky porovnávaných listů naskenovány a jednotlivé druhy popsány, jak se od sebe liší tvarem listů na následujícím obrázku č. 13.



Obr. č. 13: Porovnání tvarů listů *Ch. ficifolium*, *Ch. suecicum*, *Ch. × gruelli*

Na obrázku č. 13 jsou zobrazeny tři druhy (*Ch. ficifolium*, *Ch. suecicum* a *Ch. × gruelli*). Každý druh ve sloupci je znázorněn třemi listy z jednotlivé části stonku: ze spodní, ze střední a z horní. První sloupec reprezentuje druh *Chenopodium ficifolium*. Jehož horní čepel listu je řapíkatá, nevýrazně trojlaločná až kopinatá, celokrajná až zubatá a špičatá. Čepel je většinou delší než širší a úzce kosníkovitá. Dolní listy jsou výrazně řapíkaté, trojlaločné, s klínovitou bází. Prostřední úkrojek je výrazně delší než postraní. Dále je úzký a okraje má zvlněné až zoubkaté.

Ve třetím sloupci jsou zobrazeny listy druhu *Chenopodium suecicum*. Na první pohled je vidět rozdíl ve tvaru listů od *Chenopodium ficifolium*. U *Chenopodium suecicum* se čepel dolních a středních listů vyznačuje široce vejčítým až kosníkovitým tvarem, s klínovitou bází a je slabě trojlaločnatý. Okraje jsou hustě až ostře zubaté. Výjimkou jsou horní listy, ty jsou spíše celokrajné, ale rovněž s klínovitou bází.

Uprostřed obrázku mezi listy *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum* se nachází jejich kříženec *Chenopodium × gruelli*. Mezi jednotlivými zástupci druhů

jsou vidět odlišnosti ve tvaru listů. Na obrázku je patrné, že hybrid *Chenopodium × gruelli* získal znaky tvarů listů od obou rodičů. Čepel je vejčité kopinatá až kosníkovitá. Tvar listové báze je klínovitá. Okraje listů jsou nepravidelně zubaté. Horní list je méně zubatý až celokrajný.

Pro potvrzení odlišnosti jednotlivých druhů bylo velmi přínosné si vytvořit obrázek, kde je zachycena a pouhým okem spatřena rozdílnost listů mezi *Chenopodium ficifolium* a *Chenopodium suecicum* a jejich potomkem *Chenopodium × gruelli*.

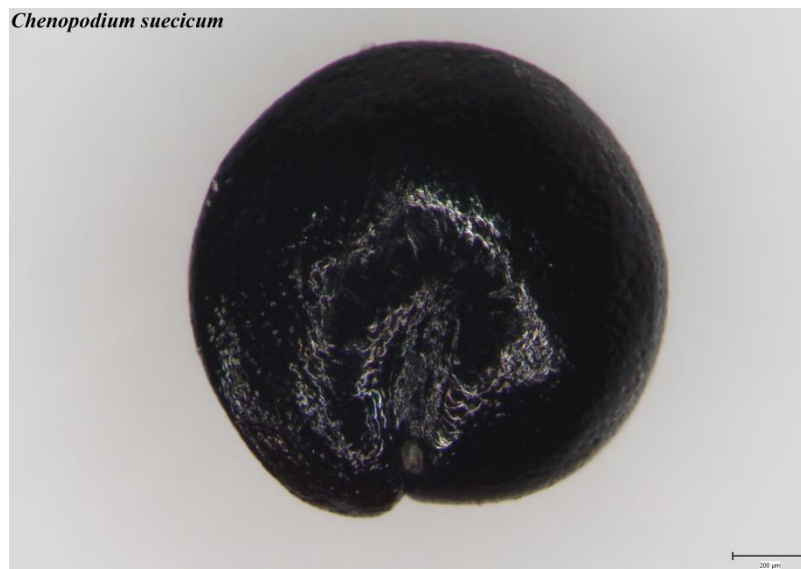
5.5.2 Semena studovaných druhů

Posledním krokem této práce bylo zjistit, zdali se od sebe liší semena zkoumaných druhů s jejich potomkem *Chenopodium × gruelli*. Výsledky byly zobrazeny pomocí fotografií (Obr. č. 14).

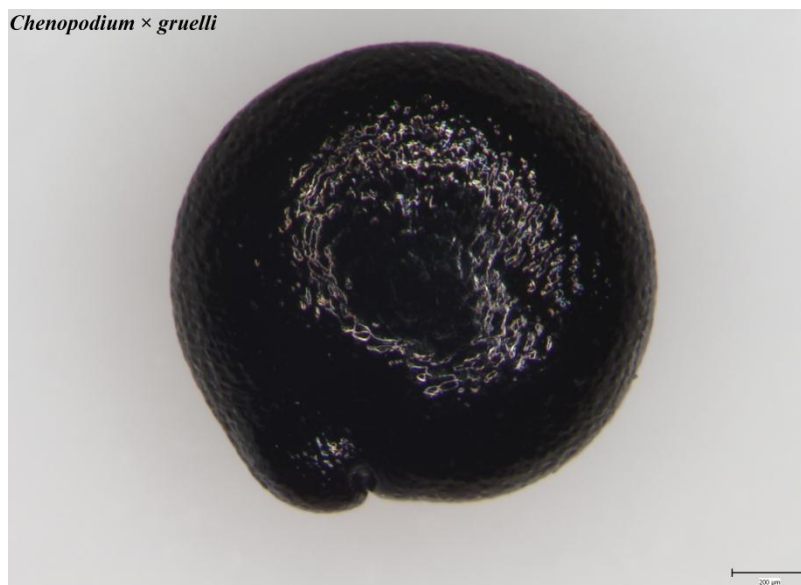
Chenopodium ficifolium



Chenopodium suecicum



Chenopodium × *gruelli*

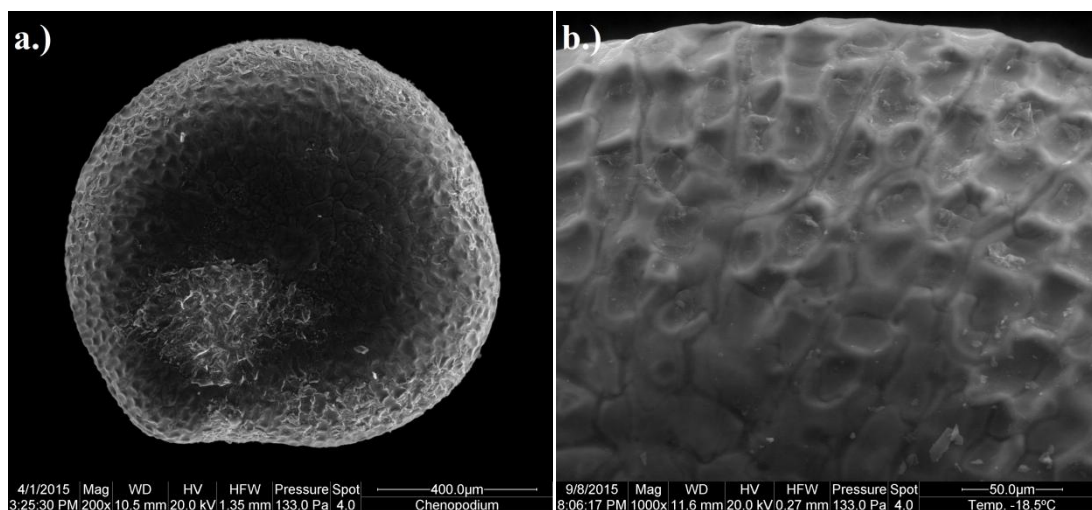


Obr. č. 14: Semena *Ch. ficifolium*, *Ch. suecicum* a *Ch.* × *gruelli*.

Obrázek č. 14 je složen ze tří fotografií semen *Chenopodium ficifolium*, *Chenopodium suecicum* a hybrid *Chenopodium* × *gruelli*. Díky těmto snímkům byly potvrzeny odlišnosti semen jednotlivých druhů podle povrchové struktury semen. První obrázek představuje zástupce *Ch. ficifolium*, na kterém je dobře zachycen hrubý povrch semene. Dalším snímkem je reprezentován zástupce *Ch. suecicum*, který má na rozdíl od *Ch. ficifolium* povrch hladší. Na poslední fotografii je zobrazen hybrid *Ch.* × *gruelli*. Z obrázku je patrné, že tento jedinec je potomkem rodičů *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*, protože opět kombinuje znaky, jako tomu bylo u tvaru listů, obou rodičů. Povrchová struktura semene je hrubší než u rodiče *Ch. suecicum*, ale zároveň je hladší ve s *Ch. ficifolium*.

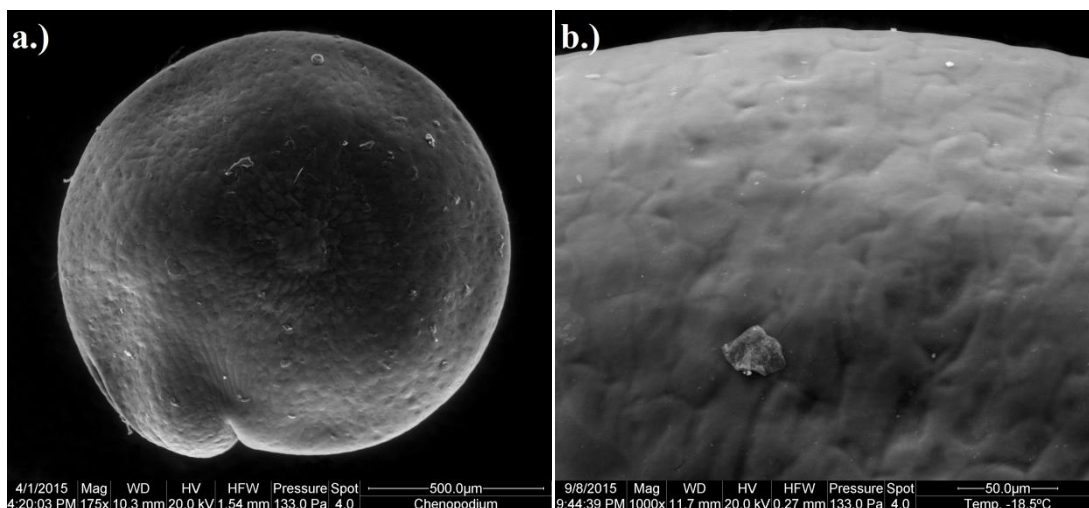
Pro lepší vyobrazení povrchu semen byly dále vyhotoveny detailnější snímky (Obr. č. 15, Obr. č. 16 a Obr. č. 17) jednotlivých druhů. Každý obrázek obsahuje dvě fotografie:

- a.) detail celého semene,
- b.) detail povrchu semene.



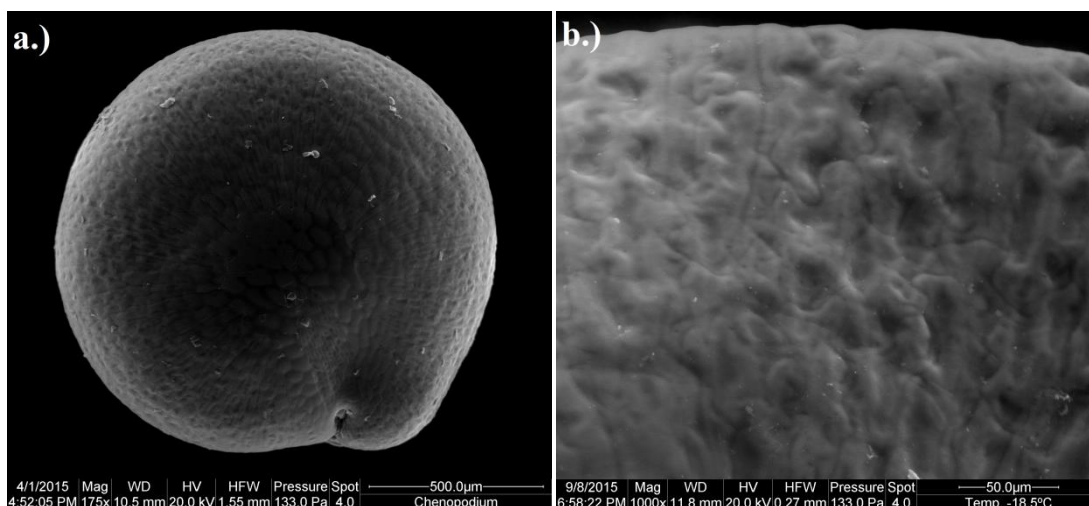
Obr. č. 15: Detail semene *Chenopodium ficifolium*

Na detailnějším snímku (Obr. č. 15) je zachycen povrch semene *Ch. ficifolium*. Povrchová struktura semene na obou fotografiích je složena z hlubokých, pravidelnějších jamek a každá jamka je čtyř- až mnohoúhelníkovitá, s radiálními brázdami nebo bez nich.



Obr. č. 16: Detail semene *Chenopodium suecicum*

Na snímku (Obr. č. 16) je velmi pěkně vykreslen hladký povrch *Ch. suecicum*. Povrch semene je jemně důlkatý, s mělkými paprskovitými až zbrzděnými rýhami.



Obr. č. 17: Detail semene *Chenopodium × gruelli*

Poslední fotografie (Obr. č. 17) jsou reprezentovány hybridem *Ch. × gruelli*. Povrchová struktura semene *Ch. × gruelli* je opět kombinace obou rodičů. Na povrchu jsou vykresleny nepravidelné jamky, které nejsou tak zřetelné jako u *Ch. ficifolium*. Odlišnost hybridu od *Ch. suecicum* je výraznějšími paprskovitými rýhami.

6 DISKUZE

Hybridizace rostlin byla dlouhou dobu podceňována (Arnold 1997). Současné studie ukazují, že přirozená hybridizace hraje důležitou roli v evoluci mnoha rostlin (Allendorf et al. 2001). K hybridizaci dochází asi u 25% všech rostlinných druhů, častěji u vyšších rostlin (Mallet 2007).

K přírodní hybridizaci, k jejímu pochopení, nemálo přispěly experimentální výzkumy křížení. To jak dochází ke křížení v přírodě, jsou jako příklad uvedeny výsledky studia rostlin rodu *Geum*. Jedná se o dva nejrozšířenější druhy Evropy a to *Geum rivale* a *Geum urbanum*. Tyto dva druhy se setkávají v lesích a křovinách, kde dochází k jejich křížení. Druhy se vyznačují ohromnou proměnlivostí od rodičovských druhů. Tento křížence byl pojmenován *Geum intermedium*. V přírodě jsou tyto dva druhy rostlin a i skupiny příbuzných druhů izolačně odděleny, takže nedochází k mezidruhovému křížení. Také oba druhy kuklíků opylují jiní opylovači a může jít o sezónní izolaci. *Geum rivale* v Anglii kvete o tři až čtyři týdny dříve než *Geum urbanum*. Gajewski měl k dispozici semena jedinců z Polska, kde se sice vyskytovaly oba druhy, ale kříženci tu byli vzácní. Tudíž se dá vyvodit, že v Polsku je křížení znemožněno odlišnou dobou kvetením a různými opylovači, při čemž pak nedochází ke genovému toku mezi oběma druhy. Otázkou je, proč tomu tak není i v Anglii? Nejpravděpodobnější příčinou je důsledek lidské činnosti působící na vegetaci. V Polsku se oba druhy nacházejí v pralesní rezervaci, kde je příroda minimálně ovlivněna lidskou činností. Křížence, Gajewski nacházel na okrajích lesních cest, kam se nejspíš rozšířil druh *Geum urbanum* následkem lidským působením. V Anglii *Geum urbanum* roste na narušovaných okrajových biotopech, kde jsou pro tento druh optimální podmínky. Rozdílné působení člověka v Anglii a Polsku mohlo značně ovlivnit četnost hybridů (Briggs et Walters 2001).

Řada druhů rodu *Chenopodium* je velmi variabilní téměř ve všech zkoumaných znacích, čímž způsobují nejasnosti v klasifikaci. Zejména se jedná o polyploidní druhy *Chenopodium* s. str., jejichž vysoká polyploidní úroveň vede k hybridizaci druhů mezi stejnými i různými stupněmi polyploidie (Fuentes-Bazan et al. 2012). Zvláště skupina *Chenopodium album* s rozsáhlou variabilitou a s kosmopolitním rozšířením vyvolává zmatek v taxonomii. Tato skupina je jedna z nejvíce polymorfních druhů rostlin. Mnoho autorů se s touto problematikou zabývalo a stále se zabývá.

Většina autorů této skupiny rozpozná jen několik základních druhů pomocí jejich morfologie a polyploidní úrovní. Přechodné tvary druhů *Chenopodium album* agg. byly obvykle pokládány za hybridní taxony (Uotila 2001). Tyto nevyzpytatelné a abnormální formy *Chenopodium album* agg. byly uvedeny jako kříženci s ostatními druhy i kříženci s mezidruhovými jedinci (Aellen 1960, Uotila 2001, Clemants & Mosyakin 2003).

Je mnoho pohledů a názorů jak se skupina *Chenopodium* mezi sebou a svými druhy kříží. Aellen (1960) dokonce zvažoval, že výskyt hybridních kombinací *Chenopodium album* agg. je v přírodě velmi vzácný. V rámci skupiny popsal 11 hybridních kombinací, ale podíl ustálených kříženců je neznámý. Naopak Dvořák (1983 - 1992) zastává názor, že hybridizace této skupiny je velmi běžná a popsal mnoho hybridních kombinací mezi dvěma i více druhy. Na základě nepodložených experimentálních důkazů je nezbytnost na jeho popsané hybridní druhy a hybridní kombinace nahlížet s opatrností (Dvořák et al. 1983, Dvořák 1989a, 1989b, 1992). Vzhledem k velké fenotypové proměnlivosti téměř všech druhů *Chenopodium album* agg., jejich morfologické podobnosti a schopnosti se rozrůstat na stresujících lokalitách by Dvořákovy kříženci měli spíše náležet k abnormálním formám *C. album* s. str. Další autoři Clements a Mosyakin (2003) diskutovali o morfologické proměnlivosti *C. album* agg. a přítomnosti hybridů z květeny Severní Ameriky. Oni zvažovali, že by hybridizace mohla být důvodem výskytu mnoha záhadných a abnormálních forem této skupiny.

První kdo se pokusil potvrdit hybridizaci experimentálně, byl Cole (1957). Použil jednoduchou metodu cizosprášení mezi druhy *C. album* a *C. suecicum*. Jeho výsledky pokusu ukázaly, že ve většině případů dojde k vyklíčení pylového zrna v pylovou láčku, ale k průchodu pylové láčky do zárodečného vaku nedojde. Také se domníval, že při anemogamii prostorová bariéra, nemá vliv na křížení mezi druhy. Nicméně nedoložil žádný důkaz o křížení druhů ve volné přírodě. Rovněž poukázal na to, že sezónní izolace by při hybridizaci mezi druhy neměla hrát žádnou roli. Ovšem Stace (1975) naznačil, že délka dne by mohla hrát roli při křížení. Konstatoval, že druhy *C. album* a *C. suecicum* jsou rostliny krátkodenní, alespoň v indukci kvetení.

V mé diplomové práci byl výzkum zaměřen na skupinu diploidních druhů *C. ficifolium* a *C. suecicum* vniklé rovněž cizosprášením. Podle morfologie listů byli vybráni možní kříženci, kteří se odlišovali od rodičů *C. ficifolium* a *C. suecicum*.

Z umělé hybridizace se sice nepotvrdili všichni vybraní jedinci jako kříženci, nicméně výsledky DNA analýz ukázaly, že několik jedinců se mezi sebou zkřížilo.

Uotila (1978) po prozkoumání literatury specializovanou na hybridní druhy skupiny *C. album* agg., poukázal na to, že doposud druhy určené jako hybridy, pocházeli ze sekundárních stanovišť a často jeden z rodičů se nacházel mimo jeho přirozený výskyt. Tvrdil, že se mezi sebou mohou křížit pouze dva hexaploidní druhy *C. album* a *C. opulifolium*. Podle něj ostatní druhy determinované jako hybridy převážně náleží do *C. album*. Dále se také zmínil o kříženci uvedeného jako *C. pseudoficifolium* J. Murr., kterého odebral v Rakousku. Tento druh charakterizoval podle morfologie jako kombinaci znaků obou rodičovských druhů *C. ficifolium* a *C. suecicum*. Očividně kvůli nedostatům cytologických a molekulárních analýz nezjistil, zda se může jednat o hybrida mezi dvěma diploidními druhy nebo jestli jde o výjimečného hexaploida z *C. album*. Aellen (1971-1972) rovněž u křížence, který pojmenoval *Chenopodium* × *gruelli* zaznamenal morfologické znaky obou rodičů. Dvořák (1992) zase tvrdí, že *Ch.* × *gruelli* vzniká hybridizací *Ch. ficifolium* a *Ch. pseudoopulifolium* a následně se tento hybrid může křížit s *Ch. pseudostriatum*, jehož potomka nazývá *Ch. subopolifolium*.

Na základě mých výsledků mohu potvrdit, že diploidní druhy *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* se mezi sebou kříží. V mém výzkumu byli kříženci nalezeni v přírodní populaci na lokalitě Podbořanský Rohozec. Jedinci byli v populaci vybráni podle morfologie listů, které kombinovaly znaky obou rodičovských druhů (*Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*). Všichni jedinci odebraní z přírodní populace se pomocí DNA analýz potvrdili jako kříženci. Také byla zjištěna další morfologická odlišnost podle povrchové struktury semen. Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu byl detailně zobrazen povrch semen a opět se ukázalo, že z hlediska morfologie kombinuje znaky obou rodičů.

Rahiminejad et Gornall (2004) zkoumali původ *Ch. album* pomocí flavonoidů přítomné v *Ch. album* a v 15 blízkých příbuzných druzích. Výsledky experimentu ukázaly, že flavonoidy obsažené v diploidních *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* jsou velmi podobné až téměř shodné s profilem hexaploidních jedinců. To znamená, že nejpravděpodobnější předci hexaploidního *Ch. album* jsou právě tyto dva diploidní druhy. Rahiminejad et Gornall (2004) se domnívají, že hexaploidní *Ch. album* vzniklo hybridizací mezi *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* a následnou polyploidizací.

Další experiment by prováděn na základě experimentálního křížení a průtokové cytometrie hexaploidní skupiny *Chenopodium album* s. str. Byla snaha zjistit původ a stupeň ploidie rodičů, ze kterých tato linie vznikla, případně vzniká (není jasné, zda jde o minulou či současnou událost). Podle výsledků by se nejpravděpodobněji mohlo jednat o hybridy mezi diploidními druhy (*Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*) a tetraploidními druhy (*Ch. strictum* a *Ch. striatiforme*). Podle výsledků druhy *Chenopodium* nehybridizují napříč ploidními úrovněmi. Z toho vyplývá, že mnoho hybridních kombinací posaných v literatuře jsou buď extrémě vzácné nebo ve skutečnosti neexistují. (Mandák et al. 2012).

7 ZÁVĚR

Pomocí nekódujícího úseku nrDNA IGS bylo otestováno celkem 600 jedinců (*Ch. ficifolium*, *Ch. suecicum*, *Ch. × gruelli*). Tento molekulární marker velmi dobře fungoval se zkoumanými vzorky DNA a odhalil několik hybridních jedinců, kteří byli potomci rodičů *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*.

Ze skupiny umělé hybridizace bylo vypěstováno do fáze dospělosti 25 jedinců z mateřské rostliny *Ch. ficifolium*, kteří byli vybráni podle odlišnosti od rodičů morfologií listů. Na základě molekulárního markeru nrDNA IGS byli potvrzeni 4 hybridi. Druhý druh *Ch. suecicum*, stejným postupem jako u *Ch. ficifolium*, bylo vybráno 69 možných kříženců. Z tohoto množství se potvrdilo 13 hybridů.

Výskyt kříženců v experimentálních populacích, které byly vypěstovány z čistých populací *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum* za použití molekulárního markeru nrDNA IGS, se neprokázal žádný hybridní jedinec. Ačkoliv podle rozdílnosti listů od rodičů byli vybráni 2 jedinci. Nicméně DNA analýza tyto odlišné formy *Ch. ficifolium* nepotvrdila.

Z pěti přírodních populací (mnou odebraných v terénu) byla analyzována pouze jedna populace s výskytem hybridních jedinců, z lokality Podbořanský Rohozec. Celkem jich bylo odebráno 35, na základě jejich morfologické odlišnosti od rodičů. Všichni tyto jedinci byli prokázáni jako kříženci *Ch. ficifolium* a *Ch. suecicum*. Výskyt hybridů na lokalitě Podbořanský Rohozec, mohl způsobit vliv dobrých podmínek lokality a také stáří neobdělávaného pole.

Bylo také nalezeno několik morfologických znaků diskriminující křížence od obou rodičovských druhů. *Chenopodium × gruelli* kombinuje znaky obou rodičů, jak listy, tak povrchovou strukturou semen. List křížence má čepel vejčité kopinatou až kosníkovitou, tvar listové báze je klínovitá, okraje listů jsou nepravidelně zubaté a horní list je méně zubatý až celokrajný. Charakteristická povrchová struktura semene je jemně hrubá s nepravidelnými mělkými jamkami a s výraznějšími paprskovitými rýhami. V porovnání s jeho rodiči *Ch. ficifolium* má povrchovou strukturu hrubou s hlubokými jamkami a každá jamka je čtyř- až mnohoúhelníkovitá, s radiálními brázdami nebo bez nich, *Ch. suecicum* má hladký povrch s mělkými paprskovitými až zbrázděnými rýhami.

V rámci populace je kříženec *Chenopodium* × *gruelli* často přehlíženým taxonem, především kvůli své morfologické podobnosti, ale i společným výskytem s rodičovskými druhy. Podle prováděného výzkumu lze říci, že frekvence výskytu křížence *Chenopodium* × *gruelli* spíše vzácností, než pravideln.

8 LITERATURA A ZDROJE

Abbott, R. J., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J. E., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C. A., Buggs, R., Butlin, R. K., Dieckmann, U., Eroukhmanoff, F., Grill, A., Cahan, S. H., Hermansen, J. S., Hewitt, G., Hudson, A. G., Jiggins, C., Jones, J., Keller, B., Marczewski, T., Mallet, J., Martinez-Rodriguez, P., Möst, M., Mullen, S., Nichols, R., Nolte, A. W., Parisod, C., Pfennig, K., Rice, A. M., Ritchie, M. G., Seifert, B., Smadja, C. M., Stelkens, R., Szymura, J. M., Väinölä, R., Wolf, J. B., et Zinner, D. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(2), 229–246.

Abbott Barton, N.H. et Hewitt, G.M. 1985. Analysis of hybrid zones. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 16, 113–148.

Adams, K. L., et Wendel, J. F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(2), 135–141.

Aellen, P. (1960). *Chenopodium*. In G. Hegi (Ed.), *Illustrierte Flora von Mitteleuropa 3/2* (pp. 569–659). München: Carl Hanser-Verl.

Aellen, P. (1971–1972). Das vorkommen einer neuen hybride von *Chenopodium ficifolium* Sm. × *Chenopodium viride* L. (*Chenopodium* × *gruellii* Aellen hybr. nov.) in der ČSSR. *Acta Musei Moraviae, Scientiae naturales*, 56–57, 167–170.

Allendorf, F. W., Leary, R. F., Spruell, P. & Wenburg J. K. (2001): The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 613–622.

APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105–121.

Arnold, M. L. (1997). Natural hybridization and evolution. Oxford University Press: New York.

Álvarez I, Wendel JF (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol*, 29, 417–434.

Briggs D. et Walters S. M., (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. Univerzita Palackého, Olomouc, 531 s.

Clemants S. E. et Mosyakin S. L., (2003a): *Chenopodium* L. In: Flora of North America Editorial Committee [ed.]: Flora of North America North of Mexico, vol. 4. Oxford University Press, New York, 559 s.

Clemants S. E. et Mosyakin S. L., (2003b): *Dysphania* R. Brown. In: Flora of North America Editorial Committee [ed.]: Flora of North America North of Mexico, vol. 4.

Cole, M. J. (1957). Variation and interspecific relationships of *Chenopodium album* L. in Britain. *Ph.D. Thesis*. University of Southampton.

- Dostálek, J., Hejný, S., Husák, Š., Schwarzová, T., et Dvořák, F. (1990). *Chenopodium* L. In S. Hejný et B. Slavík (Eds.), *Květena České republiky 2* (pp. 223–265). Praha: Academia.
- Dvořák, F. (1989a). Study of some taxa from the range of *Chenopodium ficifolium* Sm. *Feddes Repertorium*, 100, 455–479.
- Dvořák, F. (1989b). Study on *Chenopodium strictum* agg. *Feddes Repertorium*, 100(9-10), 197–234.
- Dvořák, F. (1992). Study of *Chenopodium subopulifolium* J. Murr emend. D. *Feddes Repertorium*, 103(1-2), 49–69.
- Dvořák, F., Dadáková, B., et Grüll, F. (1983). A contribution to the study of *Chenopodium album* agg. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 18(1), 29–43.
- Fajmon K. et Simonová D., (2008): *Merlíky – opomíjení průvodci našich cest. Živa*, 5, 205-207.
- Fuentes-Bazan, S., Mansion, G., et Borsch, T. (2012a). Towards a species level tree of the globally diverse genus *Chenopodium* (Chenopodiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 359–374.
- Fuentes-Bazan, S., Uotila, P., et Borsch, T. (2012b). A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium* sensu lato, and a tribal rearrangement of Chenopodioideae (Chenopodiaceae). *Willdenowia*, 42(1), 5–24.
- Gangopadhyay, G., Das, S., et Mukherjee, K. K. (2002). Speciation in *Chenopodium* in West Bengal, India. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49, 503–510.
- Gaut, B. S., Doebley, J. F. (1997). DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 6809–6814.
- Gelin, Z., Mosyakin, S.L. et Clemants, S.E. (2003): Chenopodiaceae. *Flora of China*, 5, 351-414.
- Grant, V. (1981) *Plant Speciation* (Columbia Univ. Press, New York), 2nd Ed.
- Hejný S., Slavík B., (1990): *Květena ČR*, díl 2. Academia, Praha, 540 s.
- Hillis DM., Dixon MT., (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol*, 66, 411-453.
- Hilu K. W. (1993): Polyploidy and the evolution of domesticated plants. *American Journal of Botany*, 80, 1492–1499.
- Hulák M., Kašpar V., Flakšhans M. et Linhart O. (2006): Využití molekulárních metod a DNA markerů v genetice ryb - přehled. *Bulletin VÚRH*, 42 (2), 69 – 73.
- Chen, Z. J. (2007). Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 377-406.

- Chen, Z.J. a Pikaard, C.S. (1997). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes and Development*, 11, 2124-2136.
- Chu G., Mosyakin S. L. et Clemeats S. E., (2003): Chenopodiaceae. In: Wu Z. Y., Raven P. [eds.]: Flora of China, vol. 5, Science Press, Beijing, 505 s.
- Jacobs, S.W.L. (2001). Review of leaf anatomy and ultrastructure in the Chenopodiaceae (Caryophyllales). *Journal of the Torrey Botanical Society*, 128, 236-253.
- Kadereit, G., Borsch, T., Weising, K., et Freitag, H. (2003). Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of C4 photosynthesis. *International Journal of Plant Sciences*, 164(6), 959–986.
- Kadereit, G., Mavrodiev, E. V, Zacharias, E. H., et Sukhorukov, A. P. (2010). Molecular phylogeny of Atripliceae (Chenopodioideae, Chenopodiaceae): Implications for systematics, biogeography, flower and fruit evolution, and the origin of C4 photosynthesis. *American Journal of Botany*, 97(10), 1664–1687.
- Knoll A., Vykoukalová Z., (2002): Molekulární genetika zvířat: Metody detekce polymorfizmů DNA genů, Vyd. 1. - Brno Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 100 s. ISBN 80-7157-696-6.
- Kokanova-Nedialkova Z., Nedialkov P. T. et Nikolov S. D., (2009): The genus *Chenopodium*: Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. *Pharmacognosy Review*, 3, 280-306.
- Kolano, B., Siwinska, D., et Maluszynska, J. (2008). Comparative cytogenetic analysis of diploid and hexaploid *Chenopodium album* agg. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 77(4), 293–298.
- Köhler, C., Mittelsten, S. O., et Erilova, A. (2010). The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. *Trends in Genetics*, 26(3), 142–148.
- Krak K., (2012) Molecular phylogeny and evolutionary trends in Hieracium (Asteraceae, Lactuceae), Charles University in Prague, Faculty of Science Department of Botany, disertační práce.
- Kühn, U., Bittrich, V., Carolin, R., Freitag, H., Hedge, I. C., Uotila, P., Wilson, P. G. (1993). Chenopodiaceae. In K. Kubitzki (ed.), *Families and genera of vascular plants*. Vol 2. (pp. 253–281). Berlin: Springer.
- Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature*, 446, 279–283.
- Mayer, C., Schmitz, K.M., Li, J., Grummt, I., Santoro, R. (2006). Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Mol. Cell*, 22, 351–361.
- Mandák, B., Trávníček, P., Paštová, L., et Kořínková, D. (2012). Is hybridization involved in the evolution of the *Chenopodium album* aggregate? An analysis based on chromosome counts and genome size estimation. *Flora*, 207(7), 530–540.

- Müller, K., et Borsch, T. (2005). Phylogenetics of Amaranthaceae Based on *matK/trnK* Sequence Data: Evidence from Parsimony, Likelihood, and Bayesian Analyses. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 92(1), 66–102.
- Pyšek, P., Sádlo, J. et Mandák, B. (2002): Catalogue of alien plants of the Czech Republic. Preslia, Praha, 74, 97-186.
- Rahiminejad, M. R., et Gornall, R. J. (2004). Flavonoid evidence for allopolyploidy in the *Chenopodium album* aggregate (Amaranthaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 246(1), 77–87.
- Ramsey, J. et Schemske D. W. (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic*, 33, 589-639.
- Rieseberg, L. H. (1997). Hybrid Origins of Plant Species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28, 359–389.
- Ritz, C. M., Kohlen, I., Groth, M., Theissen, G. et Wissemann, V. (2011) To be or not to be the odd one out-allele-specific transcription in pentaploid dogroses (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser). *BMC Plant Biol*, 11, 37.
- Řepková J., Relichová J., (2001): Genetika rostlin. 1. vydání Brno: Masarykova univerzita Brno., 269 s. 3489/Př-12/01-17/30. ISBN 80-210-2736-3.
- Sage, R.F. (2002): C4 photosynthesis in terrestrial plants does not require Kranz anatomy. *Trends in Plant Science*, 7, 283-285.
- Scott, A. J. (1978). A review of the classification of *Chenopodium* L. and related genera (Chenopodiaceae). *Botanische Jahrbücher Für Systematik*, 100, 205–220.
- Stace, C. A. (1975). *Chenopodium* L. In C. A. Stace (Ed.), *Hybridization and the flora of the British Isles* (pp. 179–184). London: Academic Press.
- Stace C. (2001): New Flora of the British Isles, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Uotila P. (1977): *Chenopodium strictum* subsp. *Striatiforme* in the Baltic Sea area. *Annales Botanici Fennici*, 14, 199–205.
- Uotila, P. (1978). Variation, distribution and taxonomy of *Chenopodium suecicum* and *C. album* in N Europe. *Acta Botanica Fennica*, 108, 1–35.
- Uotila, P. (2001). *Chenopodium* L. In B. Jonsell (Ed.), *Flora Nordica 2* (pp. 4–31). Stockholm: Swedish Royal Academy of Sciences.
- Uotila P. (2001b): Taxonomic and nomenclatural notes on *Chenopodium* (Chenopodiaceae) for Flora Nordica. *Annales Botanici Fennici*, 38, 95–97.

- Van de Peer, Y., Maere, S., et Meyer, A. (2009). The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nature Reviews Genetics*, 10(10), 725–732.
- Van de Peer, Y., Fawcett, J. A., Proost, S., Sterck, L. et Vandepoele, K. (2009). The flowering world: a tale of duplications. *Trends Plant Sci*, 14, 680-8.
- Wang S., Zhao M., Li T., (2003): Complete sequence of the 10.3 kb silkworm *Attacus ricini* rDNA repeat, determination of the transcriptional initiation site and functional analysis of the intergenic spacer. *DNA Seq*, 14, 95-101.
- Welsh, S.L., Crompton et Steven E. Clemants, S.E. (2003): Chenopodiaceae. *Flora of North America* Vol. 4 Page 258, 268, 302.
- Wendel, J. F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant molecular biology*, 42, 225-249.
- Wilson H (1980): Artificial hybridization among species of *Chenopodium* sect. *Chenopodium*. *Systematic Botany*, 5, 253–263.
- Wilson H, Manhart J (1993): Crop/weed gene flow: *Chenopodium quinoa* Willd. And *C. berlandieri* Moq. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 642–648.