

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Diplomová práce

Adaptivní evoluce hadcové tolerance
u vybraných druhů českých hadcových rostlin

Bc. Markéta Dortová
2011

Školitel: Ing. Milan Štech, PhD.
Konzultant: RNDr. Filip Kolář

Dortová M. (2011): Adaptivní evoluce hadcové tolerance u vybraných druhů českých hadcových rostlin. [The adaptive evolution of serpentine tolerance in selected species of Czech serpentine plants. - Ms. Thesis, in Czech] – 43 pp., Fakulty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Serpentine soils produce specific habitats with extreme edaphic conditions, which are hostile to plant life. They contain high concentrations of nickel and have an unfavorable calcium/magnesium ratio. The effects of Ni and Mg, two factors involved in the infertility of serpentine soils, were studied in *Knautia arvensis*, *Silene vulgaris* and *Galium pumilum* agg. Seedlings from serpentine and non-serpentine populations of three plant groups were grown in solutions with elevated concentrations of Ni, Mg and Ni+Mg. The total root growth, the growth of the tap-root, the number of lateral roots and growth of the longest leaf of plants was measured and compared among serpentine and non-serpentine populations. The serpentine populations showed generally higher tolerance to Ni and Mg stress than non-serpentine populations (suggesting possible adaptive origin of serpentine tolerance in the studied plant groups).

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

.....

V Českých Budějovicích, 28. 4. 2011

Poděkování

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mi pomohli při vytváření této diplomové práce. Především bych chtěla poděkovat Milanu Štechovi a Filipu Kolářovi za jejich pomoc při experimentálním pokusu a psaní diplomové práce, za jejich pevné nervy, pomoc při sběru semen a poskytnutí literárních pramenů.

Velký dík patří Petrovi Kouteckému za pomoc při cytometrických analýzách, Majce Šmilauerové za cenné rady ohledně kořenové soustavy, Janu Lepšovi děkuji za rady při statistickém zpracování výsledků. Dále děkuji paní Bočkové za přípravu roztoků potřebných k hydroponii.

A samozřejmě děkuji své rodině a příteli za psychickou podporu a pochopení během psaní této práce.

Obsah

1. Úvod	1
2. Polyploidizace a její ekologické důsledky	4
3. <i>Knautia arvensis</i>	5
3.1 Rozšíření	5
3.2 Hadcové populace <i>Knautia arvensis</i>	6
4. <i>Silene vulgaris</i>	7
4.1 Rozšíření	7
4.2 Výzkum hadcové tolerance u silenky	7
5. <i>Galium pumilum</i> agg.	9
5.1 Charakteristika studovaných druhů	9
5.2 Hadcové populace	11
5.3 Pravděpodobná historie rozšíření a možné rozdíly v kolonizaci hadcového substrátu komplexu <i>Galium pumilum</i> agg.	12
6. Cíle práce	14
7. Metodika	15
7.1 Průtoková cytometrie	15
7.2 Kultivační experiment	16
7.2.1. Materiál	16
7.2.2 Kultivace	17
7.2.3 Statistické analýzy	18
8. Výsledky	21
8.1 Průtoková cytometrie	21
8.2 Kultivační experiment	22
8.2.1 <i>Knautia arvensis</i>	22
8.2.2 <i>Silene vulgaris</i>	26
8.2.3 <i>Galium</i>	28
9. Diskuse	33
10. Závěr	37
11. Seznam použité literatury	38
Přílohy	

1. Úvod

Rostlinní ekologové a evoluční biologové se již dlouho zabývají vlastnostmi hadcových půd a rostlinnými druhy a společenstvy, které jsou na ně adaptovány a zřetelně se liší od přilehlých, nehadcových půd (LAZARUS et al. 2010). Hadcové půdy poskytují unikátní podmínky pro kolonizaci a růst rostlin a proto představují ideální systém pro studování adaptace a evoluce rostlinných ekotypů (BRATTELER 2006).

Pro rostliny jsou klíčovou vlastností hadcových půd jejich chemické a fyzikální vlastnosti, které pro rostliny fungují jako stresující faktory, na které je nutno se adaptovat. Řada rostlinných druhů má genetické a morfologické vybavení, které jim umožňují překonat tyto nepříznivé enviromentální faktory (WESTERBERGH 1994).

Nepříznivými vlastnostmi hadcových půd je nízký obsah stavebně důležitých prvků (N, K, P), vysoký obsah hořčíku a těžkých kovů (Ni, Co, Cr), nízký poměr vápenatých a hořečnatých iontů, nízká schopnost zadržet vodu (LAZARUS et al. 2010). Díky řídké vegetaci jsou půdy intenzivně osluněné, a proto se mohou přehřívat (DUDIČ et al. 2007) a jsou mnohem sušší (KAZAKOU et al. 2008). Veškeré tyto faktory ovlivňují rostlinný růst.

Aby mohly rostliny na takto extrémních stanovištích přežít musí se výše zmíněným faktorům přizpůsobit. Adaptace rostlin na hadcové půdy mohou představovat například menší vzrůst, redukce velikosti listů a jiných orgánů (KRUCKEBERG 1954), xeromorfní listy, větší rozvoj kořenového systému (FITZSIMONS & MILLER 2010), hustší odění (DUDIČ et al. 2007) atd.

Hadcové ekotypy také mohou být lépe přizpůsobené selektivnímu příjmu některých iontů (LAZARUS et al. 2010). Hadcové rostliny absorbují větší množství vápníku, a méně hořčíku než rostliny z běžných půd (KAZAKOU et al. 2008), a to i když vápník v hadcových půdách je ve velmi malé koncentraci. Adaptace na těžké kovy zahrnuje mechanismus vyloučení („*exclusion*“) nebo chelataci (tvorba neškodných sloučenin navázáním kationtů na jiné látky) (KRUCKEBERG 1984).

Vlastnosti prostředí (hadcových půd) se obvykle nejvýrazněji projeví na kořenové soustavě. Na hadcových půdách rostliny více investují do podzemní části než nadzemní (kořenový systém je rozsáhlejší). Právě kořeny jsou také strukturou, která je v přímém kontaktu s toxickým hadcovým substrátem a představuje bránu příjmu iontů do těla rostliny. Kořenová soustava se proto stala hlavním bodem mého zkoumání. Kromě toho jsem se ale také zabývala, zda i nadzemní část je ovlivněna chemickými vlastnostmi prostředí, ve kterém rostliny rostou.

Na jedné straně hadcové půdy představují unikátní modelový systém pro studium adaptivní evoluce a vzniku specializovaných rostlinných ekotypů. Zároveň však hadcové ostrovy také představují vzácná refugia, na něž se uchyluje řada konkurenčně slabších druhů (BRADY et al. 2005).

Zajímavá situace nastává u rostlinných druhů, které obývají hadcový i „běžný“ nehadcový substrát. V tomto případě je klíčovou otázkou, zda jsou vlastnosti umožňující růst na hadcovém substrátu obecnou vlastností druhu nebo adaptací, která se vyvinula pouze u hadcových populací. Ve skupinách, které rostou na hadcích i mimo ně, je často důležitým mikrospeciačním mechanismem polyploidizace, kdy různé ploidní stupně jsou vázány na různé podmínky prostředí či geografické oblasti (např. EHRENDORFER 1980). Tak tomu je i u polyploidního komplexu *Knautia arvensis* (diploidní a tetraploidní cytotyp) a *Galium pumilum* agg., který zahrnuje druhy *Galium pumilum* (oktaploidní cytotyp) a *G. valdepilosum* (diploidní a tetraploidní cytotyp). Tyto druhy se vyskytují jak na hadcových, tak i nehadcových půdách. U těchto polyploidních komplexů nás zajímala souvislost polyploidizace a hadcové tolerance. V případě *Galium* navíc vyvstávala otázka o možných odlišnostech v přizpůsobení dvou druhů s různými ekologickými nároky. Dál byl vybrán druh *Silene vulgaris* jako diploidní rostlina vyskytující se běžně na hadcovém i nehadcovém substrátu.

Magisterská práce obsahuje rešeršní a praktickou část, která představuje převážnou část práce.

Rešerše je krátce zaměřena na ekologické důsledky polyploidizace, dále na charakteristiky modelových druhů *Knautia arvensis*, *Silene vulgaris* a podrobněji na skupinu *Galium pumilum* agg.

Praktická část magisterské práce obsahuje cytometrická měření *Galium pumilum* a *G. valdepilosum* a kultivační experiment, jehož základem je hydroponická kultivace semenáčků *Knautia arvensis*, *Silene vulgaris*, *Galium pumilum* a *G. valdepilosum* v odlišných roztocích simulujících stresující chemické vlastnosti hadcového substrátu (zvýšený obsah hořčíku, niklu a jejich kombinace) a následné sledování růstové odpovědi rostlin hadcového a nehadcového původu.

Celý kultivační experiment je motivován publikací NYBERG BERGLUND (2003), která se zabývala hadcovou tolerancí u *Cerastium alpinum* ve Skandinávii. V tomto pokusu také byly semenáčky *C. alpinum* pěstovány v roztocích se zvýšením obsahem Ni a Mg. Semenáčkům dále byla měřena délka hlavního kořene, celková délka kořenové soustavy a

pozorováno utváření postranních kořenů. Pokusem bylo zjištěno, že hadcové populace ukázaly vyšší toleranci k Ni a Mg stresu než nehadcové populace.

Zajímalo nás zda i další hadcové druhy (*Knautia arvensis*, *Galium pumilum* *Galium valdepilosum* a *Silene vulgaris*) prokážou toleranci k hadcovému substrátu.

2. Polyploidizace a její ekologické důsledky

Polyploidizace je evoluční proces, při kterém dochází ke zmnožení počtů sad chromozomů (ADAMS & WENDEL. 2005). Je známo, že vznik polyploidů je důležitým speciálním mechanismem a zdrojem biodiverzity, který pomáhá adaptaci a rozsáhlé expanzi (MEIMBERG et al. 2009, OTTO & WHITTON 2000). Vlastní zmnožení počtu chromozomových sad zvyšuje genetickou variabilitu a poskytuje nový genetický materiál umožňující vznik nových vlastností prostřednictvím selekce. Polyploidizační proces navíc následují rozsáhlé genomové přestavby, které dále proměňují vlastnosti nově vznikajících polyploidních linií (LEVIN 2002). Výsledkem je možná zvýšená schopnost adaptace polyploidů k vnějším podmínkám a schopnost kolonizovat nová prostředí (např. oblasti po ústupu ledovce BROCHMANN et al. 2004).

Polyploidní taxony proto mají často vyšší ekologickou amplitudu než jejich diploidní předci (MEYERS & LEVIN 2006). Polyploidi typicky nahrazují své diploidní prototypy v místě a dále se šíří podél ekologických gradientů. To naznačuje, že polyploidi se obvykle šíří z diploidních nik (LEVIN 2002).

Různé ploidní úrovně mohou být adaptované na různé teplotní, světelné či vlhkostní režimy. Například některé tetraploidní druhy jsou více tolerantnější k chladu než diploidní druhy, a oktoploidní druhy mohou být ještě více tolerantnější než tetraploidní (LEVIN 2002). Jiným příkladem ekologické diferenciace plodných úrovní je druh *Dactylis glomerata*. Její diploidní populace rostou převážně v lesích, naproti tomu tetraploidní populace preferují otevřené biotopy (LEVIN 2002). Průzkum ekogeografických vztahů a ploidní úrovně odhaluje, že polyploidi často mají rozsáhlejší pásmo výskytu než jejich diploidní předci. Jedním z příkladů jsou diploidní populace *Galium anisophyllum*, které jsou omezeny na dobře separovaná drobná refugia v jižní a střední Evropě. Naopak tetraploidní populace jsou široce rozšířené ve většině horských oblastí jižní a střední Evropy (EHRENDORF 1958).

Rozdíly mezi diploidními a polyploidními druhy se často projevují i v jejich kompetičních schopnostech. Například LEVIN (2002) uvádí, že u tetraploidní populace *Trifolium pratense* se projevila kompetiční nadřazenost ve směsné kultuře oproti diploidní populaci.

Z textu je patrné, že i ploidní stupeň značně ovlivňuje, kde se daný druh vyskytuje a tedy určuje jeho míru ekologické tolerance. A právě proto se předmětem mé diplomové práce staly polyploidní komplexy *Knautia arvensis* agg. a *Galium pumilum* agg.

3. *Knautia arvensis*

Knautia arvensis (L.) COULTER (chrastavec rolní) je vytrvalá luční bylina z čeledi *Dipsacaceae*. Je to velmi proměnlivý druh, u něhož bylo popsáno množství vnitrodruhových taxonů založených na morfologických odchylkách (např. charakteru členění listů nebo velikosti strboulů) (ŠTĚPÁNEK 1997).

3.1 Rozšíření

Celkový areál zahrnuje severní polovinu Evropy a západní Asii, od západní Evropy po západní Sibiř. Druhotný výskyt je znám na Islandu, Farských ostrovech, v západní části Severní Ameriky a na Dálném východě.

V České republice je druh zastoupen dvěma cytotypy, a to diploidy ($2n = 2x = 20$) a tetraploidy ($2n = 4x = 40$).

Tetraploidní cytotyp, označovaný jako *Knautia arvensis* subsp. *arvensis* (ŠTĚPÁNEK 1997) se vyskytuje v celé České republice od nížin až po podhorské oblasti. Chybí pouze ve vysokých nadmořských výškách a v části jižní Moravy. Tento poddruh roste na sušších mezofilních loukách, pastvinách, na travinatých a křovinatých svazích, náspech, příkopech komunikací a lesních lemech. Zpravidla se vyskytuje na hlubších, často skeletovitých, sušších až čerstvě vlhkých půdách slabě kyselá až zásadité reakce (ŠTĚPÁNEK 1997).

Naproti tomu diploidní cytotyp je na našem území zastoupen třemi morfologicky, ekologicky i geograficky odlišnými jednotkami. Nejhojnější je typ označovaný jako *Knautia arvensis* subsp. *pannonica*, jehož rozšíření je omezeno na teplé oblasti jižní a jihovýchodní Moravy, odkud proniká nížinami a nižšími pahorkatinami na sever až po Ostravsko (KAPLAN 1998, KOLÁŘ et al. 2009). Vyskytuje se na suchých a mezofilních loukách, písčínách, pastvinách, travinatých svazích, příkopech komunikací, lemech křovin a lesů. Roste na hlubších, někdy skeletovitých, sušších až čerstvě vlhkých půdách neutrální až zásadité reakce (ŠTĚPÁNEK 1997).

Další izolované diploidní populace jsou omezeny na reliktní ostrovy uvnitř souvislého areálu tetraploidní *K. arvensis* subsp. *arvensis*. Jednou z izolovaných diploidních populací je *Knautia arvensis* subsp. *pseudolongifolia*, která se vyskytuje pouze na karbonátových skalách v karu Kotelné jámy v Krkonoších (KAPLAN 1998). Tento poddruh roste ve skalních rozsedlinách v rozvolněných subalpínských trávnících, na

okrajích sutí a na skalních teráskách. Půdy jsou tu bohaté na humus, vesměs mělké, skeletovité a obsahují minerálně bohatý bazický podklad.

Diploidní populace označované jako *Knautia arvensis* subsp. *serpentinicola*, se vyskytují v prosvětlených reliktních hadcových borech a na hadcových skalních výchozech. Rostou na dolnokralovických hadcích, v lesích u Starého Ranska a na bavorské lokalitě Woja a společně s tetraploidními populacemi také na mariánskolázeňských hadcích. Společný výskyt diploidů a tetraploidů je znám z lokalit Vlčí hřbet a Planý vrch, samostatně se hadcoví tetraploidi vyskytují na lokalitách Dominova skalka, Křížky a Pluhův Bor (KAPLAN 1998, KOLÁŘ et al. 2009)

3.2 Hadcové populace *Knautia arvensis*

Na území České republiky a v těsně přilehlé části Německa se v oblastech hadcových výchozů nacházejí populace z okruhu *Knautia arvensis*, které se však svými vlastnostmi odlišují od běžných chrastavců (KAPLAN 1998).

Hadcové populace jsou považovány za reliktní výskyty původního diploidního předka, které se mikroevoLucí ve specifických podmínkách hadcového prostředí vyvinuly v typy s vlastní odlišnou morfologií a chováním ve společenstvu. Morfologickou diferenciací je přitom možné pozorovat nejen mezi hadcovými a nehadcovými typy, ale i mezi jednotlivými hadcovými populacemi navzájem, což je zřejmě důsledek jejich separátní evoluční historie (KAPLAN 1998).

Zajímavý je společný výskyt tetraploidních a diploidních populací na Planém vrchu a Vlčím hřbetu ve Slavkovském lese. Tyto hadcové tetraploidní populace jsou fenotypově podobnější ke koexistujícím diploidním populacím než k jejich široce-rozšířeným nehadcovým protějškům (KOLÁŘ et al. 2009). Koexistence diploidních a tetraploidních rostlin ve zmiňovaných dvou hadcových populacích ukazuje, že se může jednat o nezávislý autopolyloidní původ hadcových tetraploidů z jejich diploidních předků (KOLÁŘ et al. 2009). Z toho vyplývá, že hadcoví tetraploidi mohli zdědit svojí schopnost tolerovat hadcové půdy právě od svého diploidního předka.

4. *Silene vulgaris*

Silene vulgaris MOENCH (silenka nadmutá) je vytrvalá bylina z čeledi *Caryophyllaceae*. Je to značně proměnlivý druh zahrnující několik význačnějších typů (ŠOURKOVÁ 2003). Tyto typy (morfortypy) jsou dány prostředím, ve kterém se vyskytují.

4.1 Rozšíření

Celkový areál tohoto druhu je severozápadní Afrika a celá Evropa. Na východě sahá daleko na Sibiř, izolovaně roste v Poamuří a na Kamčatce. Nespojitě se vyskytuje v Malé a Střední Asii a v podhůří Himálaje. Druhotný výskyt je uváděn i ze Severní Ameriky.

Silene vulgaris patří mezi běžné druhy naší flóry, je rozšířena po celém území České republiky od nejnižších poloh až do alpínského stupně. S výjimkou nalezišť na hadcích a horských loukách má výskyt synantropní charakter (ŠOURKOVÁ 2003).

Roste na kamenitých místech, skalních svazích, okrajích cest, silnic a železničních tratí, lomech, často i v travinných porostech v nížinných až horských polohách. Druh se většinou vyskytuje na mělkých, písčitých, štěrkově-písčitých až skeletovitých půdách (ŠOURKOVÁ 2003).

4.2 Výzkum hadcové tolerance u silenky

Nejčastěji uváděnou čeledí hadcových oblastí je *Caryophyllaceae*, a to zejména rody *Silene* a *Cerastium*. Z této čeledi mnoho druhů běžně roste na nehadcových půdách, ale právě často na hadci ukazují odlišnou morfologii (WESTERBERGH 1992). Například ŠOURKOVÁ (2003) uvádí, že rostliny druhu *Silene vulgaris* rostoucí na hadcových půdách jsou charakteristické často poléhavými, poměrně tenkými lodyhami, úzkými listy, v polovině nejširšími a ostře špičatými. BATTELER et al. (2006) zkoumal populace *S. vulgaris* na hadcových půdách a na blízké nehadcové horské louce. Objevil dva různé ekotypy *S. vulgaris*, které se morfologicky odlišují (nejvýrazněji v charakteru větvení a vlastnostech listu).

Morfologické odlišnosti mezi hadcovými a nehadcovými rostlinami byly zaznamenány například i u druhu *Silene dioica* (WESTERBERGH & SAURA 1992, WESTERBERGH 1994), či u *Silene armeria* (LLUGANY et al. 2003).

U rodu *Silene* byly prokázány nejen morfologické odlišnosti na hadcovém substrátu, ale i různé genetické rozdíly mezi hadcovými a nehadcovými rostlinami, především v závislosti na těžké kovy. Tolerance na těžké kovy u rodu *Silene*, hlavně u *Silene vulgaris*, je častým zájmem vědců, kteří se zabývají touto problematikou. Ve většině případů je výzkum zaměřen na genetické předpoklady, které umožňují rostlinám *S. vulgaris* adaptovat se na hadcové půdy, hlavně na vyšší obsah těžkých kovů.

BRATTELER et al. (2002) zjistil, že rostliny pocházející z hadcových oblastí, jsou tolerantnější k niklu než rostliny pocházejících z okolních oblastí. *S. vulgaris* z hadcových populací měly při zvýšeném obsahu niklu rychlejší kořenový růst oproti nehadcovým populacím. To ukazuje, že tolerance *S. vulgaris* k těžkým kovům je geneticky determinována.

BRATTELER et al. (2006) se zabýval genetickou regulací příjmu prvků, které souvisejí s adaptací *S. vulgaris* na hadcové půdy. Pozorovaná genetická architektura ukázala, že prvky potenciálně zahrnuté do adaptace na určité podmínky prostředí jsou kontrolovány několika geny, které se vyvinuly za konzistentní řídicí selekce.

Další výzkumy, například SCHAT & TEN BOOKUM (1993), SCHAT et al. (1992) se spíše zaměřili na toleranci obsahu mědi u *S. vulgaris*. Výsledky také prokázaly, že tato tolerance je geneticky kontrolována několika geny. Hlavní gen umožňuje toleranci bez ohledu na míru tolerance. Další gen řídí úroveň tolerance mezi tolerantními rostlinami. Tyto geny se liší mezi různými adaptovanými liniemi a určují jejich míru tolerance. Specifická tolerance může být ovlivněna různými mechanismy, každý kontrolovaný jinými geny (SCHAT et al. 1992). Rostliny, které jsou tolerantní ke stejným kovům, se mohou značně lišit v charakteru akumulace a alokace těchto kovů, a to i když jsou vystaveny stejné míře působení těžkého kovu (SCHAT & TEN BOOKUM 1993).

VAN HOOF et al. (2001) také zkoumala mechanismy vyšší tolerance k těžkým kovům (především Cu) u *S. vulgaris*. Zjistila, že Cu-tolerance může mít souvislost s proteinovou strukturou metalothioneinu. Metalothioneiny jsou Cys-bohaté cytoplasmatické kov-vázající proteiny, které by mohly chránit buňky proti toxickému efektu mědi při chelataci tohoto těžkého kovu. To bylo potvrzeno i v pokusu ONDROUŠKOVÁ (2010), kde také modelovou rostlinou byla *S. vulgaris*.

5. *Galium pumilum* agg.

Skupina svízelu nejmenšího, *Galium pumilum* agg. (čeleď: *Rubiaceae*) je polyploidní komplex, který je na území České republiky zastoupen čtyřmi druhy: *Galium sudeticum*, *Galium austriacum*, *Galium pumilum* a *Galium valdepilosum*.

Z nich běžněji se můžeme setkat pouze se dvěma druhy: *G. pumilum* a *G. valdepilosum*. Zbylé dva druhy mají v České republice pouze velmi omezený výskyt. Tetraploidní *G. sudeticum* se vyskytuje na hadcích Slavkovského lesa (u obce Prameny a Mnichov) a v ledovcovém karu Krkonoš (Kotelná jáma, Čertova zahrádka, Dolní Rudník) (KRAHULCOVÁ & ŠTĚPÁNKOVÁ 1998). Tetraploidní *G. austriacum* se vyskytuje na jižní Moravě (vápencové skály Pavlovských vrchů) (KRAHULCOVÁ & ŠTĚPÁNKOVÁ 1998).

5.1. Charakteristika studovaných druhů

Galium pumilum MURRAY (svízel nízký)

Galium pumilum je vytrvalá, řídce trsnatá bylina s bohatě větvenými, tenkými kořeny a oddenky. Lodyhy jsou tenké, čtyřhranné, vystoupavé. Některé lodyhy mohou být lysé, jiné však v dolní části různě chlupaté.

Listy uspořádané v 6-8četných přeslenech jsou podlouhle nebo čárkovitě kopinaté, dosti tuhé, zašpičatělé. Okraje listů jsou mírně podvinuté.

Květenství je latovité, bohatě větvené, válcovité až prodlouženě vejcovité. Koruna kolovitá, bílá, členěná téměř až k bázi v ploché, špičaté korunní cípy (ŠTĚPÁNKOVÁ 2000). Plodem rostliny jsou ledvinovitá merikarpia, která jsou tmavě hnědá, lesklá, lysá, s plochými poduškovitými hrbolky na povrchu (obr. 1).

Galium pumilum se vyskytuje jako oktoploidní ($2n = 8x = 88$) a hexaploidní ($2x = 6x = 66$) cytotyp. Jednotlivé cytotypy nelze morfologicky odlišit. Tento druh je značně proměnlivý a byla u něj popsána řada vnitrodruhových taxonů, většinou na úrovni variety nebo formy. Z našeho území jsou známy pouze oktoploidní populace (ŠTĚPÁNKOVÁ 2000).

Tento evropský druh je rozšířený od Británie, Francie přes Německo, Česko a západní Polsko po Rakousko a Maďarsko. Druhotně se vyskytuje na jihu Skandinávie a na Islandu.

Galium pumilum je častý na celém území České republiky vyjma nejvyšších poloh. Roste na subxerofilních travnatých stráních, v rozvolněných porostech světlých lesů a

jejich lemů (zvláště v doubravách, dubohabřinách a borech), na teplých skalnatých stráních a horních hranách údolí. Dále vyhledává osluněné sutě, staré lomy, paseky a meze, též krátkostébelné sušší louky, lada a pastviny. Často se také vyskytuje na druhotných stanovištích (kamenné hráze rybníků, železniční náspy, valy).

Druh roste na sušších, neutrálních až kyselých, minerálně chudých i bohatých půdách různé zrnitosti, často silně skeletovitých, na silikátových a ultrabazických horninách (hadce) většinou chudých vápníkem (ŠTĚPÁNKOVÁ 2000).

Galium valdepilosum H. BRAUN (svízel moravský)

Tento druh opět patří mezi vytrvalé, řídce trsnaté byliny s tenkými, bohatě větvenými kořeny a oddenky. Lodyhy jsou chabé, poléhavé nebo vystoupavé, čtyřhranné a bohatě větvené.

Listy uspořádané v 6-7četných přeslenech jsou úzce kopinaté, zašpičatělé, lysé nebo krátce pýřité, na okrajích podvinuté.

Květenství je latovité, bohatě větvené, široce obvejčité. Koruna kolovitá, bílá, až k bázi členěná v ploché, špičaté korunní cípy. Plodem rostliny jsou ledvinovitá merikarpia, tmavohnědá, lesklá, s nápadnými kuželovitými hrbolky na povrchu (obr. 2).

Galium valdepilosum zahrnuje dva cytotypy - diploidní ($2n = 2x = 22$) a tetraploidní ($2n = 4x = 44$). Tyto dva cytotypy jsou odlišeny jak geograficky (viz níže), tak i morfologicky. Morfologické rozdíly byly zjištěny zejména v rozměrech koruny, merikarpí a listů, nápadný je též odlišný charakter odění lodyh a listů. Diploidní rostliny mají menší korunu, menší plody a listy, lodyha a listy jsou lysé nebo jen řídce chlupaté. Tetraploidi mají zvláště v dolní části rostliny lodyhu a listy hustě chlupaté (ŠTĚPÁNKOVÁ 1997).

Celkové rozšíření druhu je ostrůvkovité s těžištěm výskytu ve střední Evropě (Rakousko, jižní Polsko, Německo, Dánsko, ČR).

Diploidní populace *G. valdepilosum* mají omezené rozšíření a jsou známy pouze z území jihozápadní Moravy a přilehlého Dolního Rakouska (ŠTĚPÁNKOVÁ 1997). Izolované výskyty jsou udávány z jižního Polska (KUCOWA & MADALSKI 1964). Oproti tomu tetraploidi se vyskytují v teplejších oblastech po celém území České republiky a zasahují až do východního Bavorska, středního Německa, jižního Polska a Dánska (EHRENDORFER 1962). Druh roste na suchých kamenitých nebo skalnatých stráních, osluněných sutích, v rozvolněných světlých lesích (nejčastěji dubové, dubohabrové nebo borové).

G. valdepilosum se vyskytuje na vysychavých, mělkých, silně skeletovitých, slabě kyselých až slabě zásaditých, minerálně bohatších, živinami však chudších půdách na bazických (zřídka však na vápencích), ultrabazických (hadce), méně často na silikátových podkladech (ŠTĚPÁNKOVÁ 2000).



Obr. 1: *G. pumilum* (Třísov) - 30x zvětšení



Obr. 2: *G. valdepilosum* (Borovsko) - 30x zvětšení

Druhy *Galium pumilum* a *G. valdepilosum* jsou si velmi podobné. Spolehlivým znakem odlišujícím tyto dva druhy je povrch merikarpií za zralosti plodů (ŠTĚPÁNKOVÁ 2000). *Galium valdepilosum* má na povrchu semena s kuželovitými hrbolky, naproti tomu u *G. pumilum* jsou hrbolky poduškovité (obr. 1, obr. 2).

Pokud nejsou dobře vyvinuty determinační znaky, je ideálním nástrojem k odlišení druhů průtoková cytometrie, která zároveň odliší i cytotypy (GREILHUBER et al. 2007). Tato metoda byla použita i v našem pokusu. Pomocí průtokové cytometrie byl stanoven ploidní stupeň všech sebraných populací.

5.2 Hadcové populace

Tato kapitola se podrobně zabývá *Galium pumilum* a *G. valdepilosum* rostoucím na hadcové půdě v České republice a přilehlých regionech (příloha č. 1, příloha č. 2).

Galium pumilum roste na hadcích v prosvětlených lesích Slavkovského lesa, na Křemžských hadcích v jižních Čechách, u Hvozd'an na Domažlicku, u Raškova na Šumperku a na několika skalních výchozech Českomoravské vrchoviny (u obcí Věžná, Staré Ransko, Polná, Chotěboř) (KRAHULCOVÁ & ŠTĚPÁNKOVÁ 1998).

Tetraploidní *Galium valdepilosum* se hojně vyskytuje na dolnokralovických hadcích u osady Borovsko a také na Křemžských hadcích u Holubova. Ve východním Bavorsku se tento druh nachází na skalních výchozech u obce Erbendorf a v borovém lese u vesnice Woja. Dále byl druh objeven na skalnatých stráních u obce Radunia v Polsku (KUCOWA & MADALSKI 1964).

Diploidní cytotyp *Galium valdepilosum* má svůj výskyt omezen pouze na jižní Moravu, kde byl zaznamenán výskyt na hadcích v borovém lese u obcí Mohelno, Lhánice, Hrubšice a Dukovany. Výskyt zasahuje do Dolního Rakouska, kde byl objeven na hadcové lokalitě u vesnice Aggsbach Dorf (KRAHULCOVÁ & ŠTĚPÁNKOVÁ 1998).

U druhu *Galium pumilum* byly zjištěny morfologické rozdíly (ve tvaru listů, chlupatosti a v celkové výšce) mezi hadcovými a nehadcovými populacemi. Hadcové rostliny jsou menšího vzrůstu, mají kratší internodia, širší listy, lodyhy na bázi chlupatější, květenství méně větvené a listy mají méně hrubé okraje (KRAHULCOVÁ & ŠTĚPÁNKOVÁ 1998). Naproti tomu v případě *G. valdepilosum* nebyly nalezeny žádné speciální hadcové morfotypy. Bylo zjištěno, že ploidní rozdíly ovlivňují morfologii více než hadec, tzn. že výrazné rozdílnosti v morfologii (např. v okvěti, plodu, listu) jsou patrné pouze mezi diploidními a tetraploidními cytotypy (ŠTĚPÁNKOVÁ 1997) (kap. 5.1).

Tento charakter morfologické diference ukazuje pravděpodobně odlišnou cestu adaptivní evoluce u obou druhů. Zatímco v případě mezofilnějšího a konkurenčně zdatnějšího druhu *G. pumilum* je hadec osídlen specifickým hadcovým ekotypem, extrémofilnější *G. valdepilosum* je zřejmě schopné osídlit hadcový substrát bez nutnosti selekce nějakých speciálně adaptovaných typů (ŠTĚPÁNKOVÁ 1997).

5.3 Pravděpodobná historie rozšíření a možné rozdíly v kolonizaci hadcového substrátu v komplexu *Galium pumilum* agg.

Podle hypotéz založených na karyologických, ekologických a chorologických datech vztahených ke geologickým, klimatickým a fytogeografickým procesům v Evropě během čtvrtohor, se nachází evoluční centrum tohoto polyploidního komplexu v hornatých oblastech jihozápadní Evropy (KRAHULCOVÁ & ŠTĚPÁNKOVÁ 1998).

Především nejstarší diploidní druhy, které jsou základem komplexu, prošly hybridizací a polyploidizací, procesy spojenými s kolonizací nových oblastí během období

klimatických změn. Důsledkem toho druhy s nízkým ploidním stupněm (zvláště diploidi) se převážně vyskytují na otevřených reliktních stanovištích s nízkou mírou kompetice a vyznačují se nízkou morfológickou a ekologickou variabilitou (KRAHULCOVÁ & ŠTĚPÁNKOVÁ 1998). Naproti tomu druhy s vyšším ploidním stupněm, které jsou konkurenčně zdatnější, mají tendenci zaujímat rozsáhlejší území a projevují se značnou morfológickou i ekologickou variabilitou (EHRENDORFER 1962).

Příkladem může být právě druh *Galium valdepilosum*, který má nižší ploidní úroveň (diploidní a tetraploidní) než *G. pumilum* (oktoploidní). Proto je pravděpodobně kompetičně slabší a vyskytuje se v otevřené vegetaci na suchých a exponovaných svazích a skalách. Oproti *G. pumilum* upřednostňují i nehadcové populace tohoto druhu stanoviště s nižším poměrem Ca:Mg iontů, tedy podmínky bližší stresujícím vlastnostem hadcového substrátu (KRAHULCOVÁ & ŠTĚPÁNKOVÁ 1998). Naproti tomu oktoploidní *G. pumilum* obývá méně extrémní stanoviště s vyšší mírou kompetice.

6. Cíle práce

Předchozí pilotní experimentální pokus s *Knautia arvensis* zahrnující čtyři populace naznačil, že u tohoto druhu došlo k vývoji hadcově-tolerantních ekotypů (DORTOVÁ 2009). Otázkou však zůstává, zda je tento trend u *Knautia* konzistentní i při zahrnutí většího množství populací a zda i jiné druhy odpovídají na hadcový stresující faktor podobným způsobem. Dalšími modelovými druhy byly proto zvoleny *Silene vulgaris* a dva druhy z polyploidního komplexu *Galium pumilum* agg, u kterých lze podle výsledků předchozích studií a dosavadních znalostí očekávat odlišnosti v míře a způsobu vývoje tolerance na hadcový substrát. S využitím kultivačních experimentů bych ráda zodpověděla následující otázky:

- Je tolerance na hadcové půdy u *Knautia arvensis* vlastností všech hadcových populací?
- Vyvinuly se adaptační mechanismy na nepříznivé faktory hadcových půd i u běžných diploidních druhů rostlin, jako je *Silene vulgaris*?
- Probíhala adaptivní evoluce v komplexu *G. pumilum* agg. různými cestami? Liší se míra tolerance mezi jednotlivými druhy?
- Jsou na hadcové podmínky „preadaptovány“ i nehadcové populace *G. valdepilosum*? Došlo u mezofilnějšího *G. pumilum* ke vzniku specializovaných hadcových ekotypů z netolerantních nehadcových populací?
- Koreluje stupeň ploidie s hadcovou tolerancí u dvou komplexů *K. arvensis* a *G. valdepilosum*?

7. Metodika

7.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (anglicky *flow cytometry*, FCM) patří mezi moderní a perspektivní metody používané v současnosti v základním i aplikovaném výzkumu mnoha biologických oborů (SUDA 2005). Celkový rozsah jejích aplikací je značně široký a pokrývá například stanovení obsahu jaderné DNA, určení ploidie, analýzu buněčného cyklu, studium genové exprese atd.

Principem FCM je měření optických vlastností izolovaných částic. Analyzované částice jsou buněčná jádra a měřenou charakteristikou je intenzita fluorescence barviva (fluorochromu), specificky se vázajícího na DNA.

FCM má dvě hlavní výhody. První výhodou je, že velký počet vzorků může být vyhodnocen ve velmi krátké době, která dělá výsledky statisticky silné a reprezentativní pro populace (GREILHUBER et al. 2007). Druhá výhoda představuje schopnost detekce smíšených vzorků (umožňující určení jader rostlin s různým obsahem DNA). Kromě těchto dvou hlavních výhod jsou dalšími výhodami možnost analyzovat širokou škálu pletiv a nedestruktivnost (potřeba nepatrného množství pletiva).

Naopak nevýhodou je, že je potřeba čerstvý materiál. Avšak pro méně náročné cytometrické postupy (např. určování ploidie) je často možné využít i herbářové položky nebo pletiva rychle vysušená v silikagelu (KOLÁŘ 2007).

V našem případě byl průtokovou cytometrií stanoven ploidní stupeň zástupců všech sebraných populací *Galium pumilum* agg. Pomocí průtokové cytometrie se tak podařilo zjistit rozšíření cytotypů jednotlivých druhů. Cytometrická analýza proběhla v laboratoři molekulární biologie rostlin PŘF JU.

Pro stanovení ploidie studovaného druhu je nezbytné používat standardy (= materiál se známým počtem chromozomů nebo určenou velikostí genomu) (SUDA 2005). Na základě poměru intenzity fluorescence zkoumaného materiálu a standardu tak můžeme usuzovat na vlastnosti neznámého objektu. V našem případě jako standard byl použit *Glycine max* a jako fluorescenční barvivo byl použit 4',6'-diamidino-2-fenylindol (DAPI).

Příprava suspenze pro FCM a následné vyhodnocení probíhá velmi rychle. Postup při naší analýze vypadal zhruba následovně: ze studované rostliny se odebrala část

neporušeného pletiva (několik lístků svíce), ta se vložila do Petriho misky obsahující vychlazený hypotonický izolační roztok (Otto I) a standard (*Glycine max*) a pomocí ostré žiletky byla pečlivě rozsekána. Složení izolačního roztoku sleduje dva základní požadavky, jimiž je omezení činnosti nukleáz a zajištění ochrany a neporušenosti jader (SUDA 2005). Pak byla vzniklá suspenze přefiltrována, čímž došlo k odstranění zbytků pletiv. Do květy byl dále přidán pufr obohacený o fluorescenční barvivo (Otto II) a roztok izolovaných jader byl připraven k měření. Výsledkem analýzy měření ploidie byl histogram.

7.2 Kultivační experiment

Experimentální pokus probíhal od roku 2010 v klimaboxu na katedře Botaniky PřF JCU. Předmětem byla hydroponická kultivace semenáčků *Knautia arvensis*, *Silene vulgaris*, *Galium pumilum* a *Galium valdepilosum* v roztocích s odlišnou koncentrací vybraných iontů, které simulovaly nepříznivé podmínky hadcových půd.

7.2.1 Materiál

Semena *Knautia arvensis*, *Silene vulgaris*, *Galium pumilum* a *Galium valdepilosum* použité v pokusu byly sbírány jak na hadcových, tak nehadcových lokalitách České republiky, v případě *K. arvensis* i na jedné lokalitě na Slovensku a *G. valdepilosum* i na jedné lokalitě v Německu. Semena byla sbírána tak, aby každý druh a každá ploidní úroveň (u *G. valdepilosum* a *K. arvensis*) byly zastoupeny dvěma populacemi hadcového a dvěma populacemi nehadcového typu. Celkem bylo nasbíráno 8 populací *Knautia arvensis* (2x, 4x), 6 populací *Silene vulgaris*, 8 populací *Galium valdepilosum* (4x, 2x) a 4 populace *Galium pumilum* (8x). Přesné lokality jsou uvedeny v příloze č. 2.

Celý pokus probíhal za konstantních podmínek klimaboxu při teplotě 18°C a dvanácti hodinách světla.

Pro naklíčení byla semena vyseta na navlhčený filtrační papír do Petriho misek. Filtrační papír byl v průběhu klíčení navlhčován podle potřeby.

Pro vlastní pokus bylo připraveno 32 tmavých nádob (1,5 l pro *Knautia*, 300 ml pro *Silene*, 1 l pro *Galium*), do kterých byly umístěny polystyrenové kruhové plováky s 8 otvory pro *Knautia*, 6 otvory pro *Silene* a 12 otvory pro *Galium*. Do plováku byly pinzetou umístěny naklíčené rostliny (semenáčky staré 23 dní u rodů *Knautia* a *Galium* a 17 dní u rodu *Silene*) a plováky byly poté umístěny do nádoby nejprve se standardním roztokem a

později do experimentálních roztoků s různými koncentracemi a kontroly. Přesné koncentrace roztoků se zvýšenými prvky jsou uvedeny níže v tabulce 1.

Na začátku (před změnou roztoků) a na konci pokusu bylo použito posuvné měřítko na měření délek listů a kořenů, fotoaparát a skener na zachycení celého kořenového systému. Fotodokumentace byla snímána na černém podkladu u *Knautia* a na bílém podkladu u *Galium* a *Silene*, v konstantní vzdálenosti fotoaparátu 20 cm. Fotografie a skeny kořenů dále posloužily ke změření délky hlavního kořene, stanovení počtu postranních kořenů a zjištění celkové délky kořenové soustavy.

Fotodokumentace byla pořízena, protože rostliny nebylo možno šetrně z plováku vyjmout, aniž by se poškodily. Na konci pokusu bylo již možné kořeny naskenovat, protože byla oddělena nadzemní a podzemní část rostliny.

Tab. 1: Stresující roztoky pro testování tolerance rostlin

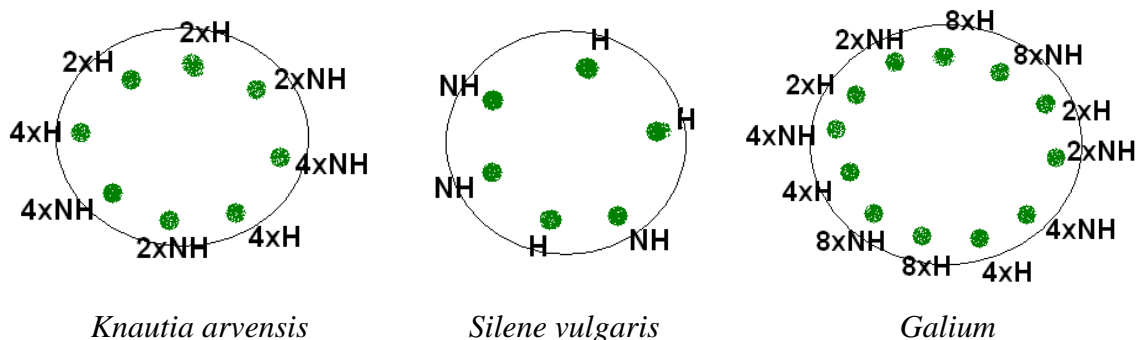
	Standardní roztoky		Experimentální roztoky	
	Ni(NO ₃) ₂ .7H ₂ O	MgSO ₄ .7H ₂ O	Ni(NO ₃) ₂ .7H ₂ O	MgSO ₄ .7H ₂ O
<i>Knautia</i>	2,5 mmol/l	1 mol/l	50 μmol/l	54,89 mmol/l
<i>Silene</i>	2,5 mmol/l	1,5 mol/l	50 μmol/l	54,89 mmol/l
<i>Galium</i>	2,5 mmol/l	1,5 mol/l	30 μmol/l	54,89 mmol/l

Pozn.: Standardní roztoky byly koncentrovanější pro snazší přípravu.

Koncentrace stresujících roztoků byly zvoleny na základě výsledku pilotního pokusu (na podzim 2009), kde bylo užito 5 různých koncentrací od každého stresujícího roztoku. Roztoky byly zvoleny tak, aby zahrnovaly různou škálu koncentrací (od nejslabší po extrémní). Koncentrace roztoku hořčičku byly: 2,2 mmol/l, 5,49 mmol/l, 10,98 mmol/l, 54,89 mmol/l a 109,78 mmol/l. Koncentrace roztoku niklu byly: 5 μmol/l, 15 μmol/l, 30 μmol/l, 50 μmol/l a 100 μmol/l. Na konci pokusu byly zvoleny ty koncentrace, při kterých rostliny vykazovaly největší odezvu (viditelně hůře se jim dařilo v daném roztoku ve srovnání s kontrolou, ale nejevily známky odumírání) (tab. 1 experimentální roztoky).

7.2.2 Kultivace

Po naklíčení určitého počtu semenáčků (tak aby se daly založit bloky s jednotlivými roztoky) jsem jednotlivé semenáčky umístila na kruhový plovák a dala do nádoby se živným roztokem. V plovoucím kruhu vedle sebe byly umístěny semenáčky následujících kategorií, které jsou uvedené na obrázku 3.



Obr. 3: Schématické znázornění populací použitých v kultivačních experimentech u jednotlivých rodů (2 – diploidi, 4 – tetraploidi, 8 – oktoploidi; H – hadcové populace, NH – nehadcové populace).

Vzájemná poloha semenáčků různých typů v každém opakování byla náhodně pozměněna. Pěstování ve standardním živném roztoku trvalo 11 dní.

Po 11 dnech začala samotná kultivace. Plováky se semenáčky byly umístěny do nádob se zvýšeným obsahem „stresujících“ prvků. V první nádobě byla kontrola = živný roztok. V druhé nádobě byl roztok se zvýšeným obsahem Mg (54,89 mmol/l). V třetí nádobě byl roztok s přídavkem Ni (50 μ mol/l nebo 30 μ mol/l u *Galium*). A ve čtvrté nádobě roztok s přídavkem obou prvků společně (Ni a Mg). Každý zásah byl proveden v 8 opakováních. Každé 4 dny byly roztoky měněny a jednotlivé nádoby byly náhodně prohozeny. Kultivace trvala 22 dní.

7.2.3 Statistické analýzy

Pomocí počítačového programu RootArch 1.0 (program pro měření kořenové architektury; ŠMILAUER 1994, nepublikováno) jsem zjistila délku hlavního kořene, počet postranních kořenů a celkovou délku kořenového systému, jak z nafocených, tak z naskenovaných vzorků. Z podzemní části rostliny byly tedy získány tři parametry, které dále byly samostatně zpracovány. Pro všechny parametry (celková délka kořenového systému, délka hlavního kořene, počet postranních kořenů) jsem vypočítala rozdíl mezi hodnotou na konci pokusu (po 22 dnech) a v čase 0 (před umístěním do experimentálních roztoků).

Podobně jsem vypočítala rozdíl délky nejdelšího listu po 22 dnech a v čase 0 (před změnou roztoků).

Rostliny s negativním přírůstkem (s částečně odumřelými kořeny či listy) byly kódovány jako 0. Data byla zlogaritmována ($=\log(x+1)$) pro přiblížení distribuce dat k normálnímu rozdělení.

K samotnému zpracování výsledků jsem použila program Statistika 9.0, metodu analýzy variance (ANOVA) s hierarchickým uspořádáním a interakcí. Jako závislé proměnné byly použity přírůstky kořene či listu (transformovaná data). Jako kategoriální proměnné nádoba, lokalita (odkud semenáčky pocházely), roztok s přidáním Mg, roztok s přidáním Ni, ploidie (jen u *Knautia* – diploidi, tetraploidi a u *Galium* – diploidi, tetraploidi, oktoploidi) a původ rostlin (hadcové a nehadcové rostliny). Faktor s náhodným efektem byla nádoba a lokalita. Analýza měla hierarchické uspořádání (nádoba vnořená do Mg a Ni, lokalita vnořená do ploidie a původu rostlin).

Tato složitější ANOVA byla užita pro vyhodnocení rozdílů odezvy *Knautia*, *Silene* a *Galium* semenáčků na zvýšenou koncentraci Mg a Ni v závislosti na původu rostliny a ploidii (vyjma *Silene*). Kromě samostatných efektů jednotlivých faktorů byly testovány také všechny jejich interakce.

Testovány byly následující nulové hypotézy:

H₀ (ploidie): rostliny různých ploidii se v kořenovém a listovém přírůstku neliší.

H₀ (původ rostlin): rostliny pocházející z různých substrátů se v přírůstku neliší.

H₀ (roztok Mg /Ni): rostliny pěstované v různých roztocích (Mg či Ni) se v přírůstku neliší.

H₀ (ploidie x původ rostlin): jednotlivé ploidní úrovně se neliší v přírůstku hadcových a nehadcových populací.

H₀ (Mg x ploidie): všechny cytotypy reagují na roztok hořčíku stejně.

H₀ (Mg x původ rostlin): přírůstek rostlin z různých substrátů není ovlivněn roztokem hořčíku.

H₀ (Ni x ploidie): všechny cytotypy reagují na roztok niklu stejně.

H₀ (Ni x původ rostlin): přírůstek rostlin z různých substrátů není ovlivněn roztokem niklu.

H₀ (Mg x Ni x ploidie): všechny cytotypy reagují na roztok stejně.

H₀ (Mg x Ni x původ rostlin): přírůstek rostlin z různých substrátů se neliší podle roztoku.

H₀ (Mg x původ rostlin x ploidie): všechny cytotypy z hadcového či nehadcového substrátu reagují na roztok hořčíku stejně.

H₀ (Ni x ploidie x původ rostlin): přírůstek rostlin určité ploidie z různých substrátů není ovlivněn roztokem niklu.

H_0 (Mg x Ni x ploidy x původ rostlin): přírůstek hadcových či nehadcových rostlin určité ploidy se neliší podle roztoků.

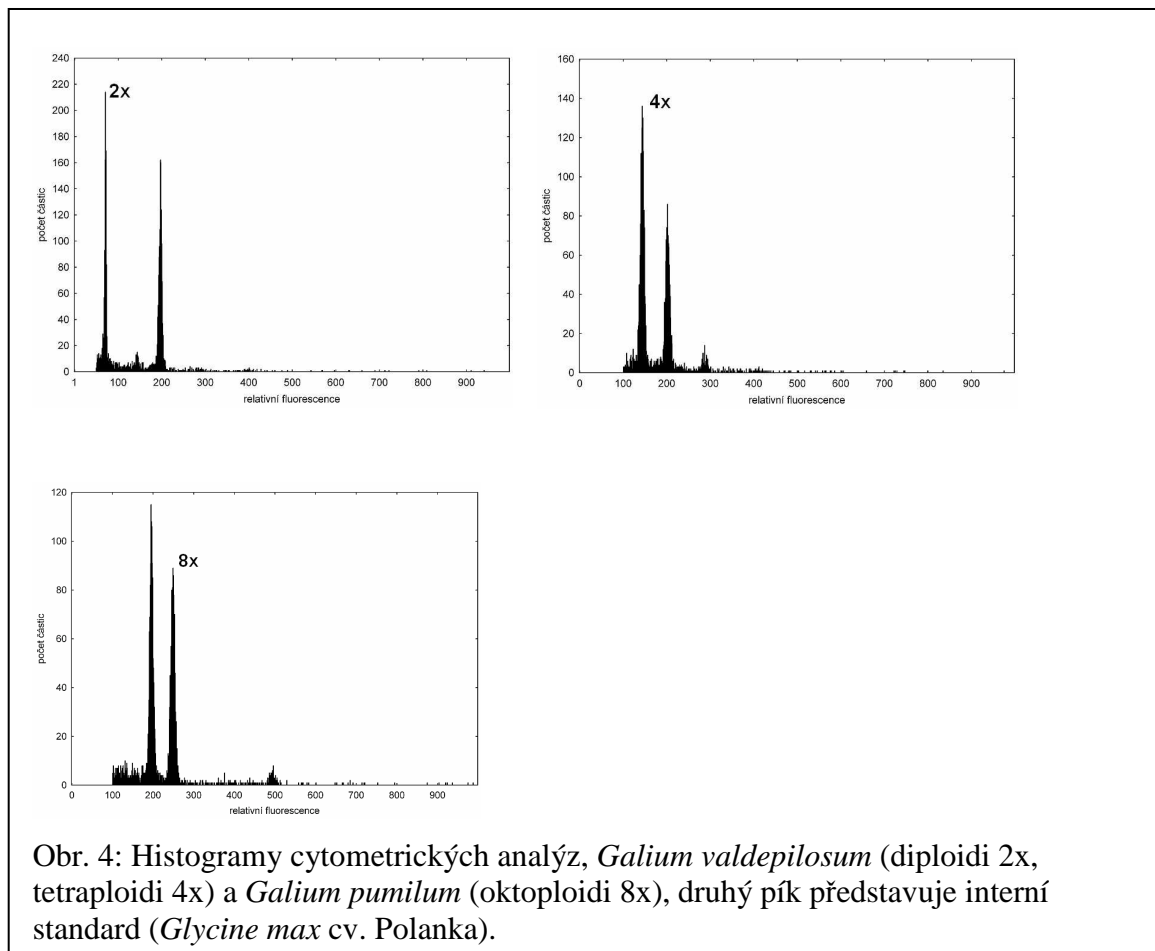
Za limitní hodnotu pro zamítnutí nulové hypotézy byla zvolena 5 % hladina významnosti.

8. Výsledky

8.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie byla použita v případě *Galium pumilum* a *Galium valdepiosum*, které byly nasbírány v České republice a přilehlých oblastech (Polsko, Německo). Tyto dva druhy jsou si velmi podobné a v přírodě těžko rozlišitelné, pokud nemají dostatečně vyvinuta merikarpia.

Zjištěné rozšíření cytotypů je uvedeno v příloze č. 1. U druhu *G. valdepiosum* byl potvrzen výskyt dvou cytotypů (diploidního a tetraploidního), druh *G. pumilum* byl zjištěn pouze oktaploidní (obr. 4). Studie vedla zároveň i ke zpřesnění znalostí o distribuci obou cytotypů v kontaktní zóně na jižní Moravě.



Obr. 4: Histogramy cytometrických analýz, *Galium valdepiosum* (diploidi 2x, tetraploidi 4x) a *Galium pumilum* (oktaploidi 8x), druhý pík představuje interní standard (*Glycine max* cv. Polanka).

8.2 Kultivační experiment

V experimentu bylo celkem použito 256 semenáčků *Knautia arvensis* (128 diploidů a 128 tetraploidů; z každých diploidů a tetraploidů bylo 64 hadcových a 64 nehadcových rostlin), 192 semenáčků *Silene vulgaris* (96 hadcových a 96 nehadcových rostlin) a 384 semenáčků rodu *Galium*, z toho *Galium valdepilosum* bylo 256 (128 diploidů a 128 tetraploidů; z každých diploidů a tetraploidů bylo 64 hadcových a 64 nehadcových rostlin) a *Galium pumilum* bylo 128 (64 hadcových a 64 nehadcových rostlin).

8.2.1 *Knautia arvensis*

Tabulka 2 shrnuje výsledky analýzy variance pro jednotlivé testované charakteristiky (celkový přírůstek kořenové soustavy, přírůstek hlavního kořene, změna počtu postranních kořenů a přírůstek nejdelšího listu).

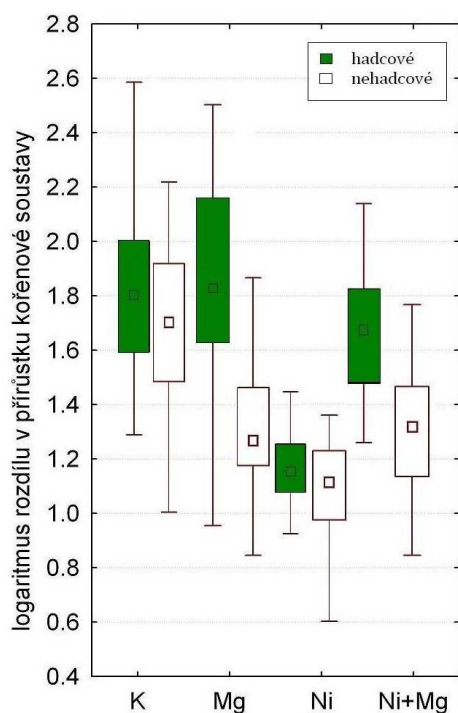
Tab. 2: Výsledky analýzy variance (ANOVA) s hierarchickým uspořádáním pro jednotlivé testované faktory a jejich interakce. Průkazné výsledky ($p < 0,05$) jsou zvýrazněny tučně.

faktor/interakce	df	celkový přírůstek kořenové soustavy			přírůstek hlavního kořene			změna počtu postranních kořenů			přírůstek nejdelšího listu		
		MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p
Mg	1	0,94	5,99	0,02	0,36	5,24	0,03	0,86	6,31	0,02	0,79	15,50	0,00
Ni	1	8,63	55,13	0,00	2,24	32,94	0,00	9,87	72,01	0,00	0,37	7,32	0,01
Ploidie	1	0,19	1,28	0,28	0,39	2,59	0,15	0,04	0,46	0,50	0,04	0,44	0,52
Původ	1	0,19	1,28	0,28	0,01	0,04	0,85	1,27	14,38	0,00	0,03	0,38	0,55
Mg*Ni	1	3,96	25,31	0,00	1,28	18,81	0,00	6,12	44,67	0,00	0,48	9,55	0,00
Ploidie*Mg	1	0,00	0,00	0,98	0,02	0,05	0,53	0,01	0,09	0,77	0,00	0,02	0,90
Ploidie*Ni	1	0,06	0,79	0,38	0,13	3,07	0,08	0,11	1,50	0,22	0,06	1,09	0,30
Původ*Mg	1	2,77	35,73	0,00	0,65	14,75	0,00	2,50	33,94	0,00	0,43	8,14	0,00
Původ*Ni	1	0,54	6,09	0,01	0,18	4,05	0,05	0,21	2,86	0,09	0,05	0,90	0,34
Ploidie*Původ	1	0,27	1,82	0,21	0,62	4,16	0,08	0,17	1,87	0,19	0,06	0,70	0,42
Ploidie*Mg*Ni	1	0,00	0,00	0,96	0,03	0,61	0,43	0,09	1,24	0,27	0,00	0,00	0,98
Původ*Mg*Ni	1	0,12	1,51	0,22	0,08	1,80	0,18	0,02	0,33	0,56	0,15	2,92	0,09
Ploidie*Původ*Mg	1	0,68	8,80	0,00	0,10	2,24	0,14	0,75	10,18	0,00	0,08	1,52	0,22
Ploidie*Původ*Ni	1	0,03	0,34	0,56	0,01	0,22	0,64	0,00	0,01	0,92	0,00	0,03	0,86
Ploidie*Původ*Mg*Ni	1	0,00	0,02	0,89	0,00	0,01	0,94	0,09	1,18	0,28	0,01	0,15	0,70
Error	207												

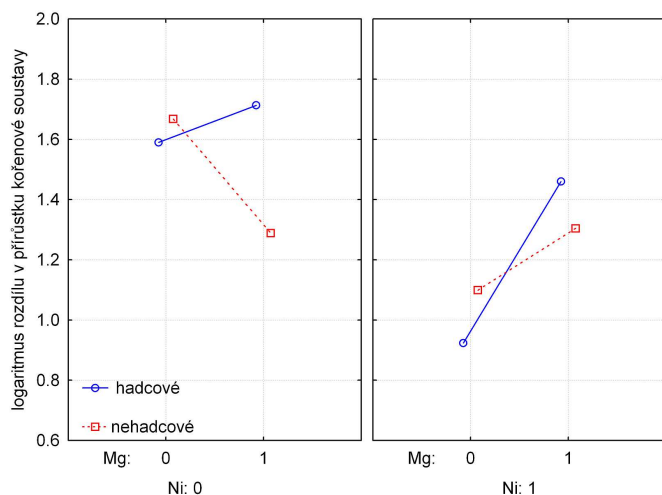
Z tabulky 2 je patrné, že obsah Mg a Ni statisticky průkazně ovlivnil růst semenáčků *Knautia arvensis*. Tyto prvky měly vliv na jejich kořenový systém (celkový přírůstek kořenové soustavy, přírůstek hlavního kořene, změna počtu postranních kořenů) i listovou část (přírůstek nejdelšího listu). Hadcové a nehadcové rostliny se lišily v celkovém

přírůstku kořenové soustavy v roztoku Mg a v roztoku Ni. Oproti tomu přírůstek nejdelšího listu se výrazně lišil pouze v roztoku Mg. Statisticky průkazně vyšla i interakce Ploidie*Původ*Mg pro celkový přírůstek kořenové soustavy. Tetraploidní a diploidní cytotypy z hadcového či nehadcového substrátu se lišily v reakci na roztok se zvýšeným obsahem hořčíku. Z níže uvedených obrázků jsou výsledky lépe patrné.

Z obrázku 5 je vidět výrazný rozdíl v reakci kořenové soustavy na roztok hořčíku, kdy hadcové rostliny lépe snášely nadbytek hořčíku, vykazovaly vyšší přírůstky kořenového systému. Na druhou stranu u roztoku niklu nebyl zjištěn rozdíl. Jak hadcové, tak nehadcové rostliny rostly špatně v tomto roztoku. V roztoku Ni+Mg rostly hadcové rostliny lépe než v samotném roztoku Ni (což také ilustruje průkazná interakce vlivu obou prvků v tabulce 2). Na obrázku 6 interakce Mg*Ni*původ zobrazuje odezvu celkového přírůstku kořenové soustavy na přítomnost/nepřítomnost daných prvků. Je zde také vidět výrazná odchylka v roztoku s nadbytkem Mg a v roztoku s nadbytkem Ni a Mg mezi hadcovými a nehadcovými rostlinami.

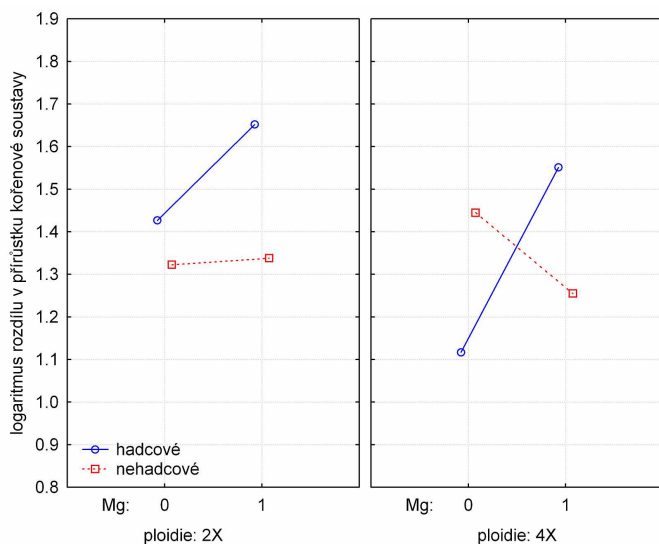


Obr. 5: Rozdíl v přírůstku kořenové soustavy hadcových a nehadcových populací *Knautia arvensis* v kontrole (K) a roztocích kovů (Ni, Mg, Ni+Mg). Zobrazen je medián (bod) a mezikvartilové rozpětí (box).



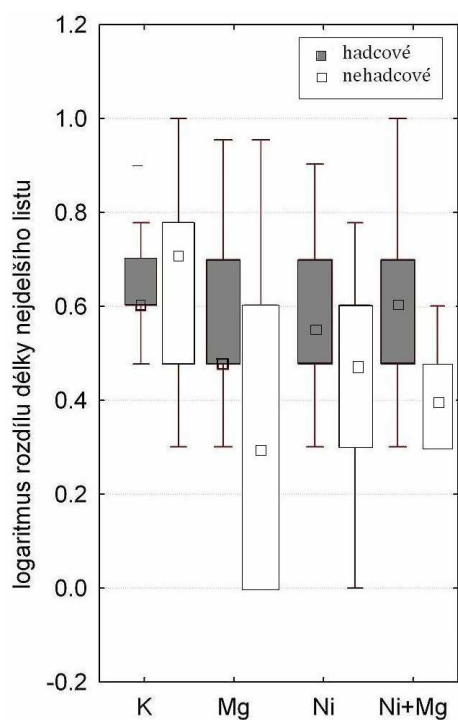
Obr. 6: Odpověď přírůstku kořenové soustavy hadcových a nehadcových rostlin *Knautia arvensis* na přítomnost zvýšeného obsahu hořčíku a niklu.

Obrázek 7 průkazné interakce Mg*ploidie*původ zobrazuje odlišnou odezvu diploidních a tetraploidních rostlin na roztok Mg. Hadcové rostliny (diploidní i tetraploidní) v roztoku Mg vytvářely větší kořenovou soustavu oproti nehadcovým. Zajímavé je to u nehadcových tetraploidních rostlin, které v roztoku Mg zaznamenaly výrazné zhoršení růstu oproti situaci u nehadcových diploidů.

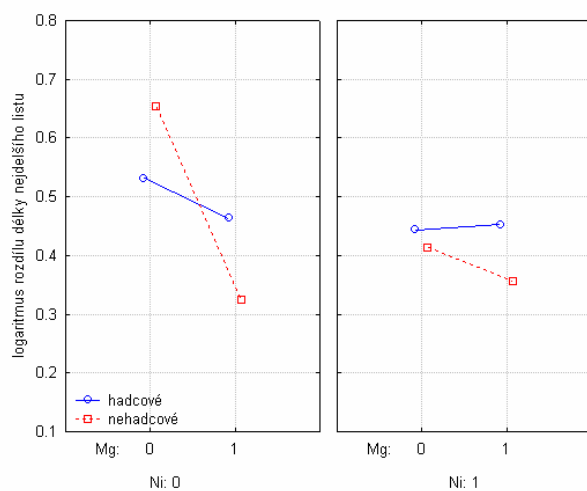


Obr. 7: Rozdíl v přírůstku kořenové soustavy v interakci Mg*ploidie*původ

Obrázek 8 znázorňuje rozdíl délky nejdelšího listu v závislosti na typu roztoku. Výraznější rozdíly mezi hadcovými a nehadcovými rostlinami jsou patrné při zvýšeném obsahu Mg (průkazná interakce se substrátem původu, tabulka 2). Interakce Mg*Ni*původ v obrázku 9 zobrazuje odezvu přírůstku nejdelšího listu hadcových a nehadcových rostlin na roztoky s nadbytkem Mg, Ni a jejich kombinaci.



Obr. 8: Rozdíl v délce nejdelšího listu hadcových a nehadcových populací *Knautia arvensis* v kontrole (K) a roztocích kovů (Ni, Mg, Ni+Mg). Zobrazen je medián (bod) a mezikvartilové rozpětí (box).



Obr. 9: Rozdíl délky nejdelšího listu v závislosti na roztoku a původu rostlin.

8.2.2 *Silene vulgaris*

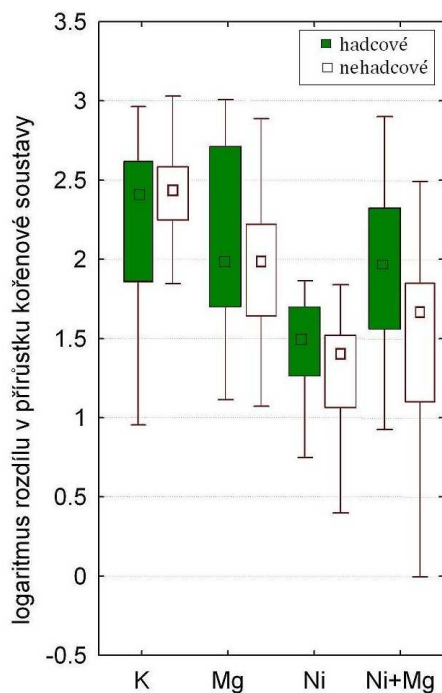
Tabulka 3 shrnuje výsledky analýzy variance pro jednotlivé testované charakteristiky (celkový přírůstek kořenové soustavy, přírůstek hlavního kořene, změna počtu postranních kořenů a přírůstek nejdelšího listu).

Tab. 3: Výsledky analýzy variance (ANOVA) s hierarchickým uspořádáním pro jednotlivé testované faktory a jejich interakce. Průkazné výsledky ($p < 0,05$) jsou zvýrazněny tučně.

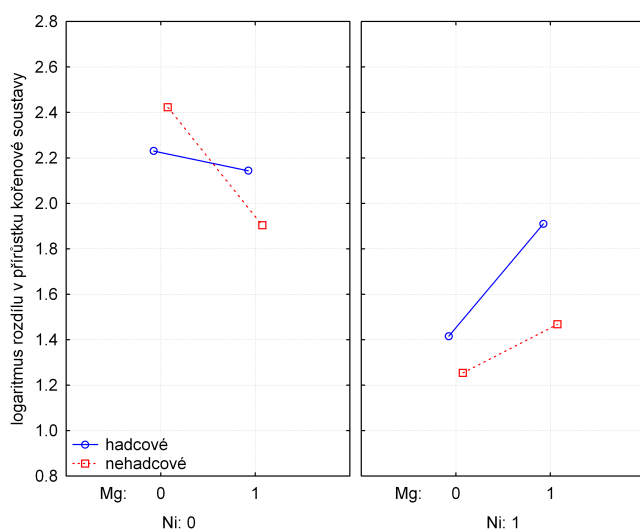
faktor/interakce	df	celkový přírůstek kořenové soustavy			přírůstek hlavního kořene			změna počtu postranních kořenů			přírůstek nejdelšího listu		
		MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p
Mg	1	0,03	0,10	0,76	0,03	0,13	0,73	0,00	0,03	0,87	0,01	0,47	0,50
Ni	1	20,99	66,40	0,00	10,89	43,01	0,00	8,59	58,12	0,00	0,62	30,74	0,00
Původ	1	1,27	1,14	0,35	1,42	1,63	0,27	0,03	0,06	0,82	0,00	0,04	0,85
Mg*Ni	1	5,15	16,30	0,00	5,99	23,65	0,00	0,07	0,48	0,49	0,10	4,75	0,04
Původ*Mg	1	1,52	6,30	0,01	0,55	2,64	0,11	0,31	2,47	0,12	0,01	0,83	0,36
Původ*Ni	1	0,92	3,83	0,05	0,68	3,25	0,07	0,12	0,93	0,34	0,06	5,14	0,02
Původ*Mg*Ni	1	0,07	0,29	0,59	0,02	0,10	0,76	0,34	2,69	0,10	0,01	0,57	0,45
Error	151												

Z tabulky 3 je vidět, že Ni signifikantně ovlivnil růst semenáčků *Silene vulgaris*. Měl vliv na jejich kořenový systém (celkový přírůstek kořenové soustavy, přírůstek hlavního kořenu a změnu počtu postranních kořenů) a listovou část (přírůstek nejdelšího listu). Hadcové a nehadcové rostliny se lišily v celkovém přírůstku kořenové soustavy v roztoku Mg a v roztoku Ni. Oproti tomu přírůstek nejdelšího listu se výrazně lišil pouze v roztoku Ni. V roztoku Mg a Mg+Ni se hadcovým rostlinám dařilo lépe, vytvořily větší kořenovou soustavu, to je ukázáno na obrázku 10.

V obrázku 11 je zobrazena odezva celkového přírůstku kořenové soustavy na přítomnost/nepřítomnost daných prvků. Hadcovým rostlinám se mimo kontroly nejvíce dařilo v roztoku Ni+Mg, tvořily největší kořenovou soustavu.

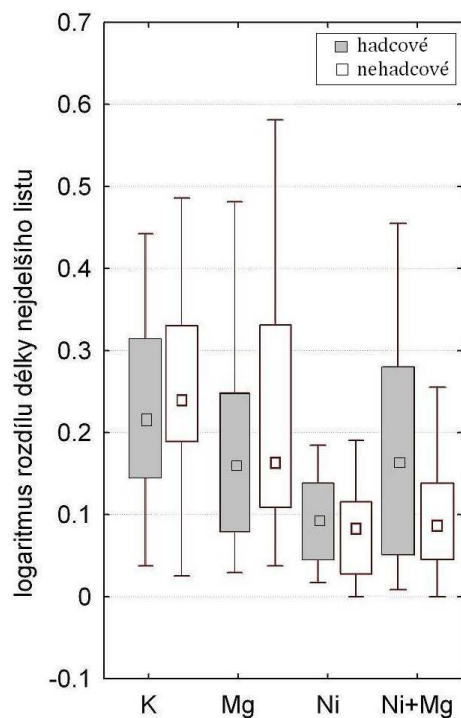


Obr. 10: Rozdíl v přírůstku kořenové soustavy hadcových a nehadcových populací *Silene vulgaris* v kontrole (K) a roztocích kovů (Ni, Mg, Ni+Mg). Zobrazen je medián (bod) a mezikvartilové rozpětí (box).

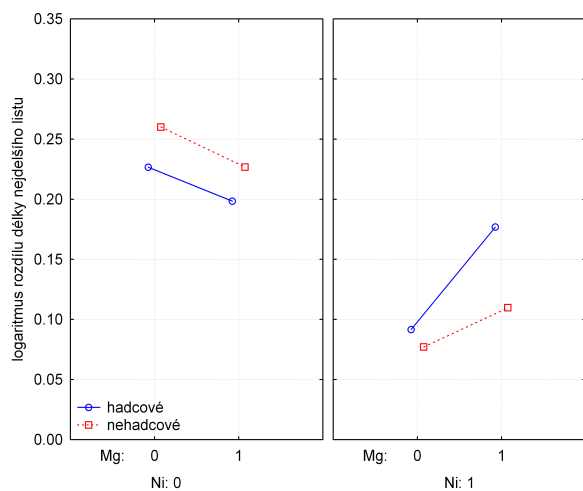


Obr. 11: Rozdíl přírůstku kořenové soustavy v závislosti na roztoku a původu rostlin.

Obrázek 12 znázorňuje rozdíl délky nejdelšího listu v závislosti na typu roztoku. V roztoku Ni se jak hadcovým, tak nehadcovým rostlinám dařilo špatně. V roztoku Mg se hadcovým rostlinám dařilo hůře oproti nehadcovým rostlinám. Na obrázku 13 je zobrazena odezva přírůstku nejdelšího listu na přítomnost/nepřítomnost daných prvků.



Obr. 12: Rozdíl v délce nejdelšího listu hadcových a nehadcových populací *Silene vulgaris* v kontrole (K) a roztocích kovů (Ni, Mg, Ni+Mg). Zobrazen je medián (bod) a mezikvartilové rozpětí (box).



Obr. 13: Rozdíl v délce nejdelšího listu hadcových a nehadcových rostlin v roztocích se zvýšeným obsahem Ni a Mg.

8.2.3 *Galium*

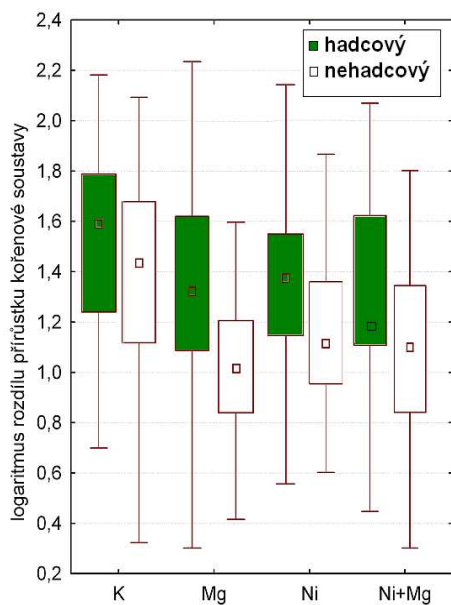
Tabulka 4 shrnuje výsledky analýzy variance pro jednotlivé testované charakteristiky (celkový přírůstek kořenové soustavy, přírůstek hlavního kořene, změna počtu postranních kořenů a přírůstek nejdelšího listu).

Tab. 4: Výsledky analýzy variance (ANOVA) s hierarchickým uspořádáním pro jednotlivé testované faktory a jejich interakce. Průkazné výsledky ($p < 0,05$) jsou zvýrazněny tučně.

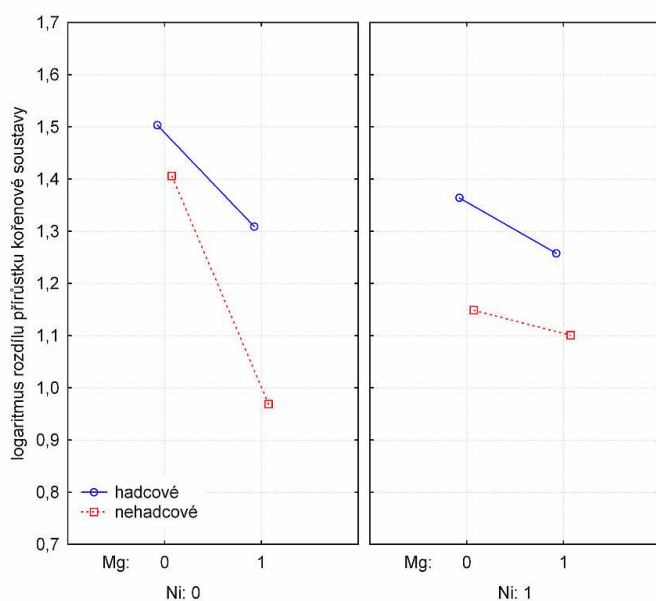
faktor/interakce	df	celkový přírůstek kořenové soustavy			přírůstek hlavního kořene			změna počtu postranních kořenů			přírůstek nejdelšího listu		
		MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p	MS	F	p
Mg	1	3,71	21,58	0,00	0,87	6,52	0,02	1,24	9,34	0,00	0,02	19,14	0,00
Ni	1	0,60	3,47	0,07	0,09	0,67	0,42	0,81	6,14	0,02	0,00	3,62	0,07
ploidie	2	1,14	2,46	0,17	0,03	0,07	0,93	1,48	7,16	0,03	0,00	2,81	0,14
původ	1	3,94	8,47	0,03	0,77	1,95	0,21	2,77	13,35	0,01	0,00	2,41	0,17
Mg*Ni	1	1,36	7,94	0,01	0,00	0,00	0,97	1,89	14,25	0,00	0,01	10,48	0,00
Mg*ploidie	2	0,12	0,92	0,40	0,45	3,86	0,02	0,02	0,18	0,84	0,00	0,41	0,67
Ni*ploidie	2	0,2	1,56	0,21	0,28	2,38	0,09	0,06	0,66	0,52	0,00	0,77	0,47
Mg*původ	1	0,2	1,55	0,21	0,60	5,14	0,02	0,03	0,34	0,56	0,00	1,30	0,26
Ni*původ	1	0,03	0,2	0,66	0,03	0,29	0,59	0,24	2,63	0,11	0,00	0,29	0,59
ploidie*původ	2	1,39	2,99	0,13	0,35	0,89	0,46	0,62	3,01	0,12	0,00	1,63	0,27
Mg*Ni*ploidie	2	0,09	0,71	0,49	0,01	0,05	0,95	0,38	4,10	0,02	0,00	0,35	0,71
Mg*Ni*původ	1	0,54	4,14	0,04	0,02	0,16	0,69	0,10	1,11	0,29	0,01	14,74	0,00
Mg*ploidie*původ	2	0,06	0,42	0,66	0,17	1,54	0,22	0,05	0,50	0,61	0,00	4,91	0,01
Ni*ploidie*původ	2	0,05	0,37	0,69	0,11	0,91	0,40	0,03	0,34	0,71	0,00	0,06	0,94
Mg*Ni*ploidie*původ	2	0,03	0,25	0,78	0,04	0,37	0,69	0,03	0,29	0,74	0,00	0,25	0,78
Error	326												

Z tabulky 4 je patrné, že Mg a Ni významně ovlivnily růst semenáčků *Galium*. Měly vliv na jejich kořenový systém (celkový přírůstek kořenové soustavy, změnu počtu postranních kořenů) a listovou část (přírůstek nejdelšího listu). Přírůstek hlavního kořene byl ovlivněn pouze roztokem Mg. Hadcové a nehadcové rostliny se lišily v celkovém přírůstku kořenové soustavy a přírůstku nejdelšího listu v roztoku Mg a v roztoku Ni. Průkazný efekt pro přírůstek nejdelšího listu vyšel také u interakce Mg*ploidie*původ. Hadcové a nehadcové rostliny se v roztoku hořčíku lišily v přírůstku nejdelšího listu podle jejich ploidie.

Z obrázku 14 je vidět rozdíl v reakci kořenové soustavy na roztok hořčíku, kdy hadcové rostliny lépe snášely nadbytek hořčíku, tvořily rozsáhlejší kořenový systém. Naopak u roztoku niklu se neprojevil výrazný rozdíl. Hadcové i nehadcové rostliny rostly v tomto roztoku poměrně dobře, i když hadcovým rostlinám se dařilo o něco lépe. V roztoku Ni+Mg rostly hadcové rostliny lépe, i když výrazný rozdíl se v kořenové soustavě neprojevil. Největší přírůstek kořenové soustavy měly hadcové rostliny. Na obrázku 15 interakce Mg*Ni*původ zobrazuje odezvu celkové délky kořenové soustavy na přítomnost/nepřítomnost daných prvků.



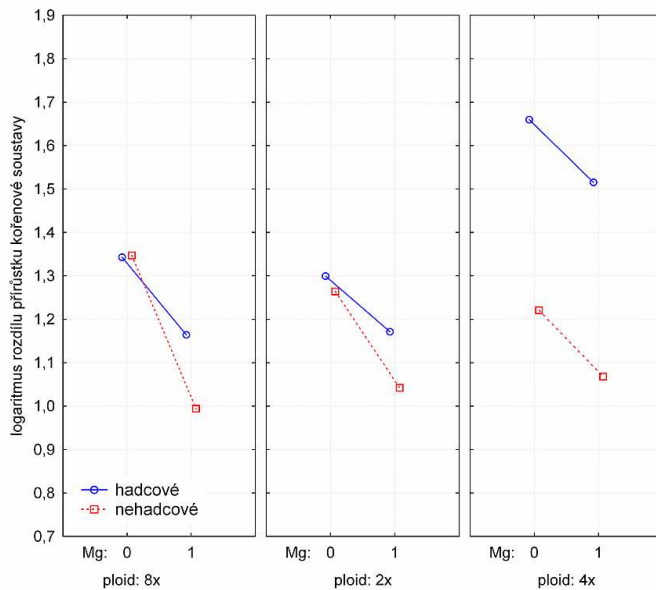
Obr. 14: Rozdíl v přírůstku kořenové soustavy hadcových a nehadcových populací *Galium pumilum* a *Galium valdepilosum* v kontrole (K) a roztocích kovů (Ni, Mg, Ni+Mg). Zobrazen je medián (bod) a mezikvartilové rozpětí (box).



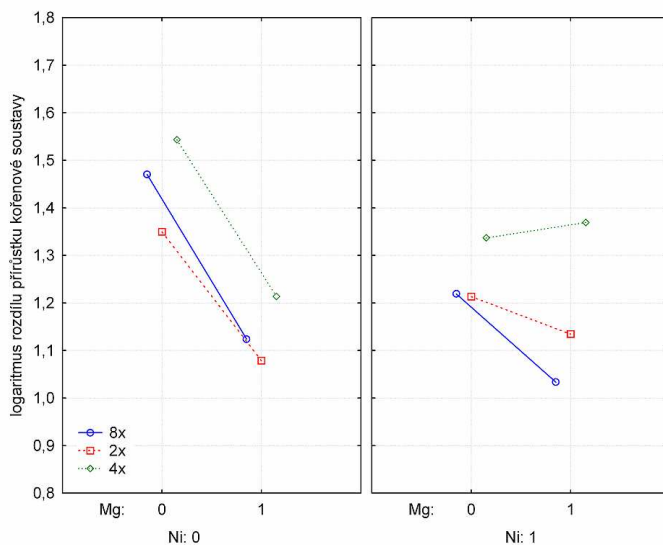
Obr. 15: Rozdíl přírůstku kořenové soustavy v závislosti na roztoku a původu rostlin.

Na obrázku 16 je zobrazena interakce Mg*ploidie*původ. Obrázek zobrazuje odlišnou odezvu diploidních, tetraploidních a oktoploidních rostlin na roztok Mg. Diploidní *Galium valdepilosum* má stejnou odezvu na roztok hořčíku jako oktoploidní *Galium pumilum*. Tetraploidní hadcové rostliny *Galium valdepilosum* však vykazují obecně výraznější

přírůstky kořenové soustavy než je tomu u předchozích dvou cytotypů. Rozdíl je vidět i na obrázku 17, kde je zobrazena interakce Mg*Ni*ploidie.

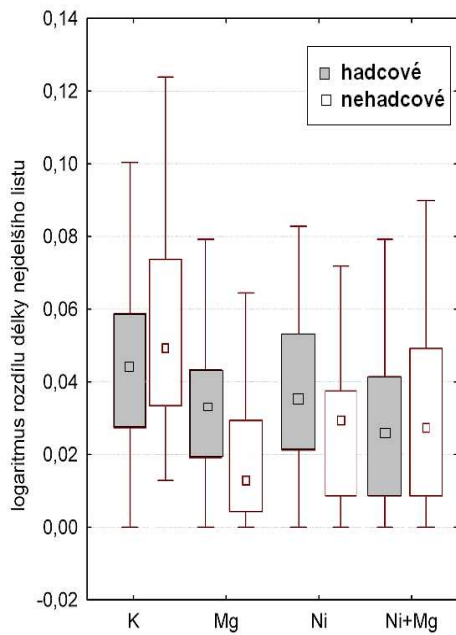


Obr. 16: Rozdíl v přírůstku kořenové soustavy v interakci Mg*ploidie*původ

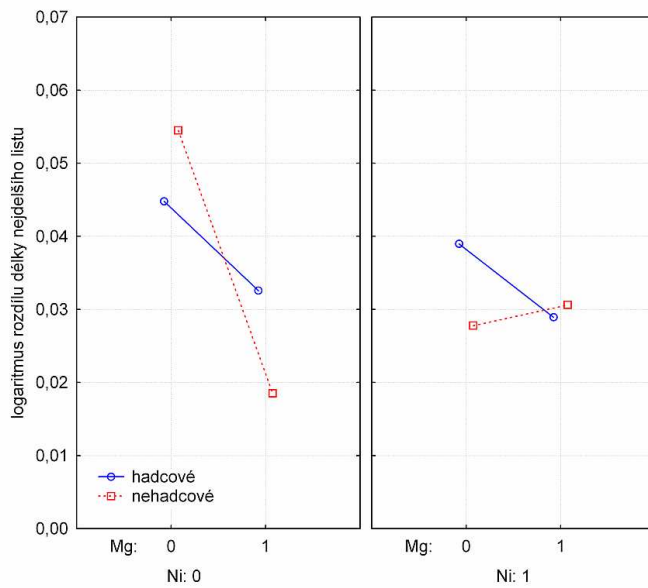


Obr. 17: Rozdíl v přírůstku kořenové soustavy v interakci Mg*Ni*ploidie

Obrázek 18 znázorňuje rozdíl délky nejdelšího listu v závislosti na typu roztoku. V roztoku Ni a Mg se hadcovým rostlinám dařilo lépe než nehadcovým rostlinám. V roztoku Ni+Mg se hadcovým i nehadcovým rostlinám dařilo podobně. V obrázku 19 interakce Mg*Ni*původ zobrazuje odezvu délky nejdelšího listu na přítomnost/nepřítomnost daných prvků.



Obr. 18: Rozdíl v délce nejdelšího listu hadcových a nehadcových populací *Galium pumilum* a *Galium valdepilosum* v kontrole (K) a roztocích kovů (Ni, Mg, Ni+Mg). Zobrazen je medián (bod) a mezikvartilové rozpětí (box).



Obr. 19: Příklad růstu nejdelšího listu hadcových a nehadcových rostlin v roztocích se zvýšeným obsahem Ni a Mg.

9. Diskuze

Pěstování rostlin pocházejících z hadcových a nehadcových populací v roztocích se zvýšeným obsahem hořčíku, niklu a kombinaci Ni+Mg (prvků typických pro hadcové půdy) poukázalo na významné rozdíly v přírůstku nadzemních i podzemních orgánů. Uvedené rozdíly mohou indikovat vyšší toleranci hadcových populací ke zvýšenému obsahu těchto prvků. Zjistila jsem výrazné odchylky mezi hadcovými a nehadcovými populacemi v toleranci na Mg a Ni+Mg. Rostliny z hadcových populací ukázaly obecně vyšší toleranci na Mg a Ni+Mg než rostliny z nehadcových populací, tvořily rozsáhlejší kořenový systém a většinou také vykazovaly vyšší přírůstky listů. V roztoku Ni se jak hadcovým, tak nehadcovým rostlinám dařilo špatně. Výjimkou byly pouze hadcové populace *Galium pumilum* a *G. valdepilosum*, kterým se v roztoku Ni dařilo o něco lépe než nehadcovým populacím.

Toleranci k těmto prvkům zaznamenala ve své práci již NYBERG BERGLUND et al. (2003), která porovnávala hadcové a nehadcové populace *Cerastium alpinum*. Tolerance také byla zjištěna například u hadcových populací *Silene dioica* (WESTERBERGH & SAURA 1992), *Cleome heratensis* (ASEMANEH et al. 2007), *Sedum anglicum* (RAJAKARUNA et al. 2003), či *Helianthus bolanderi* (WALKER et al. 1954).

Středem pozornosti mého výzkumu se stala hlavně kořenová soustava *Knautia arvensis*, *Silene vulgaris*, *Galium pumilum* a *Galium valdepilosum*, protože adaptace na hadcové půdy se projevuje nejsilněji právě u podzemních orgánů. Rozdíly mezi hadcovými a nehadcovými populacemi se projevily v případě *Knautia* a *Galium* i v přírůstku listů (tabulky 2 a 4), byť byly v souhrnu méně výrazné než rozdíly u kořenové soustavy. Je zajímavé, že některé listy (zejména u *Silene vulgaris*) byly úzké a chlorotické, jako to odpovídá rostlinám na hadcových půdách (RAJAKARUNA & BAKER 2004), ale tyto znaky se objevily jak u hadcových, tak nehadcových rostlin. WESTERBERGH (1994) uvádí, že listový růst je méně ovlivněný Ni než kořenový růst. To se projevilo i v našem případě, kdy se v případě pěstování v Ni neobjevily rozdíly mezi hadcovými a nehadcovými populacemi.

Pro nalezení odchylek mezi hadcovými a nehadcovými rostlinami je vhodnější použití měření celkového přírůstku kořenové soustavy. V přírůstku hlavního kořene a změně počtu postranních kořenů se výrazné odchylky neprojevily. Tyto parametry také v našem případě někdy vykazovaly příliš nízkou variabilitu ve svých hodnotách (např. kořeny *Galium* se většinou velmi omezeně a často se nevětvily vůbec). Proto bylo vhodnější se spíše zabývat statistickým vyhodnocováním celkového přírůstku kořenové soustavy.

Obecně lze říci, že hadcové populace *Knautia*, *Galium* a *Silene* vykazují v roztocích se zvýšeným obsahem Mg a Mg+Ni vyšší přírůstky kořenové soustavy než jejich nehadcové protějšky. Výrazná odchylka v rozdílu kořenového přírůstku se projevila mezi hadcovými a nehadcovými rostlinami všech vybraných druhů v roztoku Mg, kdy hadcovým rostlinám se dařilo lépe a tvořily rozsáhlejší kořenový systém. To je pravděpodobně důsledkem schopností tolerantních rostlin omezit přísun hořčíku (WALKER et al. 1954, KRUCKEBERG 1984, KAZAKOU et al. 2008). Naproti tomu v tkáních nehadcových (netolerantních) rostlin je akumulován nadbytek Mg, který způsobuje toxický efekt (RAJAKARUNA et al. 2003).

V literatuře je rozvoj kořenové soustavy udáván spíše ve spojení s nedostatkem vápníku a nadbytkem hořčíku, než se samotnou toxicitou hořčíku. Hadcové rostliny přijímají méně hořčíku a více vápníku než nehadcové rostliny (MAIN 1981, ASEMANEH et al. 2007), tudíž nadbytek hořčíku představuje pro nehadcové rostliny větší míru toxicity. Vysoké koncentrace hořčíku jsou antagonistické k rostlinnému příjmu vápníku. Nadbytek hořčíku by proto mohl potenciálně indukovat nedostatek vápníku v pletivech rostliny a tím vést například k nekróze kořenových špiček (KAZAKOU et al. 2008). KAZAKOU et al. (2008) nekrózu zpozorovala na nehadcových semenáčcích rostoucích na hadcovém substrátu. Z toho vyplývá, že u hadcových rostlin, možná díky přítomnosti specializovaných fyziologických mechanismů pro zvládnání vysokého obsahu hořčíku a nízkého obsahu vápníku, nedochází k odumírání kořene (KAZAKOU et al. 2008). To by odpovídalo i mému pokusu, protože ve stresujícím roztoku Mg byl jak vyšší obsah hořčíku, tak nízký obsah vápníku.

V roztoku Ni+Mg se dařilo hadcovým i nehadcovým rostlinám obecně lépe než v prostém roztoku Ni. GABBRIELLI & PANDOLFINI (1984) uvádějí, že Ca^{2+} má detoxikační účinky, které redukuje vliv Mg^{2+} a Ni^{2+} na kořenový vývoj. A dále dodávají, že kombinace Ca^{2+} a Mg^{2+} může účinněji redukovat toxicitu Ni^{2+} , dokonce i když Ca^{2+} je v roztoku obsažen v malém množství. To že přítomnost Ca^{2+} a Mg^{2+} funguje jako ochrana proti toxicitě Ni^{2+} , zaznamenali ve své práci i ROBERTSON (1985) a LOMBINI et al. (2003). V pokusu použitý živný roztok obsahoval ionty vápníku a zvýšený obsah iontů hořčíku, což zřejmě mohlo snižovat toxický vliv niklu. Je zajímavé, že u hadcových rostlin byl tento pozitivní vliv zvýšeného obsahu Mg vyšší než u rostlin původem nehadcových. Je možné, že tento mechanismus pak dále přispívá k toleranci hadcových rostlin k toxickému substrátu.

Odchylka v rozdílu kořenového přírůstku se neprojevila mezi hadcovými a nehadcovými rostlinami *Silene vulgaris* a *Knautia arvensis* v roztoku se zvýšeným obsahem Ni. Hadcové i nehadcové rostliny rostly špatně v tomto roztoku. Domnívám se, že rostliny potřebují mít přítomné určité množství Mg a Ca, aby byl potlačen toxický vliv Ni. Jak je uvedeno výše u kombinace Ni+Mg, protože v hadcových půdách se nevyskytuje Ni sám, je tam právě zastoupen jak Mg, tak i Ca (i když Ca v malém množství). Naproti tomu hadcovým rostlinám *Galium pumilum* a *G. valdepilosum* se dařilo o něco lépe v roztoku Ni. To je možná důsledek toho, že byla zvolena relativně nižší koncentrace, kterou dokázaly rostliny lépe zvládnout a stačilo jim malé množství Mg a Ca, které bylo přítomné v živném roztoku. Například v článku NYBERG BERGLUND (2003) je uveden pokus, který prokázal hadcovou toleranci *Cerastium alpinum* na zvýšený obsah niklu. Ale při tomto pokusu byla použita nižší koncentrace než v našem případě. Je možné, že právě díky nižší koncentraci Ni, kterou hadcové rostliny dokázaly zvládnout, se mohl rozdíl mezi hadcovými a nehadcovými rostlinami projevit výrazněji.

Vysoké obsahy hořčíku a niklu patří mezi dva důležité faktory, které způsobují neúrodnost hadcových půd (NYBERG BERGLUND et al. 2003). Rostliny z hadcových populací ukázaly obecně vyšší toleranci k těmto prvkům než rostliny z nehadcových populací. Rozdíly mezi hadcovými a nehadcovými populacemi se projevily v rozdílu přírůstku kořenové soustavy. Potvrdilo se, že hadcové populace mají rozsáhlejší kořenový systém. Celkově mohu říci, že hadcové populace *Knautia arvensis*, *Silene vulgaris*, *Galium pumilum* a *Galium valdepilosum* vyvíjejí jisté adaptace, které jim umožňují přežít na stanovištích, kde nemají příznivé půdní podmínky.

Rozdíly mezi hadcovými a nehadcovými populacemi možná nejsou způsobeny jednoduchým mechanismem, ale spíše kombinací několika možných mechanismů, jako odlišností v kořenové morfologii, příjmu, translokaci a interakci mezi kationty (RAJAKARUNA et al. 2003). Hadcová tolerance také závisí na interakci mnoha genů, díky kterým se rostliny mohou adaptovat na tyto půdní faktory (WESTERBERGH 1994).

Potvrzením hadcové tolerance u polyploidních komplexů *Knautia arvensis* a *Galium pumilum* agg. vyvstala otázka, zda míra tolerance se liší mezi jednotlivými cytotypy. U *Knautia arvensis* se diploidní a tetraploidní populace výrazně nelišily v odezvě na roztok Mg. Diploidní a tetraploidní hadcové rostliny jsou si geneticky podobné. Protože hadcoví tetraploidi vznikli z jejich diploidních předků (KOLÁŘ et al. 2008), mohly tak polyploidizací převzít i jejich toleranci k hadcovým půdám. Jiná situace však nastává

v případě *Galium pumilum* agg. Zatímco oktoploidní *Galium pumilum* mělo podobnou odezvu na roztok Mg jako diploidní *Galium valdepilosum*, hadcové populace tetraploidního *Galium valdepilosum* se od nich výrazně lišily. To může být důsledek jejich odlišné distribuce hadcových a nehadcových populací jednotlivých cytotypů. *Galium pumilum* roste vesměs po celém území České republiky a diploidní *Galium valdepilosum* je také hojně rozšířeno, i když jen po území jihozápadní Moravy. V obou případech však hadcové populace těsně sousedí s nehadcovými, čímž mezi nimi mohlo docházet ke genetickému toku (KRAHULCOVÁ & ŠTĚPÁNKOVÁ 1998). Naproti tomu studované lokality hadcových tetraploidů *Galium valdepilosum* se vyskytují izolovaně a tudíž alespoň v nedávné minulosti zřejmě nemohlo docházet ke genetickému toku s jejich nehadcovými protějšky. V souhrnu lze říci, že získaná data nepodporují hypotézu o odlišné míře hadcové tolerance odvozené z odlišné ekologické specializace druhu *G. pumilum* a *G. valdepilosum* (KRAHULCOVÁ & ŠTĚPÁNKOVÁ 1998).

10. Závěr

Kultivační experiment prokázal toleranci hadcových populací *Knautia arvensis*, *Silene vulgaris*, *Galium pumilum* a *Galium valdepilosum* vůči zvýšenému obsahu hořčíku. Tolerance k niklu je možná pouze v kombinaci s přítomností hořčíku. Zvýšené množství hořčíku a niklu představují nepříznivé faktory hadcových půd, na které se rostliny musí adaptovat, aby zde mohly přežít. Tolerance se nejvýrazněji projevila v celkovém přírůstku kořenové soustavy, kdy hadcové rostliny tvořily rozsáhlejší kořenový systém oproti nehadcovým protějškům. Průkazné rozdíly se však projevily i v případě nadzemních orgánů (přírůstku nejdelšího listu rostliny).

Dále bylo zjištěno, že míra tolerance k roztoku hořčíku se mezi různými druhy *Knautia arvensis* a *Galium pumilum* agg. neliší. Liší se však odezva mezi cytotypy v rámci druhu *Galium valdepilosum*.

Pokus přispěl k hlubšímu poznání podstaty adaptací rostlin na nepříznivé podmínky hadcových půd.

11. Seznam použité literatury

- ADAMS K.L. & WENDEL J.F. (2005): Novel patterns of gene expression in polyploid plants. – *Trends in genetics* 21: 539-543
- ASEMANEH T., GHADERIAN & BAKER A.J.M. (2007): Responses to Mg/Ca balance in an Iranian serpentine endemic plant, *Cleome heratensis* (Capparaceae) and a related non-serpentine species, *C. foliolosa*. – *Plant and Soil* 293: 49-59
- BENTO M., PEREIRA H.S., ROCHETA M. GUSTAFSON P., VIEGAS W. & SILVA M. (2008): Polyploidization as a retraction force in plant geonome evolution: sequence rearrangements in *Triticale*. – *PLoS ONE* 3(1): 1-11
- BRADY K.U., KRUCKEBERG A.R. & BRADSHAW H.D. (2005): Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. – *Annual review of ecology, evolution and systematics* 36: 243-266
- BRATTELER M., WIDMER A., BALTISBERGER M. & EDWARDS P.J. (2002): Genetic architecture of traits associated with habitat adaptation in *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae). – *Bulletin of the Geobotanical Institute ETH* 68: 95-103
- BRATTELER M., BALTISBERGER M. & WIDMER A. (2006): QTL analysis of intraspecific differences between two *Silene vulgaris* ecotypes. – *Annals of Botany* 98:411-419
- BRATTELER M., LEXER C. & WIDMER A. (2006): Genetic architecture of trakte associated with serpentine adaptation of *Silene vulgaris*. – *Journal of Evolutionary biology* 19: 1149-1156
- BROCHMANN C., BRYSTING A.K., ALSOS I.G., BORGEN L., GRUNDT H.H., SCHEEN A.-C. & ELVEN R. (2004): Polyploidy in arctic plants. – *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 521-536
- DOLEŽEL J., GREILHUBER J. & SUDA J. (2007): Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes. – *Wiley-VCH, Weinheim*
- DORTOVÁ M. (2009): Ekologická odpověď *Knautia arvensis* na hadcový substrát. – Bc. thesis [Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích]
- DUDIĆ B., RAKIĆ T., ŠINŽAR-SEKULIĆ J., ALTANACKOVIĆ V. & STEVANOVIĆ B. (2007): Differences of metal concentrations and morpho-anatomical adaptations between obligate and facultative serpentinophytes from Western Serbia. – *Archives biological sciences* 59: 341-349

- EHRENDORFER F. (1958): Die geographische and ökologische Entfaltung des europäisch-alpinen Polyploidkomplexes *Galium anisophyllum* Vill. seit Beginn des Quartärs. *Uppsala Universitets Arsskrift* 6: 176-181
- EHRENDORFER F. (1962): Cytotaxonomische Beiträge zur Genese der mittel-europäischen Flora und Vegetation. – *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 75: 137–152.
- EHRENDORFER F. (1980): Polyploidy and distribution. In: Lewis W.H. [ed.]. Polyploidy, biological relevance. New York: *Plenum*: 45-60
- FITZSIMON M.S. & MILLER R.M. (2010): Serpentine soil has little influence on the root-associated microbial community composition of the serpentine tolerant grass species *Avenula sulcata*. – *Plant and Soil* 330: 393-405
- GABBRIELLI R. & PANDOLFINI T. (1984): Effect of Mg²⁺ and Ca²⁺ on the response to nickel toxicity in a serpentine endemic and nickel-accumulating species. – *Physiologia plantarum* 62: 540-544
- GONNELLI C., GALARDI F. & GABBRIELLI R. (2001): Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. – *Physiologia plantarum* 113: 507-514
- HARRISON S., SAFFORD H.D. GRACE J. B. VIERS J. H. & DAVIES K. F. (2006): Regional and local species richness in an insular environment: serpentine plants in California. – *Ecological monographs* 76: 41-56
- HUGHES R., BACHMANN K., SMIRNOFF N. & MACNAIR M.R. (2001): The role of drought tolerance in serpentine tolerance in the *Mimulus guttatus* Fischer ex DC. complex. – *South African Journal of Science* 97: 581-586
- CHANEY R.L., CHEN K., LI Y., ANGLE J.S. & BAKER A.J.M. (2008): Effect of calcium on nickel tolerance and accumulation in *Allysum* species and cabbage grown in nutrient solution. – *Plant and Soil* 311: 131-140
- JOHNSTON W.R. & PROCTOR J. (1981): Growth of serpentine and non-serpentine races of *Festuca rubra* in solutions simulating the chemical conditions in a toxic serpentine soil. – *Journal of Ecology* 69: 855-869
- KAPLAN Z. (1998): Relikt serpentine populations of *Knautia arvensis* s. l. (*Dipsacaceae*) in the Czech Republic and an adjacent area of Germany. – *Preslia* 70: 21-31
- KAZAKOU E., DIMITRAKOPOULOS P.G., BAKER A.J.M., REEVES R.D. & TROUMBIS A.Y. (2008): Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. – *Biological reviews* 83: 495-508

- KOLÁŘ F. (2007): Metodické přístupy ke studiu evoluční historie reliktních hadcových populací *Knautia arvensis*. – Bc. thesis [Katedra Botaniky Přírodovědecké fakulty JČU], České Budějovice
- KOLÁŘ F., ŠTECH M., TRÁVNÍČEK P. RAUCHOVÁ J., URFUS T., VÍT P., KUBEŠOVÁ M. & SUDA J. (2009): Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (*Dipsacaceae*) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. – *Annals of Botany* 103(6): 963-974
- KRAHULCOVÁ A. & ŠTĚPÁNKOVÁ J. (1998): Serpentine and polyploid differentiation within *Galium pumilum* agg. (*Rubiaceae*) in eastern c. Europe. – *Folia geobotanica* 33: 87-102
- KRUCKEBERG A.R. (1954): The ecology of serpentine soils: A symposium III. Plant species in relation to serpentine soils. – *Ecology* 35: 268-274
- KRUCKEBERG A.R. (1984): California serpentine soils: flora, vegetation, geology, soils and management problems. – University of California Press.
- KUCOWA I. & MADALSKI J. (1964): New localities of *Galium valdepilosum* H. Braun in Poland. – *Fragmenta floristica et geobotanica*: 1-8
- LAZARUS B.E., RICHARDS J.H., CLAASSEN V.P., O'DELL R.E. & FERREL M.A (2010): Species specific plant-soil interactions influence plant distribution on serpentine soil. – *Plant and Soil*: 1-18
- LEVIN D.A. (2002): The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford series in ecology and evolution. New York: Oxford University Press
- LLUGANY M., LOMBINI A., POSCHENRIEDER CH., DINELLI E. & BARCELÓ J. (2003): Different mechanisms account for enhanced copper resistance in *Silene armeria* ecotypes from mine spoil and serpentine sites. – *Plant and Soil* 251: 55-63
- LOMBINI A., LLUGANY M., POSHENRIEDER CH., DINELLI E. & BARCELÓ J. (2003): Influence of the Ca/Mg ration on Cu resistance in three *Silene armeria* ecotypes adapted to calcareous soil or to different, Ni- or Cu-enriched, serpentine sites. – *Journal of Plant physiology* 160: 1451-1456
- MAIN J.L. (1981): Magnesium and calcium nutrition of a serpentine endemic grass. – *American midland naturalist* 105: 196-199
- MEYERS L.A. & LEVIN D.A. (2006): On the abundance of polyploids in flowering plants. – *Evolution* 60(6): 1198-1206

- MEIMBERG H., RICE K.J., MILAN N.F., NJOKU C. & MCKAY J.K. (2009): Multiple origins promote the ecological amplitude of allopolyploid *Aegilops* (*Poaceae*). – *American Journal of Botany* 96(7): 1262-1273
- MESJASZ-PRZYBYLOWICZ J., BARNABAS A. & PRZYBYLOWICZ W. (2007): Comparison of cytology and distribution of nickel in roots of Ni-hyperaccumulating and non-hyperaccumulating genotypes of *Senecio coronatus*. – *Plant and Soil* 293: 61-78
- MURREN C.J., DOUGLASS L., GIBSON A. & DUDASH M. (2006): Individual and combined effects of Ca/Mg ratio and water on trait expression in *Mimulus guttatus*. – *Ecology* 87: 2591-2602
- NAGY L. & PROCTOR J. (1997): Soil Mg and Ni as causal factors of plant occurrence and distribution at the Meikle Kilrannoch ultramafic site in Scotland. – *New Phytologist* 135: 561-566
- NAGY L. & PROCTOR J. (1997): Plant growth and reproduction on a toxic alpine ultramafic soil: adaptation to nutrient limitation. – *New Phytologist* 137: 267-274
- NYBERG BERGLUND A.B., SAURA A. & WESTERBERGH A. (2001): Genetic differentiation of polyploid plant on ultramafic soils in Fennoscandia. – *South African Journal of Science* 97: 533-535
- NYBERG BERGLUND A.B., DAHLGREN S. & WESTERBERGH A. (2003): Evidence for parallel evolution and site-specific selection of serpentine tolerance in *Cerastium alpinum* during colonization of Scandinavia. – *New Phytologist* 161: 199–209
- NYBERG BERGLUND A.B. (2005): Postglacial colonization and parallel evolution of metal tolerance in the polyploid *Cerastium alpinum*. – Doc. thesis [Swedish university of agricultural sciences], Uppsala
- ONDRUŠKOVÁ J. (2010): Identifikace kandidátních genů rezistence u rodu *Silene*. – Ms. thesis [Ústav biologie rostlin Agronomické fakulty Mendlovy univerzity v Brně], Brno
- PIOTROWICZ M. (1958): Karyological studies in some species of the genus *Galium* L. – *Acta Biologica Cracoviensia* 1: 159-169
- OTTO S.P. & WHITTON J. (2000): Polyploid incidence and evolution. – *Annual review of genetics* 34: 401-437
- RAJAKARUNA N. & BAKER A.J.M. (2004): Serpentine: a model habitat for botanical research in Sri Lanka – *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)* 32: 1-19

- RAJAKARUNA N., SIDDIQI M.Y., WHITTON J., BOHN B.A. & GLASS A.D.M. (2003): Differential responses to Na^+/K^+ and Ca^+/Mg^+ in two edaphic races of the *Lasthenia californica* (Asteraceae) complex: A case for parallel evolution of physiological traits. – *New Phytologist* 157: 93-103
- ROBERTSON A.I. (1985): The poisoning of roots of *Zea mays* by nickel ions, and the protection afforded by magnesium and calcium. – *New phytologist* 100: 173-189
- SCHAT H. & TEN BOOKUM W.M. (1992): Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*. – *Heredity* 68: 219-229
- SCHAT H., KUIPER E, TEN BOOKUM W. M. & VOOIJS R. (1993): A general model for the genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*: evidence from crosses between plants from different tolerant populations. – *Heredity* 70: 142-147
- SPECHT A., FORTH F. & STEENBEEKE G. (2001): The effect of serpentine on vegetation structure, composition and endemism in northern New South Wales, Australia. – *South African Journal of Science* 97: 521-529
- SUDA J. (2005): Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. – *Živa* 53/1: 46-48.
- ŠOURKOVÁ M. (2003): *Oberna* ADANSON – měchýřnatka, silenka. – In Slavík B. (ed.) Květena České republiky 2: 180-184
- ŠTĚPÁNEK J. (1997): *Knautia* L. – chrastavec. – In: Slavík B. (ed.) Květena České republiky 5: 543-554, Academia, Praha.
- ŠTĚPÁNKOVÁ J. (1997): The effect of serpentine on morphological variation in the *Galium pumilum* group (Rubiaceae). – *Thaiszia* 7: 29-40
- ŠTĚPÁNKOVÁ J. (2000): *Galium* L. – svízel. – In: Slavík B. (ed.) Květena České republiky 6: 122-156, Academia, Praha.
- VAN HOOF N.A.L.M., HASSINEN V.H., HAKVOORT H.W.J., BALLINTIJN K.F., SCHAT H., VERKLEIJ J.A.C, ERNST W.H.O., KARENLAMPI S.O. & TERVAHAUTA A.I. (2001): Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (MOENCH) GARCKE populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. – *Plant Physiology* 126: 1519-1526
- VLAMIS J. & JENNY H. (1948): Calcium deficiency in serpentine soils as revealed by absorbent technique. – *Science* 107: 549
- WALKER R.B., WALKER H.M. & ASHWORTH P.R. (1954): Calcium-magnesium nutrition with special reference to serpentine soils. – *Plant physiology* 30: 214-221

- WESTERBERGH A. & SAURA A. (1992): The effect of serpentine on the population structure of *Silene dioica* (Caryophyllaceae). – *Evolution* 46: 1537-1548
- WESTERBERGH A. (1994): Serpentine and non-serpentine *Silene dioica* plants do not differ in nickel tolerance. – *Plant and Soil* 167: 297-303
- WRIGHT J.W. (2007): Local adaptation to serpentine soils in *Pinus ponderosa*. – *Plant and Soil* 293: 209-217

Seznam příloh:

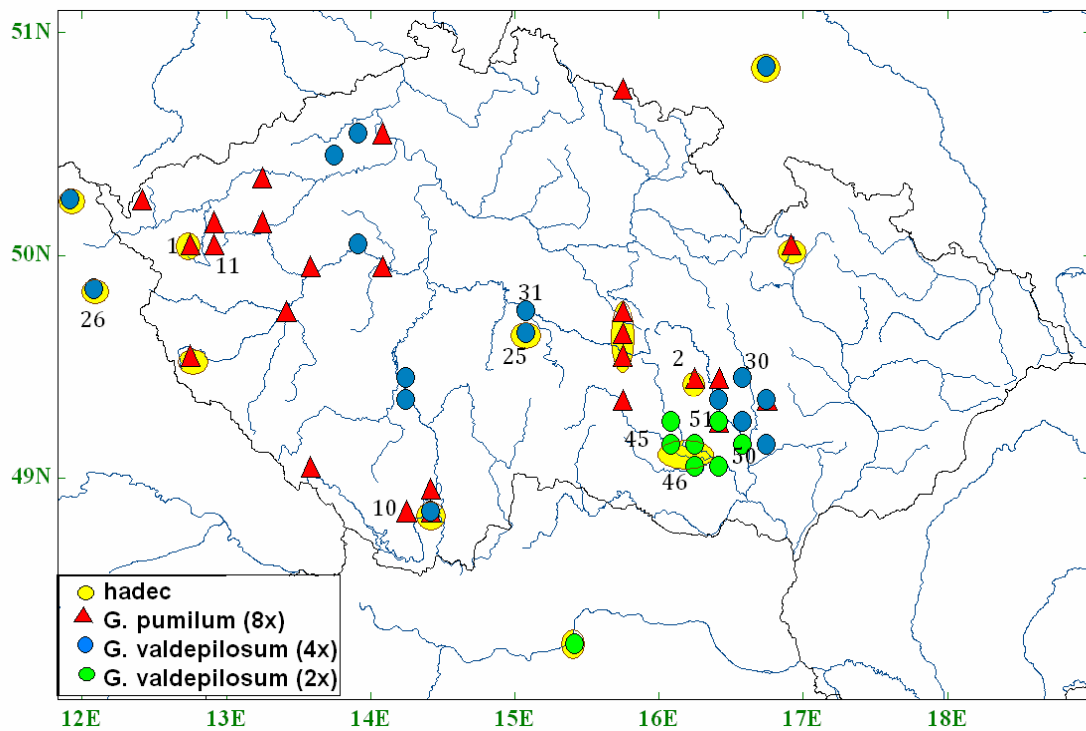
Příloha č. 1: Mapa rozšíření *Galium pumilum* a *G. valdepilosum*

Příloha č. 2: Lokality pro sběr semen a měření ploidie

Příloha č. 3: Zobrazení přírůstku kořenové soustavy v závislosti na lokalitě, odkud daná rostlina pocházela

Příloha č. 4: Kultivační experiment

Příloha č. 1: Mapa rozšíření *Galium pumilum* a *Galium valdepilosum*



Pozn.: Číslo značí kódy lokalit, ze kterých byly sesbírány semínka pro experimentální pokus, detailní popis příloha č. 2.

Příloha č. 2: Lokality pro sběr semen a měření ploidie

Název	Lokalita	GPS
<i>Knautia arvensis</i> (4x), hadcové populace		
Pluhův Bor	Mnichov, světliny v boru v JZ, Z a střední části NPR Pluhův Bor, podél silnice Prameny – Bečov	50°03'16"N 12°46'46"E
Křížky	Prameny, hadcová skalka NPP Křížky, 2,1 km SV od vesnice	50°03'57"N 12°44'53"E
<i>Knautia arvensis</i> (4x), nehadcové populace		
Chanovice	louka severovýchodně od obce, směrem na Bezděkov	49°24'39"N 13°43'55"E
Aš	bývalý cvičák mezi Aší a Vernerovem	50°13'12"N 12°13'19"E
<i>Knautia arvensis</i> (2x), hadcové populace		
Staré Ransko	otevřený borový les, podél silnice kolem hranice rezervace Ranská Jezírka, 2 km S od vesnice	49°39'44"N 15°49'41"E
Borovsko	borový les se sklaními výchozy, nad přehradou Želivka, 2 km J od vesnice	49°40'59"N 15°07'49"E
<i>Knautia arvensis</i> (2x), hadcové populace		
Lajdovci (SK)	Prašník, louka vedle odbočky do Pusté Vsi, od silnice Vrbové - Březová pod Bradlom	48°38'30"N 17°39'00"E
Lučina	přímo v areálu autocampu Lučina, JV od vesnice Tvarožná Lhota	48°52'05"N 17°22'18"E
Název	Lokalita	GPS
<i>Silene vulgaris</i>, hadcové populace		
Borovsko	borový les se sklaními výchozy, nad přehradou Želivka, 2 km J od vesnice	49°41'18"N 15°06'14"E
Holubov	otevřený borový les na levém břehu Křemžského potoka, 1 km východně od obce Holubov	48°53'47"N 14°19'45"E
Lhánice	otevřený bor, nad lesní silnicí z Dolního mlýnu do Lhánic, 1,4 km JZ od vesnice	49°04'48"N 16°15'29"E
<i>Silene vulgaris</i>, nehadcové populace		
Bukovec	na osluněných místech, podél cyklostezky vedle železniční tratě Chrást - Plzeň-Doubravka	49°46'16"N 13°26'10"E
Ždánice	osluněný trávník	49°03'41"N 17°01'55"E
Jaroměř	v travinných lemech podél silničních cest v centru pevnosti Josefov	50°20'22"N 15°55'52"E

Kód	Název	Lokalita	GPS
<i>Galium pumilum</i> (8x), hadcové populace			
1 MD	Mnichov	okraj lesa, 1,5 km severně od vesnice Mnichov	50°03'02"N 12°47'18"E
2 MD	Věžná	skalní výchoz v otevřeném borovém lese, 0,5 km JV od nádraží Věžná	49°26'47"N 16°16'19"E
3	Holubov	borový les blízko Holubova	48°53'30"N 14°20'30"E
4 KŠ	Polná	borový les, 2 km SZ od vesnice Polná	49°30'15"N 15°41'10"E
5 KŠ	Hvoždany	pastviny 0,7 km S od obce obce Hvoždany	49°30'30"N 12°46'45"E
6 KŠ	Šlapanov	skalní výchozy, 1 km JV od obce Šlapanou	49°32'00"N 15°40'20"E
7 KŠ	Chotěboř	opuštěný lom, 0,8 km JV od obce Chotěboř	49°42'45"N 15°40'00"E
8 KŠ	Staré Ransko	skalní výchozy, 1,7 km od vesnice S. Ransko	49°39'50"N 15°49'30"E
9 KŠ	Raškov	skalní výchozy, 1,5 km SZ od Raškova	50°02'30"N 16°53'30"E
<i>Galium pumilum</i> (8x), nehadcové populace			
10 MD	Třísov	slunná mez, okraj doubravy, u zastávky Třísov	48°52'58"N 14°21'04"E
11 MD	Popovice	prosvětlený okraj lesa, 250 m JZ od kaple ve vesnici	50°01'17"N 12°48'29"E
12	Druztová	skalní výchoz nad řekou Berouňkou, rezervace Háj, podél žluté turistické stezky, 1,3 km J od vesnice	49°46'58"N 13°26'52"E
13	Liblín	na prudkém svahu na pravém břehu Berouňky, 800 m V od Liblínského mostu	49°55'09"N 13°33'22"E
14	Svinná	na mírném svahu, levý břeh potoka, 1,5 km S od pozůstatků Nový mlýn, podél červené turistické stezky	49°54'47"N 13°35'36"E
15	Úhošťany	jižní svah rezervace Úhošť, 700 m severně od silnice do Úhošťan	50°21'41"N 13°15'14"E
16 KŠ	Portášky	Krkonoše, 500 m severně od obce Velká Úpa	50°42'00"N 15°46'15"E
17 KŠ	Prackovice	České středohoří, okraj lomu, 1,1 km severovýchodně od Prackovic	50°34'30"N 14°01'00"E
18 KŠ	Kvilda	Šumava, horská louka blízko trasy Kvilda – Vilémov	49°00'45"N 13°35'30"E
19 KŠ	Poutnov	skalní výchozy, 0,5 km jihozápadně od vesnice	50°01'00"N 12°50'50"E
20 KŠ	Nový Kostel	okraj lesa, 0,7 km jihozápadně od vlakové zastávky Nový Kostel	50°13'10"N 12°25'00"E
21 KŠ	Jedovnice	okraj lesa, blízko rybníku, 0,8 km jižně od vesnice	49°20'15"N 16°45'20"E

22 KŠ	Koněprusy	Český kras, skalní stěna blízko silnice, 2 km SZ od Koněprus	49°56'00"N 14°02'45"E
23	Jamné	jížní svah na levém břehu řeky Vltavy, 0,8 km od obce Jamné	48°54'01"N 14°24'27"E
24	Malé u Brtnice	lesní světlina na hraně svahu nad řekou Brtnicí, 0,6 km SZ od vesnice	49°20'04"N 15°41'52"E

***Galium valdepilosum* (4x), hadcové populace**

25 MD	Borovsko	plochá část světlého boru, záp. svah Sedlického potoka, S od dálničního mostu, 2,5 km Z od obce Bernartice	49°41'18"N 15°06'14"E
26 MD	Erbendorf (D)	skalní výchozy v otevřeném borovicovém lese, 2 km SZ od vesnice	49°51'24"N 12°01'53"E
27	Radunia (PL)	otevřený dubovo-borový les, skalní výchozy, 100 m J od vrcholu vrchu Radunia	50°50'10"N 16°46'37"E
28	Woja (D)	otevřený borový les vedle západního okraje hadcového lomu, 600 m J od vesnice	50°15'14"N 11°58'30"E
29	Holubov	borový les na levém břehu Křemžského potoka, 1 km V od Holubova	48°53'30"N 14°20'30"E

***Galium valdepilosum* (4x), nehadcové populace**

30 MD	Boskovice	otevřený dubový les na příkrém svahu nad řekou Bělá, 2 km JZ od hradu Boskovice	49°28'27"N 16°37'57"E
31 MD	Nesměřice	skalky a otevřená doubrava na prudkém svahu, jižní svah nad řekou Želivkou, 1,7 km SZ od vesnice	49°43'59"N 15°03'53"E
32	Brno-Obřany	světlá doubrava, svah na pravém břehu řeky Svratky, 1,2 km východně od kostela v Obřanech	49°13'33"N 16°39'51"E
33	Režný Újezd	suťový svah na severní straně kopce Boreč	50°30'56"N 13°59'18"E
34	Červená nad Vltavou	bor-dubový světlý les na hraně skal, skály na pravém břehu Hrejkovického potoka	49°23'59"N 14°14'59"E
35	Zvíkov	dubovo-borový les na hraně skal, 250 m J od hradu Zvíkov	49°26'30"N 14°11'31"E
36	Roztoky u Křivoklátu	otevřený dubový les, skalní výchoz, 600 m JV od vlakové zastávky	50°01'04"N 13°52'39"E
37	Branov	otevřený les podél silnice z vesnice do vesnice Roztoky, 600 m V od vesnice	50°00'41"N 13°51'12"E
38	Skalní mlýn	otevřené vápencové skály, 300 m JZ od Skalního Mlýnu	49°21'38"N 16°42'22"E
39	Stránská skála	severní svah kopce Stránská skála (310 m)	49°11'28"N 16°40'35"E
40 KŠ	Raná	SZ strana kopce Raná, 1 km JZ od vesnice Raná	50°24'30"N 13°46'50"E
41	Holubov	svah v borovém lese na levém břehu Křemžského potoka, 1,7 km V od Holubova	48°53'30"N 14°21'30"E
42	Zlatá Koruna	západní svah na pravém břehu řeky Vltavy, 0,6 km Z od vesnice	48°41'15"N 14°22'30"E
43	Tišnov	jižní svah kopce Květnice, 1,2 km SZ od vesnice	49°21'30"N 16°24'45"E

44 KŠ	Vilémovice	jižní svah kopce Suchý Žleb, 0,5 km SZ od vesnice	49°22'15"N 16°44'30"E
-------	------------	---	--------------------------

***Galium valdepilosum* (2x), hadcové populace**

45 MD	Mohelno	světlý hadcový bor, 1,1 km J od kostela ve vesnici Mohelno, podél silnice Dukovany – Mohelno	49°06'13"N 16°11'29"E
46 MD	Lhánice	otevřený bor, nad lesní silnicí z Dolního mlýnu do Lhánic, 1,4 km JZ od vesnice	49°04'48"N 16°15'29"E
47	Dukovany	borový les, severní svah nad řekou Jihlava, 2,3 km SV od kostela vesnice	49°05'58"N 16°10'29"E
48 KŠ	Hrubšice	borový les a skalní výchozy na pravém břehu řeky Jihlavy, 1,5 km Z od vesnice	49°05'30"N 16°17'15"E
49 KŠ	Aggasbach Dorf (A)	skalní výchozy v údolí potoka, 3,5 km Z od vesnice	48°17'N 15°23'E

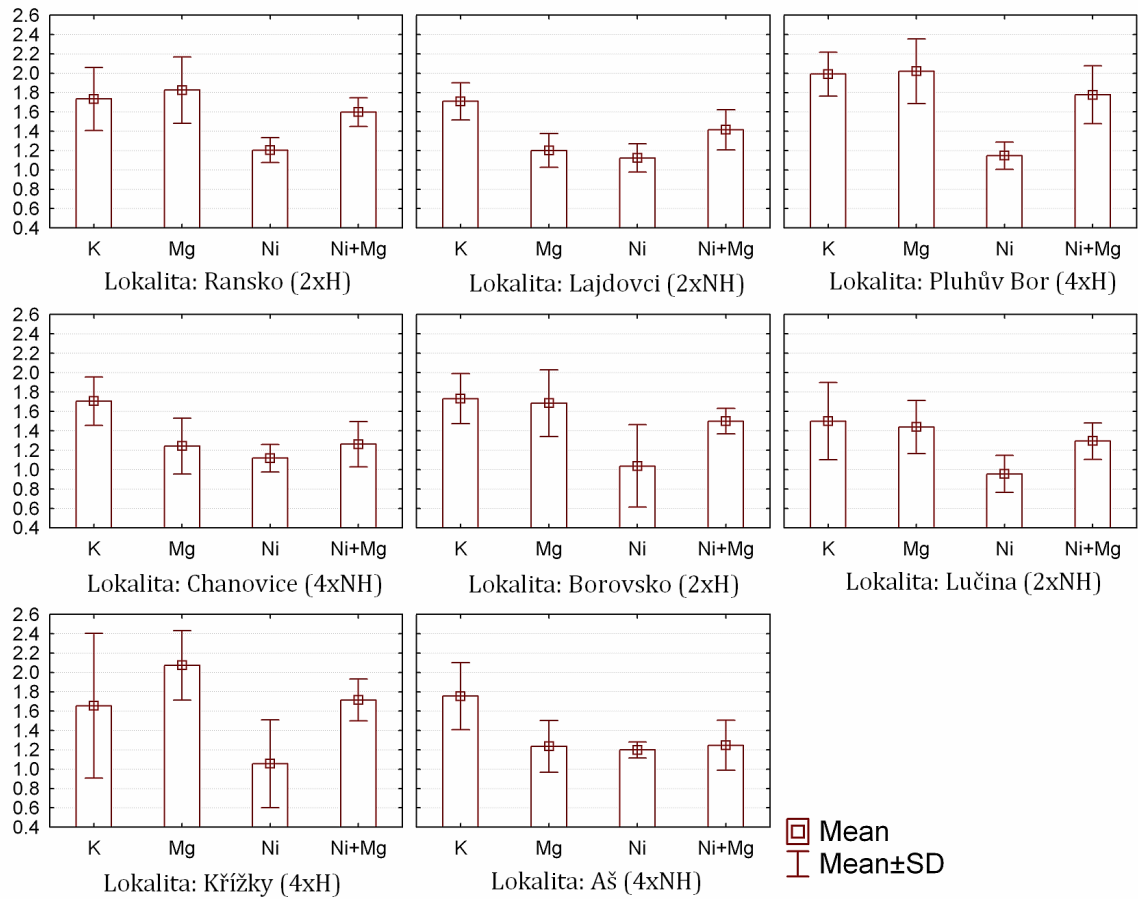
***Galium valdepilosum* (2x), nehadcové populace**

50 MD	Želešice	skalní výchoz v otevřeném lese, na pravém břehu řeky Bobravy, západní okraj lomu	49°07'26"N 16°33'15"E
51 MD	Chudčice	svah nad lesní cestou, otevřený dubový les, 1 km JV od kostela ve vesnici	49°16'41"N 16°27'43"E
52	Tasov	zřícenina hradu Dub, 1,4 km JZ od Tasova	49°16'53"N 16°04'42"E
53	Rokytná	světlá doubrava na hranici se stepí a s dubohabřinou, svah na pravém břehu řeky Rokytná	49°03'43"N 16°19'50"E
54	Březník	kamenná zídka na lesní cestou z Vlčího kopce do Březníku, hrad Lamberk	49°09'27"N 16°09'53"E
55	Sedlec	doubrava, jižní svah na pravém břehu řeky Oslavy, Sedlecký hrad	49°10'04"N 16°09'59"E
56	Jamolice	doubrava, lesní cesta ze Senohradů do hradu Templštejn, 2,5 km SZ od vesnice	49°05'39"N 16°14'56"E
57	Dolní Kounice	otevřený borový les na skalních výchozech, Šibeničný vrch na pravém břehu řeky Jihlavy	49°04'10"N 16°27'22"E
58	Mor. Bránice	otevřený dubový les na svahu, na pravém břehu řeky Jihlavy	49°04'30"N 16°24'52"E

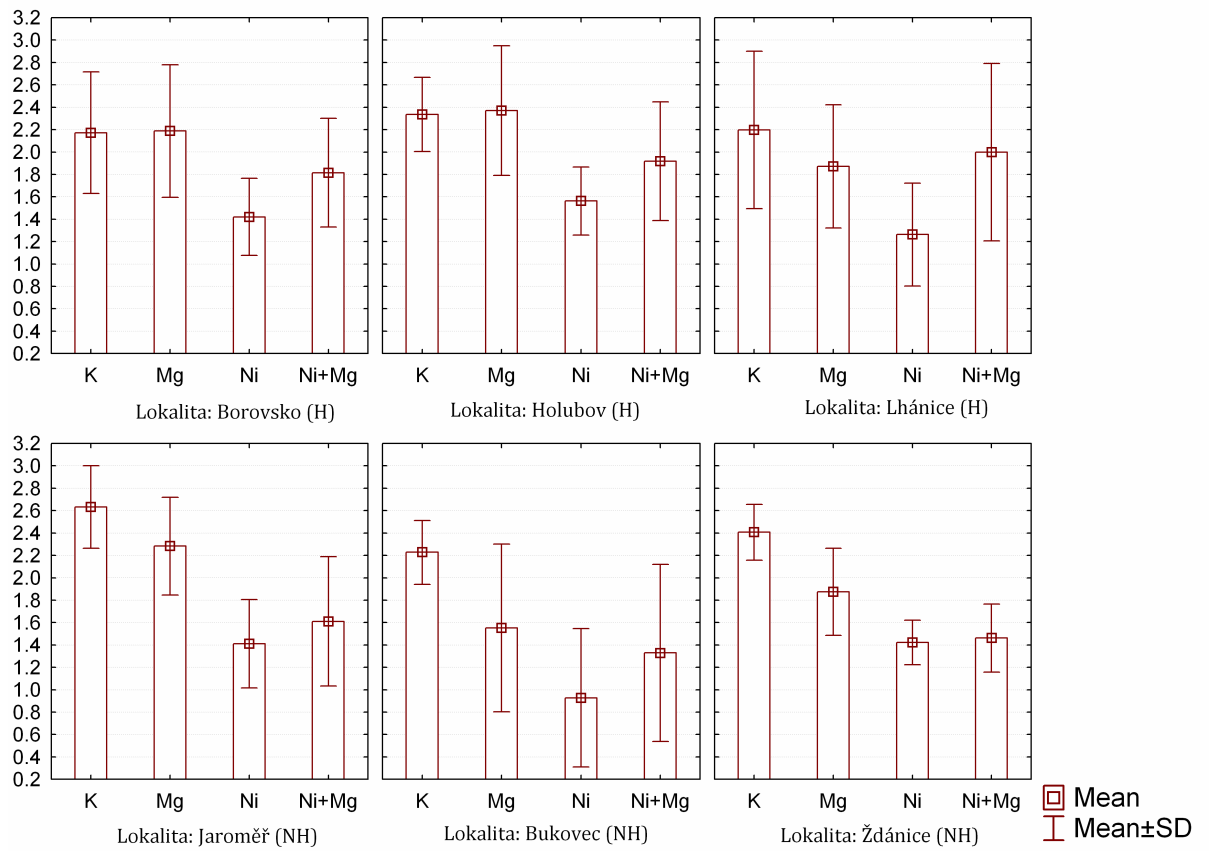
Pozn. U kódů lokalit jsou uvedeny zkratky MD a KŠ. MD značí lokality, ze kterých byla sesbírána semena pro experimentální pokus. KŠ značí lokality, které jsou excerpovány z článku KRAHULCOVÁ & ŠTĚPÁNKOVÁ (1998).

Příloha č.4: Zobrazení přírůstku kořenové soustavy v závislosti na lokalitě, odkud daná rostlina pocházela

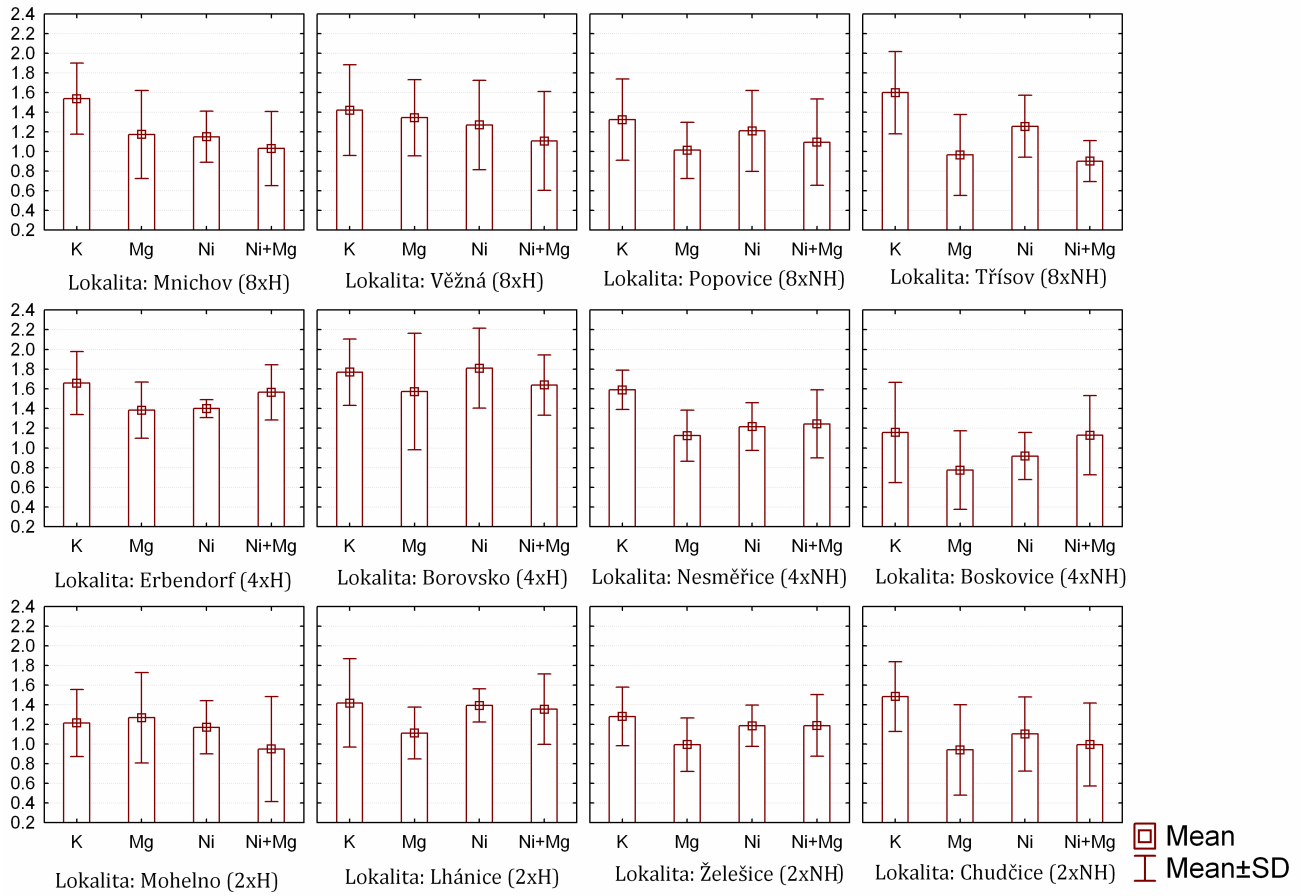
Pro *Knautia arvensis*:



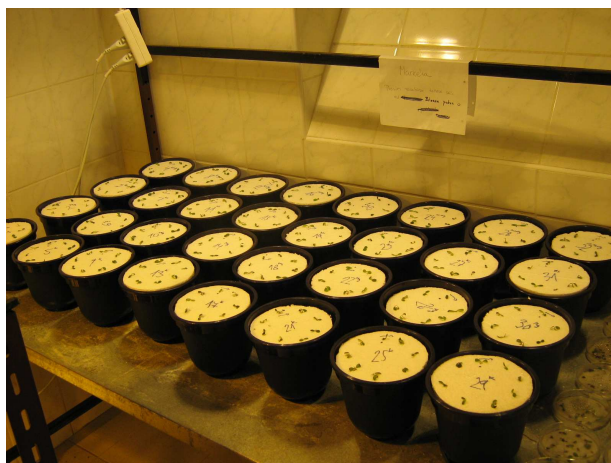
Pro Silene vulgaris:



Pro *Galium pumilum* a *G. valdepilosum*:



Příloha č. 5: Kultivační experiment



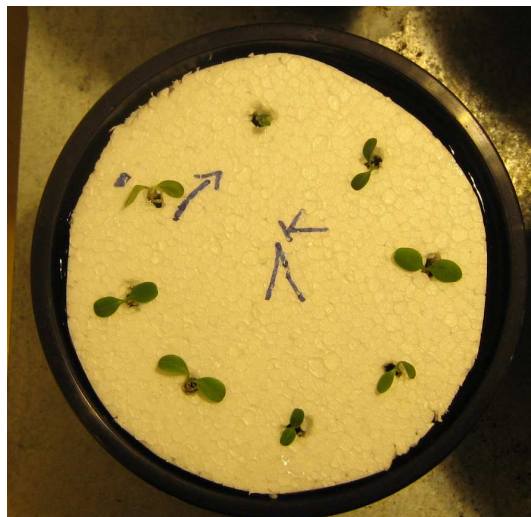
Knautia arvensis



Silene vulgaris



Galium pumilum a *Galium valdepilosum*



Vzhled pokusu: *Knautia arvensis*



Vzhled pokusu: *Silene vulgaris*



Vzhled pokusu: *Galium pumilum* a *Galium valdepilosum*