

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA EKOLOGIE



**VARIABILITA CHLOROPLASTOVÉ DNA ZÁSTUPCŮ
SKUPINY *CHENOPODIUM ALBUM* AGG.**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

VEDOUCÍ PRÁCE: DOC. MGR. BOHUMIL MANDÁK, PH.D.

DIPLOMANT: BC. TEREZA BAZGEROVÁ

2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Mgr. Bohumila Mandáka, Ph.D. V přehledu literatury jsem uvedla všechny literární prameny, publikace a zdroje, ze kterých jsem čerpala.

Ve Velkých Přílepech dne

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce panu doc. Mgr. Bohumilu Mandákovi, Ph.D. za vlídný přístup, poskytnutou literaturu a cenné rady. Mgr. Petru Vítovi za trpělivost, věnovaný čas a za laskavé vedení v laboratoři a při zpracování dat. Mgr. Karolu Krakovi, PhD. za podnětné rady ohledně fylogenetiky. Velký dík patří celé mé rodině a přátelům za jejich bezmeznou podporu a důvěru.

Tato studie mohla vzniknout díky grantu GA13-02290S.

Abstrakt

V diplomové práci byla pomocí sekvenování analyzována variabilita v cpDNA u vybraných jedinců ze skupiny *Chenopodium album* agg. Rod *Chenopodium* je velmi proměnlivý a zahrnuje okolo 170 druhů, z nichž některé jsou od sebe navzájem těžko rozlišitelné a navíc u nich dochází ke vzájemnému křížení. Bylo analyzováno 48 jedinců 10 druhů ze skupiny *Chenopodium album* agg. o různých stupních ploidie – diploid ($2n = 2x = 18$), tetraploid ($2n = 4x = 36$) a hexaploid ($2n = 6x = 54$). K určení nejvariabilnějších chloroplastových markerů byly nejprve získány sekvence ze 7 jedinců 6 různých druhů ze skupiny *Chenopodium album* agg. zastupujících všechny tři ploidie. Na cpDNA získanou z těchto 7 jedinců byly aplikovány chloroplastové markery *rpl32-trnL*, *trnQ-5'rps16*, *3'trnV-ndhC*, *ndhF-rpl32*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA*, *3'rps16-5'trnK*, *atpI-atpH*, *petL-psbE* a *trnD-trnT*. Na základě výsledků ze sekvenování byly vybrány čtyři nejvariabilnější chloroplastové markery. K sestavení fylogenetických stromů byly použity sekvence 44 jedinců ze skupiny *Chenopodium album* agg. Na základě sestavení fylogenetických stromů a haplotypových sítí bylo u příbuzných hexaploidních i tetraploidních druhů zjištěno několik různých haplotypů. Diploidní druhy *C. suecicum* a *C. ficifolium* naproti tomu mají stabilně jeden haplotyp. Byl potvrzen původ hexaploidního *C. album* jako možného potomka tetraploida *C. strictum* anebo *C. striatiforme* po mateřské linii.

Klíčová slova: cpDNA, *Chenopodium*, fylogeneze, hybridizace.

Abstract

This thesis is analyzing the variability in chloroplast DNA by sequencing selected individuals from the group *Chenopodium album* agg. The genus *Chenopodium* is highly variable and includes about 170 species, some of them are hardly differentiated from each other and mutual crossing also occurs. 48 subjects were analyzed from 10 kinds of group *Chenopodium album* agg. with various levels of ploidy - diploid ($2n = 2x = 18$), tetraploid ($2n = 4x = 36$) and hexaploid ($2n = 6x = 54$). 7 individuals from 6 kinds of *Chenopodium album* agg. group including all three ploidy levels were sequenced in order to find the most variable chloroplast markers. To the cpDNA obtained from these 7 individuals were applied the following chloroplast markers: *rpl32-trnL*, *trnQ-5'rps16*, *3'trnV-ndhC*, *ndhF-rpl32*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA*, *3'rps16-5'trnK*, *atpI-atpH*, *petL-psbE* and *trnD-trnT*. Four most variable chloroplast markers were selected on the basis of the sequencing results. To

construct phylogenetic trees there were used sequences from 44 individuals from the *Chenopodium album* agg. group. Based on the construction of phylogenetic trees and haplotype networks it was found that related hexaploid and also tetraploid species create several different haplotypes. On the other hand, diploid species *C. suecicum* and *C. ficifolium* have stably one haplotype. Possible maternal origin of hexaploid *C. album* was confirmed as a descendant of tetraploid *C. strictum* or *C. striatiforme*.

Keywords: cpDNA, *Chenopodium*, phylogenesis, hybridization.

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE	11
2.1 Úvod	11
2.1.1 Pojetí druhu	11
2.2 Evoluční mechanismy zvyšující variabilitu v genomu	12
2.2.1 Mutace	12
2.2.2 Hybridizace.....	14
2.2.3 Polyploidie	15
2.2.4 Vliv polyploidizace na velikost genomu	19
2.2.5 Určení velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie	20
2.3 Charakteristiky skupiny <i>Chenopodium album</i> agg.	20
2.3.1 Morfologie druhu.....	20
2.3.2 Výskyt a význam v krajině	20
2.3.3 Areály rozšíření druhů skupiny <i>Chenopodium album</i> agg.	22
2.3.4 Polyploidní komplex <i>Chenopodium album</i> agg.	24
2.3.5 Fylogenetická klasifikace	24
2.4 Dědičnost a determinace mateřských linií	27
2.4.1 Nemendelistická dědičnost	27
2.4.2 Determinace příbuznosti na základě uniparentální dědičnosti.....	27
2.4.3 Chloroplastová DNA	28
2.5 Techniky molekulární biologie	29
2.5.1 PCR.....	29
2.5.2 Měření koncentrace DNA	29
2.5.3 Sekvenování.....	30
3. CÍLE PRÁCE	31
4. METODIKA	32
4.1 Rostlinný materiál	32
4.2 Kontrola a ředění DNA.....	33
4.3 PCR.....	33
4.4 Purifikace PCR produktu a sekvenování.....	35
4.5 Analýzy získaných sekvencí	35
4.6 Výběr nejvariabilnějších chloroplastových markerů.....	36
4.7 Tvorba haplotypové sítě	36
4.8 Tvorba fylogenetického stromu	37
4.8.1 Metoda Neighbour – Joining	37

4.8.2	Metoda Maximum Parsimony	37
5.	VÝSLEDKY	37
5.1	Naměřená koncentrace DNA a poměr absorbancí.....	37
5.2	Analýzy sekvencí	37
5.3	Výběr nejvariabilnějších chloroplastových markerů.....	38
5.3.1	Nukleotidová diverzita mezi chloroplastovými markery	38
5.4	Haplotypové sítě.....	40
5.5	Fylogenetické stromy.....	44
5.5.1	Metoda Neighbour – Joining	44
5.5.2	Metoda Maximum Parsimony	44
6.	DISKUSE	46
7.	ZÁVĚR	51
8.	PŘEHLED LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	53
9.	PŘÍLOHY	63

1. ÚVOD

Diplomová práce se věnuje posouzení variability chloroplastové DNA (cpDNA) a následné determinaci polyploidních hybridů zástupců skupiny *Chenopodium album* agg. Celosvětově rozšířený rod *Chenopodium* L. zahrnuje okolo 170 druhů (Chu et al., 2003). Často se jedná o velmi proměnlivé druhy, což znesnadňuje přesnou determinaci jen na základě morfologických znaků (Dostálek et al., 2003). Zvláště druhy skupiny *Chenopodium album* agg. se vyznačují vysokou variabilitou ve tvaru listů, květů i semen (Aellen et Just, 1943; Kühn, 1993; Clements et Mosyakin, 2003). Taxonomická klasifikace skupiny je problematická vzhledem k přítomnosti autogamie (samoopylení), vysoké fenotypové plasticitě zástupců a výskytu tří ploidních hladin. U skupiny *Chenopodium album* agg. se vyskytují diploidi ($2n = 2x = 18$), tetraploidi ($2n = 4x = 36$) a hexaploidi ($2n = 6x = 54$). V současnosti se skupině *Chenopodium album* agg. věnuje mnoho fylogenetických studií, které se zaměřují na tyto polyploidní taxony. Zvláště studium cpDNA a ITS (internal transcribed spacer) oblastí jaderné DNA přináší nové poznatky o fylogenezi celého rodu *Chenopodium*. Velkou roli v evoluci tohoto taxonu hrála hybridizace a polyploidizace.

Studovanými druhy byli zástupci skupiny *Chenopodium album* agg., nasbíraní na území střední a jihovýchodní Evropy a Ruska s různými stupni ploidie. Praktická část prezentuje vlastní sběr dat – extrakci DNA z rostlinného materiálu, přípravu vzorků k amplifikaci cpDNA pomocí metody PCR a následně k sekvenování nekódujících úseků cpDNA. Předkládá výsledky analýz sekvencí a určení pravděpodobného mateřského předka *Chenopodium album*. Výsledky umožnily zodpovědět otázky týkající se variability v cpDNA v rámci skupiny *Chenopodium album* agg. a zjistit do jaké míry jsou studované polyploidní taxony stabilní. Práce má za úkol shrnout současné poznatky o evolučním vývoji rodu *Chenopodium* a popsat, jaký vliv měla hybridizace a polyploidizace na variabilitu v cpDNA.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Úvod

Historický vývoj studia genetické proměnlivosti byl určen dostupnými vědeckými metodami a limitován vyspělostí techniky. Nejprve mohli biologové studovat pouze fenotyp (soubor pozorovatelných charakteristik živého organismu), který je výsledkem spojení vlivu prostředí a genotypu jedince. Koncem devatenáctého století s nástupem kvalitnějších mikroskopů mohli začít studovat nižší jednotky – jednotlivé buňky, poté buněčné organely a později i chromozomy v nich obsažené (Briggs et Walters, 2001). Dvacáté století s vývojem potřebné techniky umožnilo odvozovat genetické a fylogenetické vztahy například prostřednictvím studia sekundárních metabolitů rostlin (Harborne, 1973). S nástupem moderních molekulárních metod se daří rekonstruovat proces fylogeneze a díky využití informace z DNA (deoxyribonukleová kyselina) se dají vymezit příbuzenské vztahy mezi jednotlivými organismy (Crawford, 1990; Briggs et Walters, 2001; Kolář et al., 2012).

2.1.1 Pojetí druhu

Latinský ekvivalent pojmu druh „*species*“ lze také přeložit jako „typ“, „vzhled“ nebo „vzezření“. Označení „druh“ je možno chápat v mnoha významech. Pro taxonomii je cílem vytvořit přehlednou a snadno použitelnou klasifikaci organismů, jež bude sloužit biologům v mnoha vědních oborech. „Druhy“ lze tímto pohledem chápat jako klasifikační jednotky vytvořené biologii na základě všech dostupných informací. Typy organismů lze hierarchicky uspořádat do taxonomické klasifikace, kdy druhy jsou slučovány do rodů, rody do čeledí a každá vyšší skupina obsahuje jednoho nebo několik zástupců nižšího řádu. Existují dva základní systémy rozřazení druhů: „umělý“ (na základě morfologických znaků) a „přirozený“ (na základě fylogenetických znaků). V poslední době se upouští od umělých systémů kvůli výsledkům získaným pomocí molekulárních metod (Briggs et Walters, 2001). Univerzální definice druhu v současnosti neexistuje.

Typologický druh můžeme chápat jako koncepci z 19. století, která rozlišuje „typy“ rostlin a předpokládá neměnnost všech druhů. Jeden z prvních kroků k moderní taxonomii učinil John Ray, jenž ve své práci *Historia Plantarum* (1686) definoval druh jako skupinu rostlin plodících v mezích své proměnlivosti stejnorodé potomstvo. Odmítá transmutace, ale připouští vnitrodruhovou variabilitu vzniklou

dílem náhody. Počet druhů je v tomto pojetí neměnný od doby, kdy je stvořil Bůh (Briggs et Walters, 2001 ex. Ray, 1686).

Biologický druh vychází z ekologického chápání pojetí druhů a je definován jako soubor populací s unikátním evolučním původem. Druh je charakterizován stejnými specifickými vlastnostmi (fyziologie, morfologie, genetické vlastnosti). Rozmnožující se jedinci plodí za standardních podmínek fertilní potomstvo a od ostatních druhů jsou reprodukčně izolováni (Mayr, 2009). V tomto pojetí byl biologický druh definován na základě studia živočichů, u rostlin jej nelze tak dobře použít kvůli přítomnosti apomixie (nepohlavní rozmnožování semeny) a autogamie (samoopylení) (Levin, 1979).

Fylogenetický druh předpokládá u organismů monofyletismus, tedy stav, kdy skupina organismů zahrnuje společného předka a všechny jeho potomky v jedné fylogenetické linii. Druh je vymezen na základě odlišnosti od ostatních studovaných jedinců ve fylogenetickém schématu (Hennig, 1982). Moderní výzkum umožňuje na základě využití molekulárních metod sestavit fylogenetický vývoj druhu a přesně vymezit příbuzenské linie (Briggs et Walters, 2001).

2.2 Evoluční mechanismy zvyšující variabilitu v genomu

2.2.1 Mutace

Mutace jsou evoluční změny v genetické informaci a zároveň proces (jinak mutageneze), během kterého tyto změny vznikají (Snustad et Simmons, 2009). Pro biologickou evoluci jsou mutace nepostradatelné, jinak by vývoj organismů ustrnul na určitém vývojovém stupni. Mutace ve struktuře DNA může mít jak negativní, tak i pozitivní vliv na svého nositele, mutace tedy nelze považovat pouze za chyby. Ve skutečnosti je mutageneze složitým mechanismem umožňujícím organismům adaptovat se na změny okolí (Flegr, 2009). Mutace patří mezi pozvolné speciace (Briggs et Walters, 2001; Flegr, 2009).

Mutace se dělí podle vlivu, jakým působí na zdatnost svého nositele. Rozlišují se mutace pozitivní (výhodné), negativní (nevýhodné, škodlivé) a selekčně neutrální (bez ovlivnění biologické zdatnosti) (Flegr, 2009).

Podle fyzické povahy se mutace dělí na čtyři typy: genové (bodové), mutace na úrovni úseků DNA (řetězcové), chromozomové a genomové. **Genové mutace**, jinak nazývané bodové, představují záměnu na jednotlivých nukleotidech, kdy dojde ke

změně pořadí nukleotidových bází pomocí inserce či delece nebo záměnou báze za jinou (Chloupek, 2008). Při inserci (vlození) a deleci (vypuštění) dochází ke změně počtu nukleotidů na určitém místě DNA. Záměna nukleotidu s pyrimidinovou bází (C, T) za purinovou bázi (A, G) se nazývá transverze a záměna báze za stejný typ báze je tranzice. **Mutace v řetězci DNA** se rozdělují na delece, inserce, duplikace, translokace a inverze. Delece zkracují v řetězci určité části DNA, zatímco inserce a duplikace úseky DNA zmnožují. Při translokaci se mění pozice určitého úseku DNA v genomu. U reciproké translokace si vzájemně vymění místa dva úseky DNA na dvou chromozomech. Při inverzi dochází k vystřížení úseku DNA, jeho převrácení do opačného pořadí a vložení na původní místo. **Chromozomové mutace** jsou mutace na úrovni jednotlivých chromozomů. Rozsáhlé chromozomální translokace mohou vést k fúzi nebo rozpadu celých chromozomů. Tyto translokace mohou změnit i karyotyp jedince (Flegr, 2009). **Genomové mutace** způsobují změny v počtu chromozomů, a to jak zvýšením, tak i snížením celých chromozomových řad či jejich částí. Genomové mutace vznikají vlivem poruch při buněčném dělení. Některé chromozomy mohou být zmnoženy, jiné naopak mohou chybět (aneuploidie) a někdy dojde ke zmnožení celých chromozomových sad (polyploidie) (Chloupek, 2008; Flegr, 2009; Snustad et Simmons, 2009).

Důležitou vlastností DNA je její molekulární stabilita a schopnost „samoopravy“ vzniklých mutací, kdy se díky homologní rekombinaci poškozená část DNA opraví podle vzoru neporušené DNA (Briggs et Walters, 2001). Z důvodu degenerace genetického kódu, kdy jsou aminokyseliny kódovány větším počtem tripletů, se nemusí změny na pozici jednotlivých nukleotidů projevit v syntéze proteinů (tzv. synonymní mutace) a potažmo ani ve fenotypu jedince (Crawford, 1990; Flegr, 2009). Navzdory tomuto mechanismu může docházet ke změnám ve sledu, ve kterém jdou báze za sebou, dojde tak k záměně jedné aminokyseliny za jinou (tzv. nesynonymní mutace). Dojde-li k záměně kodonu kódujícího jednotlivé aminokyseliny za terminační kodon, jedná se o tzv. nesmyslnou mutaci. Tato výrazná změna struktury proteinu většinou vede ke vzniku nefunkčního proteinu (Flegr, 2009).

Veškeré mutace mohou vznikat jednak spontánně, nebo působením chemikálií a záření (Briggs et Walters, 2001; Chloupek, 2008; Flegr, 2009; Snustad et Simmons, 2009). Samovolné mutace se v průměru objevují s frekvencí cca 10^{-6} pro jednotlivé geny eukaryotických organismů (Chloupek, 2008). Snustad et Simmons (2009) uvádí u eukaryot rychlost mutace na nukleotidový pár na generaci 10^{-7} až 10^{-9} . Rychlost vzniku mutací se liší u různých druhů eukaryotických organismů (Baer

et al., 2007), v rámci jednoho druhu, v rámci jednoho organismu a zároveň i mezi jednotlivými geny stejného organismu (Flegr, 2009). Nejvyšší rychlost mutace obecně vykazují oblasti pseudogenů – genů, které právě mutací ztratily schopnost se přepisovat v RNA (ribonukleová kyselina) tzv. transkripce. Vysokou rychlost substituce mají nekódující oblasti DNA, tzv. introny, a naopak nejpomaleji dochází ke změnám v oblastech funkčních genů – exonů (Flegr, 2009).

Například u cpDNA je pravděpodobnost záměny transverzí u nukleotidu ohraničeného z obou stran nukleotidem T nebo A 2,2x větší než pravděpodobnost tranzice. Pokud je jedním ze sousedních nukleotidů C nebo G, jsou u daného nukleotidu 1,5x pravděpodobnější tranzice než transverze (Morton et Clegg, 1995). K mutacím mezi různými geny dochází s odlišnou pravděpodobností a ovlivňuje ji více faktorů než jen sousedící nukleotidy (Morton, 1997).

Mezi činitele, které působí proti zvyšování genetické variability v populaci, se řadí genetický drift, molekulární tah a přirozený výběr (Flegr, 2009).

2.2.2 Hybridizace

Hybridizace neboli křížení je jedním z dějů, které vedou ke zvýšení variability v genomu. Při hybridizaci dochází ke spojení dvou blízce příbuzných druhů a vzniku nového jedince – hybrida. V zemědělství a šlechtění okrasných rostlin se kontrolovaná hybridizace často využívá. Následnou selekcí jsou vybíráni hybridy s výhodnými nebo ojedinělými estetickými vlastnostmi. Při křížení dvou různých druhů se jedná o mezidruhovou hybridizaci, méně častá je hybridizace mezirodová (Chloupek, 2008). V rostlinné říši často dochází k mezidruhovému křížení u divizen (*Verbascum*) a pcháčů (*Cirsium*) a u čeledi vstavačovitě (*Orchidaceae*) navíc i k mezirodovému křížení (Kocián, 2003).

Přirozené hybridizaci mezi druhy brání reprodukčně izolační mechanismy (RIM). Mezi RIM patří tzv. „prezygotické mechanismy“. Mezidruhové hybridizaci zabraňují v první řadě geograficko-ekologické bariéry. Pokud dva příbuzné druhy obývají stejnou oblast, musí často překonat ještě morfologické (inkompatibilita pyl – pestík) a fenologické bariéry (kvetení v jinou roční dobu) (Levin, 1978).

Dalšími RIM jsou „postzygotické mechanismy“, kdy embryo vzniklé po zkřížení dvou druhů se vzhledem k inkompatibilitě mezi embryem, endospermem a mateřskými pletivami nemusí dále vyvinout nebo vznikají jedinci s vývojovými poruchami, jsou neplodní a slabí. Mnohdy se defektní potomstvo objeví až ve druhé (F_2) generaci (Valentine, 1956). Hybridní jedinci mají většinou sníženou klíčivost semen, nebo

neklíčí vůbec, čímž se jejich geny nemohou přenést do další generace. Často se u hybridů vyskytuje sterilita (Levin, 1978).

Přes existenci RIM dochází u rostlin ke křížení mezi druhy poměrně často. Hybridní jedinci jsou mnohdy neschopní přežít, neúčastní se reprodukce a vyznačují se nižší zdatností, než mají jejich mateřské druhy (Arnold et Hodges, 1995; Briggs et Walters, 2001). Přesto však existují hybridy, kteří naopak vynikají schopností adaptace na nová prostředí (Arnold, 1997), a dokonce jsou schopni snášet mnohem extrémnější podmínky než rodičovské druhy (Rieseberg, 1991). Důležitou roli hraje následná polyploidizace hybridního genomu, zvláště u sterilních heteroploidních hybridů, kdy dojde k obnovení plodnosti (tzv. „únik z hybridní sterility“) (Winge, 1917).

Hybridizace může vést nejen ke vzniku mnohých variet, ale i nových druhů, například tím, že u mezidruhových kříženců může dojít k reprodukční izolaci vůči rodičům a k jejich samostatné reprodukci v populaci vedoucí ke vzniku odděleného druhu (Grant, 1981; Briggs et Walters, 2001). Opačným fenoménem je introgrese (vnesezení genů jednoho druhu do genomu jiného), kdy při zpětném křížení (backcrossing) jedinců původních dvou samostatných druhů a jejich mezidruhových hybridů dochází ke genetickému mísení obou druhů, neboli „genetické erozi“ (Kolář et Vít, 2008; Kolář et al., 2012). Rozpoznat od sebe jednotlivé druhy a hybridy je tak velmi obtížné, zmiňuje se o tom již Charles Darwin ve své knize O původu druhů (1859).

Na hybridizaci jako takovou existují dva protichůdné názory. Na jednu stranu je chápána jako jeden z hlavních evolučních činitelů, kdy se zvyšuje genetická variabilita v populaci. Vznikají díky ní nové druhy schopné adaptovat se na extrémnější podmínky a nové biotopy (Arnold, 1997). Z pohledu ochrany přírody a zachování přirozené diverzity mohou hybridní jedinci ohrožovat populaci mateřských jedinců, tím spíše, pokud je jeden z nich endemitem a druhý zcela běžným druhem (Kolář et Vít, 2008). Jinak je chápána hybridizace v případě živočišných druhů, a to jako lokální fenomén pouze s dočasným efektem, jakýsi druh „evolučního šumu“ (Mayr, 1992; 2009).

2.2.3 Polyploidie

Polyploidizace patří mezi specifický druh mutace, kdy dochází ke znásobení počtu chromozomových sad během meiózy (Snustad et Simmons, 2009). Podle Riegera, Michaelise a Greena (1976) poprvé použil označení rostliny s vyšším počtem

chromozomových sad jako „polyploida“ Strasburger (1910). Polyploidie znamená přítomnost tří a více kompletních sad chromozomů v genomu jedince (Ramsey et Schemske, 1998). Spolu s hybridizací se jedná o rychlou změnu, tzv. „saltační speciaci“ v průběhu evoluce eukaryotních organismů. Ke vzniku nového druhu dochází bez zdlouhavých procesů postupného vývoje z jednoho předka během přetrvávající geografické izolace nebo selekčních tlaků (Soltis et Soltis, 1993; Arnold, 1997; Adams, 2007). Často tak lze jednotlivé druhy rozlišit pouze na genetické úrovni nebo pomocí molekulárních markerů (Briggs et Walters, 2001).

Většina organismů na zemi má diploidní počet chromozomů, který je pro každý druh charakteristický (právě s výjimkou polyploidů). Tato skutečnost byla známa již v devatenáctém století. Polyploidní jedinci, v rámci jednoho taxonu, se od diploidních liší počtem chromozomových sad, je tak obtížné určit jen podle cytologických rozdílů, zda se jedná o jedince stejného, nebo odlišného druhu (Briggs et Walters, 2001).

K polyploidii dochází v přírodě spontánně a je jedním z hlavních hybatelů evoluce. Uvádí se, že až u 80 % všech krytosemenných rostlin došlo během jejich evoluce k polyploidizaci (Soltis et Soltis, 1993; Arnold, 1997; Bennett, 2004; Adams, 2007) a u většiny z nich dokonce opakovaně (Wendel, 2000). Uměle lze polyploidii vyvolat indukci kolchicinem – alkaloidem získaným z ocúnu *Colchicum autumnale*, který ve fázi mitózy naruší dělicí vřeténka (Chloupek, 2008). Přibližně 70 % druhů trav (*Poaceae*) a 23 % bobovitých rostlin (*Fabaceae*) jsou spontánní polyploidii (Chloupek, 2008). Spontánní polyploidie je běžnější u taxonů, u kterých v minulosti proběhla i hybridizace (Ramsey et Schemske, 1998). Významné zemědělsky využívané plodiny mají polyploidní původ – např. banánovník (*Musa*) – triploid, bavlník (*Gossypium*) – tetraploid, pšenice (*Triticum*) – hexaploid a jahodník (*Fragaria*) – oktoploid. Polyploidní druhy se často vyznačují většími rostlinnými buňkami, vyšší ekologickou adaptabilitou a schopností přežít v extrémních podmínkách (Opitz von Boberfeld, 1993; Flegr, 2009). Ke spolehlivému určení polyploidů se používá průtoková cytometrie (viz kapitola 2.2.5) a karyologické metody určené k počítání jednotlivých chromozomů (Krahulcová, 1998).

K přesnějšímu označení hladiny polyploidie se přidávají znaky určující stupeň ploidie, který je násobkem základního počtu chromozomů „x“, lze tak zachovat označení „n“ a „2n“ pro haploidní (gametické) a diploidní (somatické) sady chromozomů a odlišit předpokládané polyploidní vztahy mezi rody a druhy. Rozlišují

se tak například rostliny triploidní ($2n = 3x$), tetraploidní ($2n = 4x$) atd. (Ramsey et Schemske, 1998; Briggs et Walters, 2001).

Způsob vzniku polyploidů

Polyploidní jedinci mohli vzniknout dvěma způsoby. Jeden způsob představují jedinci vzniklí křížením mezi různými druhy, tzv. allopolyploidie. **Allopolyploidie** vzniká zmnožením neidentického genomu křížence a dochází k fixaci heterózního efektu (potomek dvou různých rodičovských druhů získá v F1 generaci lepší vlastnosti, než mají oba rodiče), vznikla tak například pšenice (*Triticum*) (Opitz von Boberfeld, 1993). První uměle vypěstovaný polyploid byla hybridní obilnina tritikále (*Triticale*). Jedná se o allopolyploida, kdy mateřskou rostlinou je pšenice a otcovskou žito (Leitch et Bennett, 1997). Allopolyploidie je v přírodě zcela běžná (Arnold et Hodges, 1995; Rieseberg, 1997; Ramsey et Schemske, 1998; Adams, 2007), mnoho obtížných plevelů, mezi nimi i *C. album*, má allopolyploidní původ (Mandák et al., 2012).

Druhým způsobem je **autopolyploidie**. Autopolyploidie vznikají zdvojením chromozomů u téhož druhu, čímž dojde ke znásobení celého vlastního genomu (Snustad et Simmons, 2009). První, kdo teoreticky rozlišil dva možné původy vzniku polyploidů, byl Winge (1917). Odlišil, zda ke vzniku polyploida dochází na základě zdvojení jen vlastních chromozomových sad jednoho jedince (autopolyploidie), nebo následuje polyploidizace až po hybridizaci (allopolyploidie). Jako první použili termín auto- a allopolyploidie Kihara et Ono (1926).

Faktory ovlivňující vznik polyploidů

V minulosti došlo k rozsáhlým polyploidizačním dějům, které diverzifikovaly velké množství nových druhů. K těmto událostem mohlo dojít vlivem abiotického stresu způsobeného nárůstem oxidu uhličitého v atmosféře a zároveň v koevoluci rostlin a vhodných opylovačů. První velká polyploidizace je datována přibližně do období svrchní jury až spodní křídly. V této době vznikaly krytosemenné rostliny a zmnožení genomu pravděpodobně umožnilo vývoj složitějších morfologických struktur u rostlin. Druhou polyploidizací v období svrchní křídly došlo k vývoji sekundárních metabolitů. Rostliny vyvíjely strategie na přilákání opylovačů. Objevují se antokyany, které vytváří barevnost květů a plodů a různé vonné silice. Další sekundární metabolity měly obrannou funkci proti herbivorům a patogenům, například alkaloidy a polyfenoly. Třetí polyploidizace proběhla v třetihorách s menším vlivem na vznik nových druhů, projevila se více na úrovni čeledí (Suda, 2009). V současnosti se

uvádí častější výskyt polyploidie u rostlin ve spojitosti s rostoucí nadmořskou výškou nebo obecně s extrémními podmínkami životního prostředí (zasolení) (Grant, 1981).

Sterilita u polyploidů

I když je pro polyploidy charakteristický robustní vzhled (Opitz von Boberfeld, 1993; Chloupek, 2008), mnohdy jsou tyto jedinci sterilní. Nově vzniklí polyploidní jedinci čelí konkurenci s plodnými diploidními rodičovskými druhy (Thompson et Lumaret, 1992), kterou mohou polyploidní rostliny částečně kompenzovat vegetativním rozmnožováním (Gibby, 1981). Pokud dojde k opylení tetraploida rodičovským diploidem, jejich potomstvem budou často sterilní triploidi (Briggs et Walters, 2001). U kříženců a polyploidů s lichým násobkem chromozomových sad je příčinou sterility nepravidelné dělení při meióze (viz následující kapitola Problematika triploidů). Pokud dojde u hybridů s lichým počtem chromozomů k polyploidizaci, tak se vrátí zpět do plodného stavu (Winge, 1917). Polyploidizace může u některých druhů vést k překonání autoinkompatibility a nově vzniklí jedinci se mohou rozmnožovat pomocí autogamie. Tato vlastnost je velmi výhodná zejména při nedostatku pylu od ostatních rostlin a v malých populacích (Levin, 2002). Dalším prolomením hybridní sterility je schopnost polyploidů rozmnožovat se apomikticky. Apomixie je nepohlavní rozmnožování pomocí semen bez splynutí samčích a samičích gamet, potomci jsou tak geneticky shodní s mateřským jedincem (Briggs et Walters, 2001).

Problematika triploidů

U triploidů se během dělení snaží chromozomy spárovat s homologickým (stejně sady genů přenášejícím) partnerem. Díky přítomnosti tří chromozomových sad může dojít ke dvěma možnostem spojení. Dva chromozomy se spárují a třetí zůstane samostatně. Takový osamocený chromozom je nazýván univalentem. Při druhé možnosti se všechny tři chromozomy spojí a vytvoří tzv. trivalent, přičemž se každý částečně páruje s oběma homologickými partnery (Briggs et Walters, 2001). Přítomností univalentů a multivalentů s lichým počtem chromozomů lze u polyploidů vysvětlit sníženou plodnost. Někteří triploidi mohou být plodní, ale vytváří několik forem gamet – diploidní, triploidní i aneuploidní (jedinci mají jiný počet chromozomů, než je pro konkrétní druh normální). Jejich splynutím dochází ke vzniku jedinců s různým počtem chromozomů (Gibby, 1981). Jakmile dojde k polyploidizaci triploida na hexaploida, přestává být jedinec sterilní (Winge, 1917).

2.2.4 Vliv polyploidizace na velikost genomu

Během procesu polyploidizace dochází ke zmnožení chromozomových sad (Chloupek, 2008) a dochází tak ke zvětšení genomu. Tyto změny v počtu chromozomových sad mají vliv na variabilitu ve velikosti genomu v rámci jednoho druhu i mezi druhy.

Pokud jde o velikost genomu, je třeba odlišit, zda se jedná o monoploidní, nebo holoploidní velikost genomu. Holoploidní velikost, tedy obsah DNA v haploidním jádru gametické buňky (nehledě na stupeň ploidie), je označován jako C-hodnota (Swift, 1950). Obsah DNA u monoploidní sady chromozomů (u polyploidů se jedná o průměr) je označován jako absolutní velikost genomu. Velikost monoploidního genomu představuje obsah DNA v jádru buňky, označuje se jako C_x-hodnota a získává se jako podíl dvojnásobku C-hodnoty a stupně ploidie (Greilhuber et al., 2005). U diploidních taxonů je C-hodnota rovna velikosti genomu, u polyploidů je tato hodnota vždy větší, platí: $C > C_x$. C-hodnota a velikost genomu (C_x-hodnota) se udávají jako hmotnost v pikogramech DNA (pg) nebo jako počet párů megabází (Mbp), přičemž platí rovnost: 1 pg = 978 Mbp (Doležel et al., 2003). Ačkoli by se dalo očekávat, že u polyploidů bude C-hodnota vyšší než u diploidních předků, není tomu tak. C-hodnoty mají u vyšších polyploidů tendenci se snižovat. Tento fenomén je nazýván „genome downsizing“ (Leitch et Bennett, 2004).

Největší genomy byly nalezeny u jednoděložných rostlin, a to u *Liliales*, *Iridales*, *Juncales*, *Commelinales*, *Alismatales* a *Araceae* (Bennett et Smith, 1991), oproti tomu ostatní jednoděložné rostliny mají relativně malé genomy (Bharthan et al., 1994). Z dvouděložných rostlin mají nejmenší genomy masožravé rostliny z čeledi *Lentibulariaceae* (Greilhuber et al., 2006).

Podle Hawkinse et al. (2008) působí proti zvětšování genomu několik mechanismů zamezujících jeho neomezenému růstu. Ke zmenšení genomu může dojít při rekombinaci, která neprobíhá standardně a rovnoměrně mezi homologními chromozomy, a dojde tak k drobným delecím (Flegr, 2009). Tyto mechanismy zatím zcela neobjasňují zmenšování genomu a pravděpodobně existují účinnější mechanismy, které doposud nebyly objasněny (Hawkins et al., 2008). U druhů, u kterých došlo k nedávné polyploidizaci, ještě tyto mechanismy neměly dost času, aby mohl být genom zmenšen a jejich C-hodnota je tak dvojnásobná (Weiss-Schneeweis et al., 2006).

2.2.5 Určení velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie

Metoda průtokové cytometrie (FCM = flow cytometry) je moderní cytogenetická technika založená na měření obsahu DNA v buňkách. Tato analytická metoda se v současnosti uplatňuje v mnoha odvětvích a aplikovaném výzkumu (Suda, 2004). Díky možnosti srovnávání vzorků jedince se známým počtem chromozomů a zkoumaného vzorku, u kterého počet chromozomů není znám, lze odhadnout stupeň jeho ploidie (Briggs et Walters, 2001) Lysák et al. (1999) zmínil použití srovnávacích analýz absolutních velikostí genomů u druhů s různou ploidií, které mohou vést k identifikaci domnělých předků.

2.3 Charakteristiky skupiny *Chenopodium album* agg.

2.3.1 Morfologie druhu

Rod *Chenopodium* zahrnuje jednoleté byliny s větveným hlavním kořenem, zřídka vytrvalé byliny a vzácně keře. Zvláště v raném stádiu vývoje je část druhů hustě pokryta nepatrnými měchýřkovitými chloupky, žlázkami nebo žláznatými chlupy, které tvoří charakteristické „pomoučení“. Některé druhy jsou ve všech částech rostliny silně aromatické (Dostálek et al., 2003). Lodyha je vzpřímená, vystoupavá až poléhavá, málokdy plazivá. Lodyha bývá od jednoduché až po bohatě větvenou, oblá nebo nevýrazně hranatá s barevnými podélnými pruhy nebo bez nich. Listy jsou obvykle řapíkaté ve střídavém nebo přibližně vstřícném postavení na několika prvních člancích. Tvar listů je celistvý, celokrajný nebo různě zubatý až laločnatý, často v horních částech stonku přecházející v listeny. Květy jsou umístěny v úžlabí listů v klubíčkách nebo utvářejí vrcholové lichoklasy, zdánlivé laty nebo vidlany, nejčastěji oboupohlavné (Chu et al., 2003). Plodem je kulovitá až zploštělá nažka s hladkým osemením uložená vodorovně nebo svisle v okvětí. Dormance semen v půdě je několik desítek let (Dostálek et al., 2003).

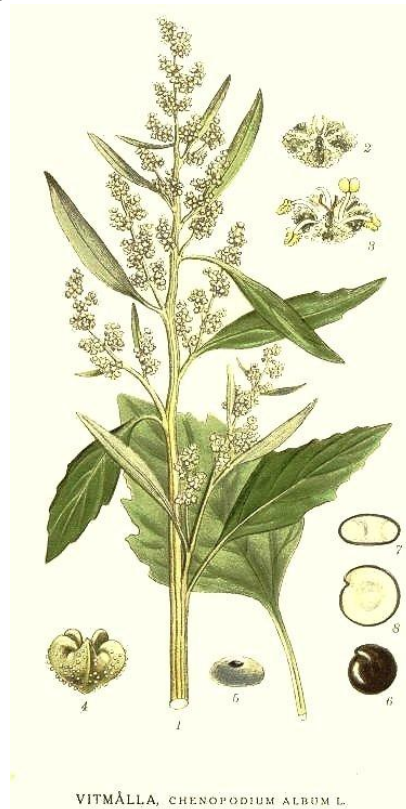
2.3.2 Výskyt a význam v krajině

Chenopodium je rod s přibližně 170 druhy (Chu et al., 2003), toto číslo se neustále mění s počtem objevených druhů a se změnami v klasifikaci. Ještě v roce 1993 Kühn uvádí 150 druhů a v roce 1957 Cole udává počet druhů okolo sta.

Někteří autoři rozpoznávají u skupiny *C. album* agg. množství oddělených druhů či hybridů (Dvořák, 1990; 1992a; 1992b; 1993; 1994), zatímco další je uvádějí jako poddruhy, variety, formy a jejich odvozeniny (Jüttersonke et Arlt, 1989).

Zástupci *C. album* jsou hojně rozšířeni v kulturní krajině. Patří mezi pionýrské rostliny na náspech, valech čerstvě navezené zeminy a ostatních ruderalních stanovištích, kde plní i důležitou asanační funkci. Neobstojí v konkurenci vytrvalých rostlin, nesnášejí zastínění. Jako plevel působí v okopaninách a zahradách (Dostálek et al., 2003).

Rod *Chenopodium* je všeobecně znám svojí adaptabilitou na dané podmínky prostředí. Jsou to druhy většinou raně sukcesních stádií. Během sukcese dochází k výrazným změnám chemie půdy a mikroklimatických podmínek (Primack et al., 2011). Díky schopnosti rychle se přizpůsobit mohou osidlovat nová prostředí, ale i reagovat téměř okamžitě na změny podmínek v bezprostředním okolí. Rostliny rostoucí na polích jako plevel jsou si takto schopny vytvořit toleranci vůči herbicidům (Thiel et Varrelmann, 2014). *C. album* (obr. č. 1) je častým a obtížným plevem na polích cukrové řepy, kde si vytvořil rezistenci na hlavní používaný herbicid metamitron (Aper et al., 2013). Při kombinování více druhů herbicidů dochází častěji k případům mnohonásobné rezistence. Při pokusech na orné půdě byly merlíky vystaveny působení několika druhů běžně užívaných herbicidů. U druhu *C. album* je dokonce známa trojitě rezistentní forma z Maďarska (Solymosi et Lehoczki, 1989).



Obr. č. 1: *Chenopodium album*. Lindman (1901). Zdroj: <http://runeberg.org/nordflor/>

Jak uvádí Katalog biotopů České republiky (Chytrý et al., 2010) obývají druhy rodu *Chenopodium* rozmanité biotopy. Mimo obecné rozšíření v kulturní krajině a na ruderalních stanovištích patří mezi místa výskytu i vápnité a zasolené půdy charakteristické pro **M 1.2 Slanomilné rákosiny a ostřicové porosty**. Výskyt tohoto typu vegetace je zde dočasný nebo trvá jen několik desítek let, typickými stanovišti jsou důlní výsyvky, cihelny, šterkovny a vápencové lomy. **M 2.1 Vegetace letněných rybníků** vytváří dočasná stanoviště ideální pro jednoleté druhy bylin. Substrát je zde bohatý na živiny, s malým obsahem vápníku. **M 2.4 Vegetace jednoletých a slanomilných trav** se vyskytuje na obnažených dnech rybníků, vysychajících slaných jezírkách a mechanicky narušovaných slaných lukách,

bohatých na živiny. Tam, kde klesá hladina podzemní vody, je často nahrazena vytrvalými bylinami. Vlhkomilné druhy *Chenopodium* nalezneme i na stanovištích bohatých na dusík, jako jsou **M6 Bahnité říční náplavy**, kde je jednou z pionýrských rostlin. Sediment je smíšeného charakteru, podklad tvoří štěrky a písky a povrch je pokryt vrstvou bahna s obsahem organického materiálu (listí, dřevo). V biotopu **S3 Jeskyně** v oblastech Moravského a Českého krasu byly dokonce zjištěny ojedinělé porosty jednoletých bylin, náročných na obsah živin – například *Chenopodium rubrum*. Substrát je sypký a kamenitý, převážně vápnitý s příměsí kostí a zbytků potravy šelem, sov a dravců, které obohacují půdu o vápník, fosfor a dusík. Porosty se nachází v jeskynních portálech a pod převisy. Jedná se o relikty vegetace vyvinuté na obdobných stanovištích v alpsko-karpatské oblasti.

2.3.3 Areály rozšíření druhů skupiny *Chenopodium album* agg.

Do skupiny *Chenopodium album* agg. se řadí od sebe navzájem obtížně rozlišitelné druhy (Dostálek et al., 2003 in Hejný et al., 2003). Informace o počtu chromozomů a areálu rozšíření jsou převzaty z publikací Aellen (1960), Clements et Mosyakin (2003), Chu et al. (2003), Dostálek et al. (2003) a Mandák et al. (2012).

Výčet druhů ze skupiny *Chenopodium album* agg. zařazených do studie. *C. vulvaria* (označen hvězdičkou *), nespádající pod tuto skupinu, posloužil jako „outgroup“ ve fylogenetických analýzách.

DIPLOIDI ($2n = 2x = 18$)

- ***C. ficifolium* Smith – merlík fíkolistý** – původní rozšíření od Středozeří do východní Asie, druhotné rozšíření v celé Eurasii.
- ***C. suecicum* Murr – merlík švédský** – rozšířen v severní části polokoule v mírném a boreálním pásmu, v centrální a severní Evropě a na Dálném východě.
- ****C. vulvaria* L. – merlík smrdutý*** – okolí Středozeří, centrální a východní Evropa, jihozápadní a centrální Asie.

TETRAPLOIDI ($2n = 4x = 36$)

- ***C. striatiforme* Murr – merlík drobnolistý** – celkové rozšíření není zcela zmapováno. Západní, severní a jižní Evropa, Ukrajina, pravděpodobně Malá Asie.

- ***C. strictum* Roth – merlík tuhý** – pravděpodobně původní ve střední Asii a v Evropě, druhotně zavlečen do celého světa.

HEXAPLOIDI (2n = 6x = 54)

- ***C. album* L. – merlík bílý** – kosmopolitní.
- ***C. missouriense* Aellen – merlík missourský** – východ Severní Ameriky, druhotně rozšířen po Evropě.
- ***C. opulifolium* Schrader – merlík kalinolistý** – od Středozeří a centrální Evropy k Persii a centrální Asii, druhotně rozšířen po celém světě.
- ***C. pedunculare* Bertol. – merlík stopečkatý** – původ a rozšíření nejsou známy, obecně rozšířen v Evropě a jinde po světě.

Mezi jednotlivými druhy ze skupiny *Chenopodium album* agg. docházelo v historii k mezidruhovému křížení, v současnosti se kříží velmi vzácně, pokud vůbec (Cole, 1957; Aellen, 1960; Dostálek et al., 2003; Mandák et al., 2012). O hybridních kombinacích ve střední Evropě se zmiňuje i Aellen (1960), ale pokládá je za velmi ojedinělé a pochybné. Doklad, že ke křížení dochází i na území České republiky a Slovenska, udává Dostálek et al. (2003). V rámci skupiny *Chenopodium album* agg. byly na území ČR popsány následující hybridní kombinace, avšak tyto hybridy se vyskytují velmi zřídka a jedinci byli sbíráni většinou na netypických nebo extrémních stanovištích. Jejich výskyt ve volné přírodě je velmi sporadický, ne-li vyloučený (Dostálek et al., 2003):

- *C. opulifolium* x *strictum* = *C. tridentinum* J. Murr
- *C. opulifolium* x *suecicum* = *C. thellungii* J. Murr
- *C. album* x *berlandieri* subsp. *zschackei* = *C. variabile* Aellen
- *C. album* x *ficifolium* = *C. zahnii* J. Murr
- *C. album* x *strictum* = *C. pseudostriatum* Zschacke
- *C. album* x *suecicum* = *C. fursajevii* Aellen et Iljin
- *C. album* x *opulifolium* = *C. preissmannii* J. Murr

2.3.4 Polyploidní komplex *Chenopodium album* agg.

Druhy ze skupiny *Chenopodium album* agg. vytvářejí polyploidní komplex, jenž se v České republice vyskytuje v podobě diploidních druhů ($2n = 2x = 18$) *C. ficifolium* Sm. – merlík fíkolistý, *C. hircinum* Schrad. – merlík kozlí, *C. suecicum* J. Murr – merlík švédský a *C. acuminatum* Willd. – merlík zašpičatělý (jsou známy i tetraploidní formy); tetraploidních druhů ($2n = 4x = 36$) *C. berlandieri* Moq – merlík Berlandierův, *C. quinoa* Willd. – merlík čilský, *C. prostratum* Herder – merlík rozprostřený, *C. strictum* Roth – merlík tuhý a *C. striatiforme* J. Murr – merlík drobnolistý a hexaploidních druhů ($2n = 6x = 54$) *C. probstii* Aellen – merlík hustoklasý, *C. opulifolium* Schrader – merlík kalinolistý, *C. missouriense* Aellen – merlík misurský, *C. pedunculare* Bertol. merlík stopečkatý a *C. album* L. s. str. – merlík bílý (Dostálek et al., 2003).

2.3.5 Fylogenetická klasifikace

Rod *Chenopodium* je velmi proměnlivý a jeho klasifikace byla hlavně v minulosti založena spíše na podobnosti morfologických znaků než na jeho skutečné fylogenezi. Tomu je podřízena i taxonomická klasifikace, která je obměňována na základě nově prováděných fylogenetických analýz.

Taxonomické rozdělení

(Watson et Dallwitz, 1992; Angiosperm Phylogeny Group, 2003):

říše: ***Plantae*** – rostliny

oddělení: ***Angiosperms*** – krytosemenné rostliny

větev: ***Eudicots*** – pravé dvouděložné

větev: ***Core eudicots***

podtřída: ***Caryophyllidae*** – středosemenné

nadřád: ***Caryophyllanae***

řád: ***Caryophyllales*** Perleb (1826) – hvozdíkotvaré

čeleď: ***Amaranthaceae*** Juss. (1789), nom. cons. – laskavcovité

čeleď: ***Chenopodiaceae*** Vent. (1799), nom. cons. – merlíkovité

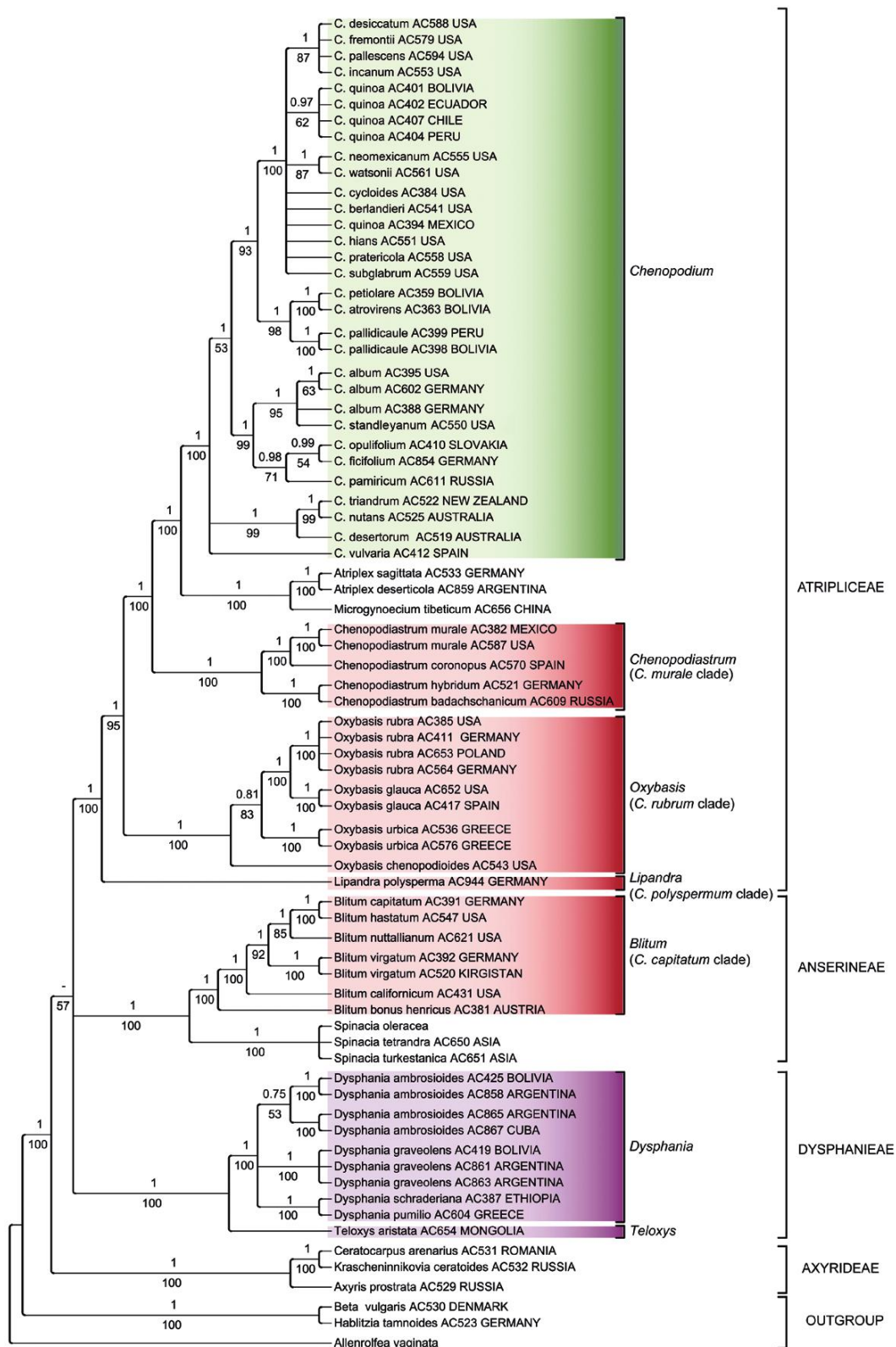
rod: ***Chenopodium*** – merlík

U čeledi *Amaranthaceae* a jí nadřazených taxonů již nedochází ke změnám v taxonomii, ale nižší taxonomické jednotky jsou předmětem současných výzkumů

a dochází k přesnějšímu fylogenetickému rozřazení dosud málo prozkoumaných druhů podčeledi *Chenopodioideae* (Fuentes-Bazan et al., 2012b).

U zatím nejrozsáhlejší studie zaměřené na klasifikaci podčeledi *Chenopodioideae*, kterou provedli Fuentes-Bazan et al. (2012a), bylo využito variability nekódujících úseků *trnL-F* cpDNA a oblasti ITS (internal transcribed spacer) jaderné DNA. Na základě analýz DNA potvrdili, že rod *Chenopodium* je vůči ostatním rodům podčeledi *Chenopodioideae* parafyletický (zahrnuje jednoho společného předka, ale nikoli všechny potomky). Rod *Chenopodium* se dále dělí na 5 zřetelně oddělených linií zahrnujících 3 linie *Chenopodieae*, linii *Spinaceae* a *Disphania – Teloxys*.

Další studie zaměřená na klasifikaci podčeledi *Chenopodioideae* (Fuentes-Bazan et al., 2012b), prováděná rovněž na základě variability nekódujících úseků *trnL-F* cpDNA (Kadereit et al., 2003) a navíc *maK/trnK* cpDNA (Müller and Borsch, 2005), rozdělila rod *Chenopodium* na šest na sobě nezávislých linií (obr. č. 2). Celkově byl rod *Chenopodium* rozdělen na 6 fylogenetických větví, na rody *Chenopodium*, *Chenopodiastrum*, *Oxybasis*, *Lipandra*, *Blitum* a *Disphania – Teloxys*.



Obr. č. 2: Nejnovější fylogenetická klasifikace podčeledi *Chenopodioideae*, založená na *trnL-F* a *matK/trnK* datasetech. Druhy v barevně označených větvích byly dříve souhrnně klasifikovány pod jeden rod *Chenopodium*. V současnosti tvoří rodů několik (Fuentes-Bazan et al., 2012b).

2.4 Dědičnost a determinace mateřských linií

2.4.1 Nemendelistická dědičnost

Již jedni z prvních průkopnických genetiků při pozorování křížení rostlin zjistili, že ne vždy dochází k rozložení potomstva do mendelistických štěpných poměrů. Na to poukázal Correns (1909), který byl jedním ze znovuobjevitelů Mendelova díla, když u okrasné rostliny *Mirabilis jalapa* (nocenka jalapenská) vypořádal, že některé variety se žlutozelenými nebo skvrnitými listy vykazují mendelovskou segregaci, ale jiná forma, tzv. *albomaculata*, takovou dědičnost nemá. Na rostlině *albomaculata* vyrůstaly výhony se zelenými listy a výhony pouze s bílými listy. Semenáčky si zachovávaly barvu listů nezávisle na druhu pylu pocházejícího z květů rostoucích na zelenolistých, skvrnitých nebo bílých rostlinách. Pouze skvrnité rostliny produkovaly všechny tři typy semenáčků. Tyto výsledky odporovaly mendelistické dědičnosti, a to ze dvou důvodů:

1. Potomstvo připomínalo samičího rodiče a zpětné křížení dávalo rozdílné výsledky.
2. Nebylo možné najít pravidelnost ve fenotypovém štěpení.

V průběhu let byly učiněny další objevy případů potvrzujících nemendelistickou dědičnost. S přispěním molekulárně biologických studií bylo možné dokázat, že DNA je u rostlin přítomná i v mitochondriích a chloroplastech a aktivně se podílí na přenosu svých genů. Chování této DNA bývalo označováno jako „cytoplasmatická dědičnost“, nyní se užívá novější termín „mimojaderná dědičnost“. Kruhové molekuly DNA v chloroplastech (cpDNA) a v mitochondriích (mtDNA) jsou schopny autoreplikace a dědičnost závisí na distribuci jejich kopií v protoorganelách (Briggs et Walters, 2001).

2.4.2 Determinace příbuznosti na základě uniparentální dědičnosti

Při křížení rostlin dochází k různému přenosu dědičné informace. U jehličnanů dochází k paternální (otcovské) dědičnosti plastidové DNA (Schaal et al., 1991), u krytosemenných převažuje maternální (mateřská) dědičnost, někdy však může dojít i k paternální, nebo dokonce biparentální dědičnosti (po obou rodičích), jak zmiňují Harris a Ingram (1991). U většiny vyšších rostlin nevstupují plastidy z pylu do zygoty, proto je cpDNA děděna maternálně (po mateřské linii). Znamená to, že se během meiosis nerekombinuje (Corriveau et Coleman, 1988; Harris et Ingram, 1991). To ovšem neplatí například u druhů rodu *Pelargonium*, *Oenothera*, *Hypericum* a *Nepeta* (Kirk et Tilney-Bassett, 1978; Evenari, 1989). Výhodou

plastidové DNA je relativní konzervativnost a výzkumy zaměřené na zkoumání chloroplastové nebo mitochondriální DNA se ukázaly jako velmi užitečné pro studium hybridizace a fylogenetických vztahů (Bachman, 1994).

2.4.3 Chloroplastová DNA

Molekula cpDNA má kruhový tvar a její délka je 71 – 230 kb (kilobází = kbp = kilo base pairs). U vyšších rostlin se velikost cpDNA pohybuje od 120 do 170 kb. (Downie et Palmer, 1994; Shaw, 2007; Snustad et Simmons, 2009).

U většiny krytosemenných rostlin má cpDNA haploidní genotyp, zkráceně haplotyp (Alberts et al., 2002). Ten se u cpDNA chová jako jeden lokus a přenáší se na potomstvo společně a bez rekombinace (Schaal et al., 1998). V každém chloroplastu je obsaženo několik desítek molekul cpDNA, s obsahem kódujících (funkčních) i nekódujících úseků, jako jsou introny a mezerníky (Shaw et al., 2005; 2007). Základní sestava genů obsažená v cpDNA zahrnuje geny kódující ribozomové RNA, transferové RNA, ribozomové proteiny, různé polypeptidové komponenty účastnící se fixace sluneční energie, velkou podjednotku enzymu RuBisCo (ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxylázy) a podjednotky RNA-polymerázy specifické pro chloroplasty (Alberts et al., 2002).

Výhodou užití cpDNA v biosystematických studiích je uniparentální přenos (Corriveau et Coleman, 1988; Harris et Ingram, 1991) a absence rekombinací (Schaal et al., 1998). Díky takovéto struktuře cpDNA bylo možné navrhnout mnoho univerzálních primerů, s jejichž pomocí je možné amplifikovat požadovaný úsek cpDNA v rámci celé rostlinné říše (Taberlet et al., 1991; Olmstead et Palmer, 1994; Shaw et al., 2005; 2007). Další z výhod, vycházející z haploidie, je rychlejší fixace alel v populaci (na rozdíl od jaderné DNA), což snižuje diverzitu v rámci druhu i populace (Harris et Ingram, 1991). Navzdory tomu, že kódující úseky cpDNA jsou značně konzervované, nekódující oblasti cpDNA vykazují dostatečnou variabilitu a lze díky tomu cpDNA využít v biosystematických studiích pro rekonstrukci fylogenetických vztahů jak krytosemenných, tak i nahosemenných rostlin (Bachman, 1994; Qiu et al., 1999; Soltis et al., 2002).

Nevýhodou použití cpDNA je fakt, že odkrývá pouze jednu z rodičovských linií původu jedince. U hybridních jedinců tak druhá rodičovská linie zůstane neobjasněna a stejně tak i fakt, zda k hybridizaci dochází. Při odhalování evoluční historie zkoumaných taxonů doplněním o jadernou DNA lze objasnit směr hybridizace (Krak, 2011).

U rodu *Chenopodium* je cpDNA děděna uniparentálně, a to po mateřské linii (Corriveau et Coleman, 1988; Harris et Ingram, 1991), a díky jejímu analyzování lze vymezit evoluční vztahy mezi taxony po mateřské linii (Downie et Palmer, 1994; Brigs et Walters, 2001).

2.5 Techniky molekulární biologie

V 90. letech 20. století došlo k revoluci v sekvenování genomu. Sekvenování navázalo na dřívější technologie rekombinantní DNA, při kterých bylo podstatou klonování genů. Značná rychlost a účinnost sekvenování genomu byla dosažena pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce). Tyto techniky daly vzniknout moderní biotechnologii a uplatnily se v mnoha odvětvích od medicíny po kriminalistiku (Brown, 2006).

2.5.1 PCR

PCR (z angl. Polymerase chain reaction) je technika umožňující vznik velkého množství kopií molekul DNA pomocí enzymatické amplifikace vybrané sekvence DNA. Její objevitel K. B. Mullis za ni v roce 1993 obdržel Nobelovu cenu (Chloupek, 2008). Hlavním předpokladem pro PCR amplifikaci je znalost okrajových sekvencí vybraného úseku. Po 25 opakováních cyklu PCR vzniká z jediné molekuly DNA více než 50 milionů přesných kopií úseku původní molekuly vymezeného místy, na která se napojily primery. Počet molekul DNA tedy vzrůstá exponenciálně (Snustad et Simmons, 2009).

2.5.2 Měření koncentrace DNA

K určení přesného množství DNA v roztoku slouží ultrafialová (UV) absorpční spektrofotometrie. Tato metoda je založena na přímé úměrnosti mezi množstvím absorbovaného UV záření a množstvím DNA ve vzorku (Brown, 2006). Různé příměsi obsažené v DNA absorbují UV záření o rozdílné vlnové délce. Proteiny absorbují UV záření nejvíce při vlnové délce 280 nm, nukleové kyseliny při 260 nm a nízkomolekulární látky jako například polysacharidy kolem 230 nm (Heptinstall, 2000). Absorbance se obvykle měří při vlnové délce 260 nm a hodnota 1,0 odpovídá 50 µg dvouvláknové DNA v 1 ml. Pro ověření čistoty vzorku se stanovuje poměr absorbcí při 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}), které se u čistého vzorku pohybují okolo 1,8. Nižší poměr poukazuje na kontaminaci DNA proteiny nebo fenolem, vyšší

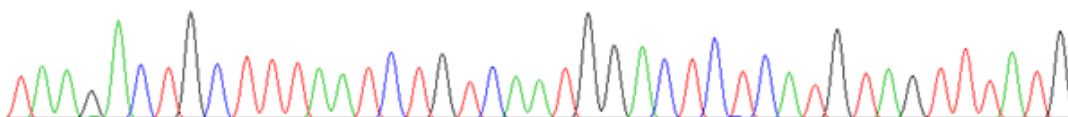
naopak na přítomnost RNA (Brown, 2006). Poměr absorbancí (A_{260}/A_{230}) čisté DNA by měl být přibližně 2,0 (Heptinstall, 2000).

2.5.3 Sekvenování

Sekvenování DNA je metoda umožňující zjistit přesné pořadí nukleotidů v řetězci. Nezávisle na sobě byly vyvinuty dvě techniky sekvenování DNA. V USA to byla metoda specifické chemické degradace A. Maxama a W. Gilberta (1977), ve Velké Británii pak metoda terminace řetězců od F. Sangera a A. R. Coulsona (1977). Dříve byly obě techniky stejně využívány, ale kvůli toxicitě látek používaných u metody chemické degradace se od ní ustupuje za účelem eliminace zdravotního rizika pro pracovníky. V současnosti je tedy používanější Sangerova metoda (jinak dideoxy, dye-terminator nebo primed synthesis), taktéž pro svou relativní jednoduchost automatizace a možnost realizovat tak velké množství jednotlivých sekvenačních experimentů (Brown, 2006).

Při této metodě je studovaný fragment DNA namnožen pomocí PCR a vlastní sekvenování probíhá při další PCR. Templátem jsou již namnožené úseky molekuly zkoumaného vzorku. Odlišnost od klasické PCR spočívá v použití pouze jednoho primeru a v reakční směsi jsou kromě deoxyribonukleotidů (obecně dNTP) přítomny i dideoxyribonukleotidy (obecně ddNTP) (Sanger et Coulson, 1977).

Výstupní data sekvencí DNA z kapilárového sekvestoru mají podobu chromatogramu (elektroforetogram) (obr. č. 3).



Obr. č. 3: Obrázek chromatogramu bez chyb (vlastní data).

3. CÍLE PRÁCE

Diplomová práce je zaměřena na postihnutí variability nekódujících úseků cpDNA u vybraných jedinců ze skupiny *Chenopodium album* agg. Práce by měla splnit dva hlavní cíle, vyřešit na ně navazující otázky a úkoly a ověřit stanovené hypotézy:

Cíl A:

Test variability cpDNA a výběr nejvariabilnějších chloroplastových markerů.

Cíl B:

Rekonstrukce fylogenetických vztahů mezi vybranými jedinci v rámci skupiny *Chenopodium album* agg. na základě vybraných chloroplastových markerů.

- Sestavení fylogenetického stromu a haplotypových sítí na základě variability v cpDNA.
- Determinace mateřských jedinců polyploidních hybridů, u kterých není znám původ vzniku.

Hypotéza 1:

Na vzniku hexaploidního *C. album* se po mateřské linii podílel tetraploidní druh.

Hypotéza 2:

Ve střední a jihovýchodní Evropě a Rusku vznikají polyploidní hybridy stejnou cestou.

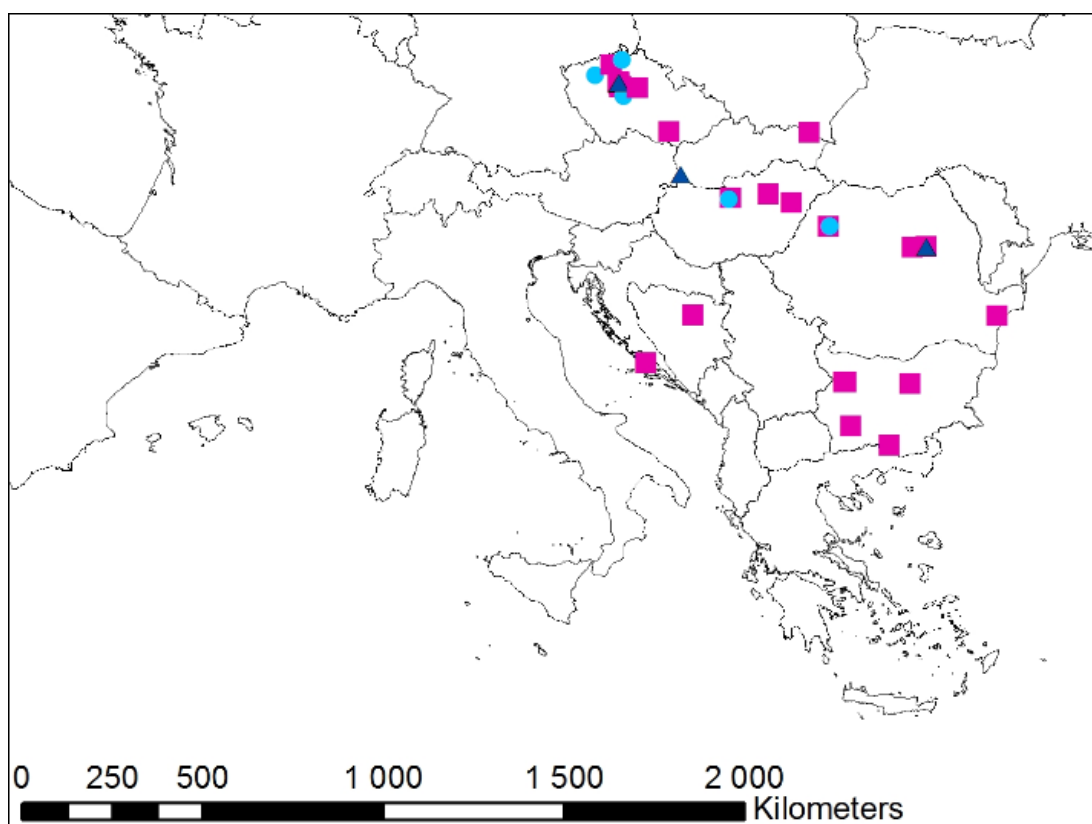
- Jak blízce jsou si příbuzní hexaploidi *C. album*, *C. pedunculare* a do Evropy zavlečený americký druh *C. missouriense*?
- Vyvíjel se druh *C. opulifolium* v různých geografických oblastech stejnou cestou?
- Vznikly tetraploidní druhy zkřížením dvou diploidních druhů?
- Pochází haplotypy, které jsou v rámci fylogenetického stromu ve stejných skupinách, ze stejné geografické oblasti?

4. METODIKA

Experimenty pro diplomovou práci probíhaly během roku 2012 v laboratoři analýzy DNA Botanického ústavu Akademie věd v Průhonicích a na experimentálních pozemcích.

4.1 Rostlinný materiál

Materiál potřebný k izolaci DNA byl odebrán z rostlin na experimentálních pozemcích Botanického ústavu Akademie věd ČR v Průhonicích. Pěstování byli jedinci *Chenopodium album* agg., jejichž semena byla sesbírána ve střední a jihovýchodní Evropě a v Rusku (mapka obr. č. 4). Detailní rozpis všech jedinců s číselným označením, přesným místem nálezu, koordinátami a ploidí viz souhrnná tabulka v příloze 1. Mapové přílohy se zakreslením všech jedinců, vytvořené v ArcGIS Desktop (verze 10), jsou uvedeny jako příloha 2 a pro Českou republiku jako příloha 3.



Obr. č. 4: Mapa rozšíření zástupců rodu *Chenopodium* v detailním pohledu na střední a jihovýchodní Evropu. Modré kolečko představuje diploidy, modrý trojúhelník označuje tetraploidy a růžový čtverec hexaploidy.

Sběr listů probíhal v červnu roku 2012 před tvorbou semen. K extrakci bylo použito odhadem 130 – 150 mg živé biomasy, které přibližně odpovídal list o velikosti 3 x 4 cm. K rozdrčení materiálu byl použit tekutý dusík. Izolace DNA byla provedena pomocí Dneasy Plant Mini Kitu (QIAGEN) a probíhala podle standardního protokolu.

4.2 Kontrola a ředění DNA

Kvalita DNA byla zkontrolována pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu v TAE (Tris-Acetate-EDTA) pufru (Sambrook et al., 1989). Do gelu byly přidány 2 µl ethidium bromidu (EtBr). Na gel se nanášely 2 µl jednotlivých vzorků DNA obarvených 1 µl naředěného barviva Bromfenol blue. Nedegradovaná DNA odpovídala svojí délkou přidanému markeru lambda a neobsahovala fragmentovanou DNA směrem k čelu gelu. Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru při vlnové délce 260 nm. Pro následnou amplifikaci pomocí PCR byla získaná DNA standardně zředěna na 20 ng/µl.

4.3 PCR

K PCR byly použity jak mnou vyizolované vzorky DNA, tak i vzorky z Botanického ústavu Akademie věd v Průhonicích. Celkem bylo pro výběr nejvariabilnějších chloroplastových markerů analyzováno 7 jedinců ze skupiny *Chenopodium album* agg. (tab. č. 1) a 10 chloroplastových markerů (tab. č. 2). Amplifikováno bylo celkem 70 úseků cpDNA.

Tab. č. 1: Testovací vzorky pro analýzu chloroplastové DNA.

vzorek	název	druh	ploidie
1	F3-5	<i>C. ficifolium</i>	2
2	S2-2	<i>C. suecicum</i>	2
3	3-3	<i>C. striatiforme</i>	4
4	40	<i>C. striatiforme</i>	4
5	118	<i>C. strictum</i>	4
6	111	<i>C. opulifolium</i>	6
7	216	<i>C. album</i>	6

Do fylogenetických analýz bylo zahrnuto 48 jedinců ze skupiny *Chenopodium album* agg. (příloha č. 1) a 4 chloroplastové markery. Celkem se amplifikovalo 192 úseků cpDNA.

Jednotlivé vzorky DNA byly analyzovány pomocí primerových kombinací uvedených v tabulce č. 2 s cílem vybrat nejvariabilnější chloroplastové markery.

Amplifikace požadovaných chloroplastových úseků probíhala dle přednastaveného PCR profilu (viz tab. č. 3) na termocykléru Eppendorf proS, druhy a množství reagensů pro PCR reakci použitých pro jednotlivé chloroplastové markery uvádí tabulka č. 4.

Tab. č. 2: Jednotlivé úseky chloroplastových markerů (cp 1 – 10), primery F a R, Ta – optimální annealingová teplota. Dle práce Shaw et al. (2005*; 2007).

cpDNA	Úsek	Primery	Sekvence primeru	Ta (°C)
1	rpl32-trnL	trnL(UAG)	CTGCTTCTAAGAGCAGCGT	52
		rpL32-F	CAG TTCCAAAAAACGTACTTC	
2	trnQ-5'rps16	trnQ(UUtG)	GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC	51
		rpS16x1	GTTGCTTTYTACCACATCGTTT	
3	3'trnV-ndhC	trnV(UAC)x2	GTCTACGGTTCGARTCCGTA	56
		ndhC	TATTATTAGAAATGYCCARAAAATATCATATTC	
4	ndhF-rpl32	ndhF	GAAAGGTATKATCCARGMATATT	49
		rpL32-R	CCAATATCCCTTRRTTTTCCAA	
5	psbD-trnT	psbD	CTCCGTARCCAGTCATCCATA	53
		trnT(GGU)-R	CCCTTTAACTCAGTGGTAG	
6	psbJ-petA	psbJ	ATAGGTACTGTARCYGGTATT	49
		petA	AAGARTTYGARAAGGTTCAATT	
7	3'rps16-5'trnK	rpS16x2f2	AAAGTGGGTTTTTATGATCC	52
		trnK(UUU)x1	TTAAAAGCCGAGTACTCTACC	
8	atpI-atpH	atpI	TATTTACAAGYGGTATTCAAGCT	52
		atpH	CCAAYCCAGCAGCAATAAC	
9	petL-psbE	petL	AGTAGAAAACCGAAATAACTAGTTA	53
		psbE	TATCGAATACTGGTAATAATATCAGC	
10*	trnD-trnT	trnD(GUC)F	ACCAATTGAACTACAATCCC	55
		trnT(GGU)	CTACCACTGAGTTAAAAGGG	

Tab. č. 3: PCR průběh teplot pro amplifikaci chloroplastové DNA. Ta – annealingová teplota pro jednotlivé chloroplastové markery 1 – 10 (viz tab. č. 1).

Krok	Teplota (°C)	čas	počet cyklů
Iniciální denaturace	95	3 min	} 30 x
Denaturace	95	30 s	
Annealing	TA	1 min	
Elongace	72	2,5 min	
Závěrečná elongace	72	10 min	
Hold	10	-	

Tab. č. 4: PCR mix pro jednotlivé chloroplastové markery.

Mix (1, 2, 3, 5)	μl	Mix (4, 6, 7, 8, 9, 10)	μl
H ₂ O	15,4	H ₂ O	14,4
10 x Buffer	2,5	10 x Buffer	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	MgCl ₂ (25 mM)	2,5
dNTP (2 mM)	2,5	dNTP (2 mM)	2,5
Primer F (10 uM)	0,5	Primer F (10 uM)	0,5
Primer R (10 uM)	0,5	Primer R (10 uM)	0,5
Taq polymerase (5 U/ul Fermentas)	0,1	Taq polymerase (5 U/ul Fermentas)	0,1
Template	2	Template	2
Reaction Volume	25	Reaction Volume	25

PCR produkty byly zkontrolovány na 1% agarózovém gelu v TAE pufru. Na gel se nanesl 1 μl marker O´GeneRuler™ 100bp Ladder Plus (Fermentas, Maryland, USA) a 2,5 μl PCR produktu, navíc byl přidán vzorek sloužící jako test, zda nedošlo při PCR ke kontaminaci vzorků.

4.4 Purifikace PCR produktu a sekvenování

Vzorky určené k sekvenování byly poslány do firmy Macrogen v Soulu (Korea), kde proběhla i jejich purifikace.

4.5 Analýzy získaných sekvencí

Chromatogramy sekvencí byly kontrolovány a ručně upraveny v programu Chromas Lite 2.1 (Technelysium, Ltd, Austrálie). K tvorbě alignmentů byl použit program BioEdit (Hall, 1999). Nejprve bylo testováno 7 zkušebních vzorků a pro další analýzy se použilo 48 vzorků náležících k 10 druhům rodu *Chenopodium*. Seznam jedinců, lokality sběru a ploidní úrovně jsou uvedeny jako příloha 1.

Po kontrole sekvencí bylo nutné vyřadit 4 vzorky kvůli špatné kvalitě sekvencí a všechny úseky získané chloroplastovým markerem *ndhF-rpl32*. K dalším analýzám 44 získaných sekvencí bylo nutné je spojit dohromady do jednoho souboru dat. Ke spojení všech sekvencí získaných pomocí úseků *rpl32-trnL*, *psbJ-petA* a *trnD-trnT* za sebe posloužil internetový toolbox na úpravu sekvencí FaBox 1.41 (Villesen, 2007), konkrétně nástroj „*Fasta sequence joiner*“. Spojování probíhalo postupným nahráváním souborů ve formátu *.fasta, protože nástroj

neumožňoval napojení tří sekvencí naráz. Výsledný spojený alignment byl uložen jako *.fasta soubor a otevřen a zkontrolován v programu BioEdit (Hall, 1999).

Soubory dat obsahovaly větší množství insercí a delecí s délkou více než 1 bp, proto byly indely kódovány na základě metody „*Simple Gap Coding*“ (Simmons et Ochoterena, 2000) v programu SeqState 1.4.1 (Müller, 2005). Získaný soubor *.nex byl otevřen v EditPadu, kódované indely, zapsané binárním kódem (01), byly substituovány za nukleotidy 0 – T, 1 – A a doplněny za jednotlivé sekvence jako dodatečné znaky. Výsledný soubor byl uložen ve formátu *.nexus.

4.6 Výběr nejvariabilnějších chloroplastových markerů

Pro výběr nejvhodnějších chloroplastových markerů bylo použito 7 testovacích vzorků ze skupiny *Chenopodium album* agg. s různou ploidní úrovní (tab. č. 1). Porovnávány byly úseky získané pomocí jednotlivých chloroplastových markerů (tab. č. 2).

Výpočty diverzity a divergence k určení nejvariabilnějšího chloroplastového markeru byly vytvořeny v programu MEGA5.2.2 (Tamura et al., 2011). Genetická vzdálenost sekvencí byla vypočtena pomocí metody p-distance. Pro porovnání rozdílu variability mezi sekvencemi byla pro všechny chloroplastové markery použita distanční analýza „*Pairwise differences*“.

Pro další analýzy byla data rozřazena do skupin podle stupně ploidie. Vzorky 1 – 7 byly rozřazeny podle ploidie tak, aby odpovídaly testování v rámci skupiny polyploidie a skupiny diploidie pro každý chloroplastový marker zvlášť. Pro variabilitu jednotlivých chloroplastových markerů byly porovnávány všechny sekvence mezi sebou. Diverzita byla vypočítána pomocí Jukes-Cantor modelu (1969) a pro porovnání metodou p-distance. V možnostech volby byla ponechána defaultní nastavení analýz.

4.7 Tvorba haplotypové sítě

Haplotypové sítě byly vytvořeny v programu TCS1.21 (Clement et al., 2000). Vstupní soubor byl ve formátu nexus. V analýze byl zadán 90 % connection limit. Vyexportovaná haplotypová síť se dále zpracovala v programu Adobe Illustrator CC Tryout verze 17.1.0 (64 Bit).

4.8 Tvorba fylogenetického stromu

K sestrojení fylogenetického stromu bylo použito celkem 44 jedinců z celkového počtu 48 (4 byli vyřazeni kvůli špatné kvalitě získaných sekvencí). Cílem bylo zjistit fylogenetické vztahy mezi studovanými jedinci. K vytvoření fylogenetických stromů byl použit program MEGA5.2.2.

4.8.1 Metoda Neighbour – Joining

Fylogenetický strom byl sestrojen pomocí „*Neighbour – Joining Tree*“ a jako metoda výpočtu genetických vzdáleností byla zvolena p-distance a Jukes-Cantor model (1969). Pro ověření spolehlivosti výsledků byla vypočtena podpora topologie s použitím „*Bootstrap Method*“ s 1000 opakováními.

4.8.2 Metoda Maximum Parsimony

Porovnávání stromů probíhalo s využitím heuristického hledání pomocí algoritmu „*Tree Bisection Reconnection (TBR)*“ Sekvence byly zařazeny do analýz náhodně, a to ve 100 opakováních. K podpoře zjištěných topologií byla opět použita neparametrická metoda opakovaného výběru „*Bootstrap*“ a nastaveno 1000 opakování. Jako „outgroup“ byl pro studované taxony zvolen blízce příbuzný taxon *C. vulvaria* 226 z Maďarska, který se od skupiny v minulosti odštěpil.

5. VÝSLEDKY

5.1 Naměřená koncentrace DNA a poměr absorbancí

Celkem bylo do analýz zahrnuto 48 vzorků DNA. Naměřené hodnoty koncentrací DNA (ng/μl) a poměr absorbancí (260/280 a 260/230) jsou uvedeny v tabulce jako příloha č. 6.

5.2 Analýzy sekvencí

Získané elektroforetogramy byly rozděleny na dvě části. Prvních 7 vzorků amplifikovaných *rpl32-trnL*, *trnQ-5'rps16*, *3'trnV-ndhC*, *ndhF-rpl32*, *psbD-trnT*, *psbJ-*

petA, *3'rps16-5'trnK*, *atpl-atpH*, *petL-psbE* a *trnD-trnT* úseků sloužilo k porovnání míry variability a zjištění čtyř nejvariabilnějších chloroplastových markerů.

U dalších 48 vzorků se jednalo o data pro vlastní fylogenetické analýzy. Bylo nutné vyřazení úseku *ndhF-rpl32* z důvodu špatné kvality sekvencí. Ze stejného důvodu byly z ostatních sekvencí vyřazeny nevyhovující vzorky *C. album* 147, *C. album* 205, *C. suecicum* 27 a *C. urbicum* 148. Do fylogenetických analýz byly celkem zahrnuty sekvence od 44 jedinců.

5.3 Výběr nejvariabilnějších chloroplastových markerů

Bylo testováno 7 jedinců z pěti druhů, vybraných na základě taxonomické příslušnosti, aby tak bylo možné určit nejvariabilnější cpDNA marker. Po sekvenování byl vyřazen marker *3'trnV-ndhC*, protože ho nebylo možné dále analyzovat, všechny sekvence byly nečitelné. Délka získaných alignmentů se pohybovala od 700 bp do 1080 bp. Nejkratší byl úsek získán pomocí markeru *atpl-atpH* a nejdelší *trnD-trnT*.

5.3.1 Nukleotidová diverzita mezi chloroplastovými markery

Míry rozdílů mezi jednotlivými sekvencemi v rámci studovaných úseků jsou uvedeny v tabulce č. 5.

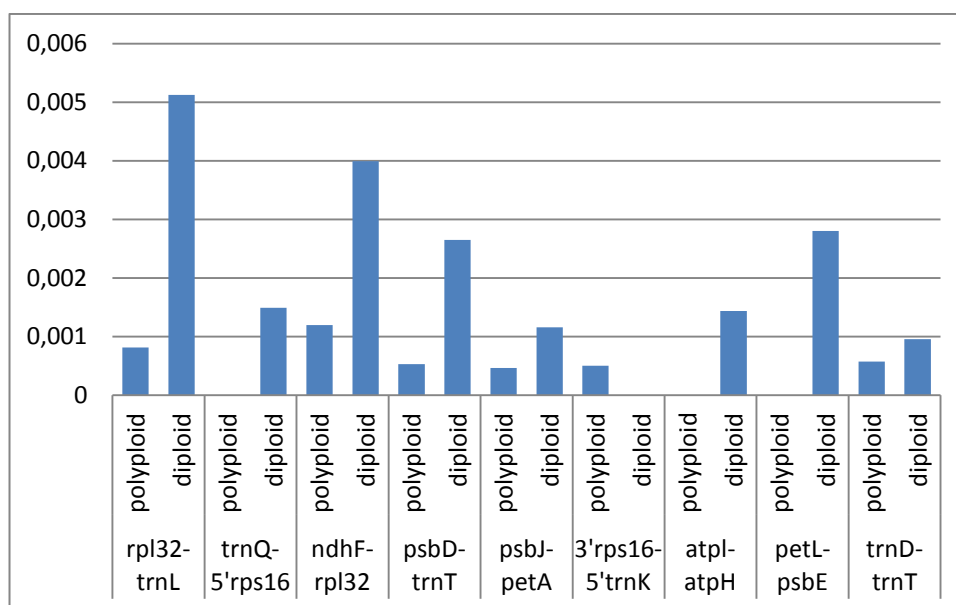
Tab. č. 5: Vypočtená p-distance všech sekvencí pro jednotlivé markery a odhady průměrné nukleotidové diverzity v rámci skupin „diploidi versus polyploidi“ a „diploidi x tetraploidi x hexaploidi“.

Marker	p-distance	Průměrná diverzita D x P	Průměrná diverzita D x T x H
<i>rpl32-trnL</i>	0,008	0,0030	0,0020
<i>trnQ-5'rps16</i>	0,005	0,0007	0,0005
<i>ndhF-rpl32</i>	0,006	0,0026	0,0021
<i>psbD-trnT</i>	0,004	0,0016	0,0011
<i>psbJ-petA</i>	0,006	0,0008	0,0008
<i>3'rps16-5'trnK</i>	0,004	0,0003	0,0003
<i>atpl-atpH</i>	0,003	0,0007	0,0005
<i>petL-psbE</i>	0,004	0,0014	0,0009
<i>trnD-trnT</i>	0,005	0,0008	0,0009

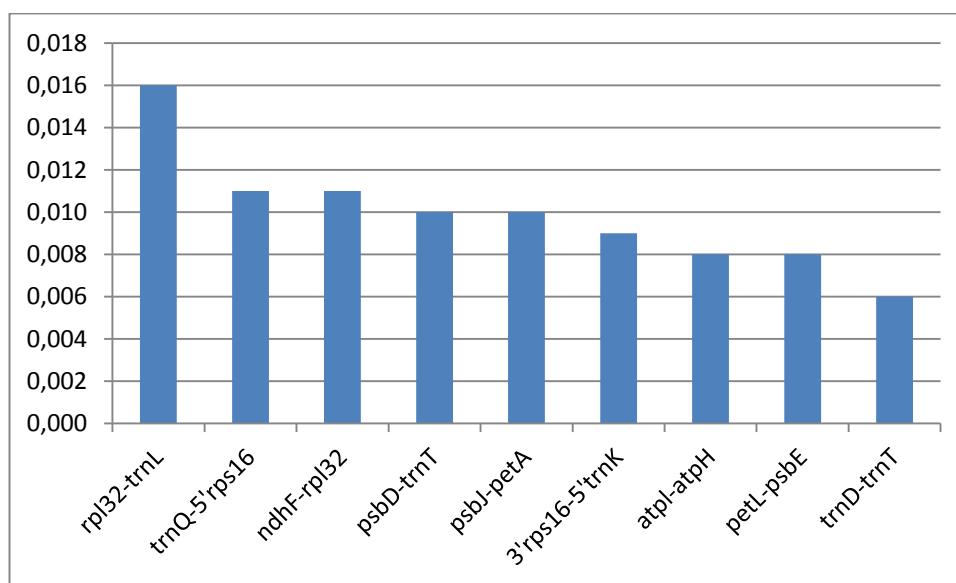
Z porovnání průměrné nukleotidové diverzity vychází nejlépe markery *rpl32-trnL*, *ndhF-rpl32*, *psbJ-petA*, *trnQ-5'rps16* a *trnD-trnT* (řazeno sestupně).

Porovnání „Parwise differences“ zobrazuje rozdíly ve variabilitě mezi jednotlivými sekvencemi 7 testovacích vzorků. Jako nejvíce variabilní markery se jevíly *rpl32-trnL*, *ndhF-rpl32*, *psbJ-petA*, a *trnD-trnT*. Tabulky pro všechny analyzované chloroplastové markery se nacházejí v oddíle přílohy jako příloha č. 7.

V následujících grafech je uveden podíl unikátních nukleotidů v sekvencích vždy v rámci jednoho chloroplastového markeru. Na obrázku č. 5 je graf divergence v rámci skupiny diploidi a skupiny polyploidi pro každý chloroplastový marker. Graf č. 6 ukazuje celkovou variabilitu jednotlivých markerů v celém datasetu. Vyšší číslo poukazuje na větší variabilitu chloroplastových markerů.



Obr. č. 5: Graf divergence v rámci skupiny polyploidi a skupiny diploidi. Sloupce znázorňují podíl unikátních nukleotidů v jednotlivých sekvencích. Chybějící sloupce obsahují nulovou hodnotu.

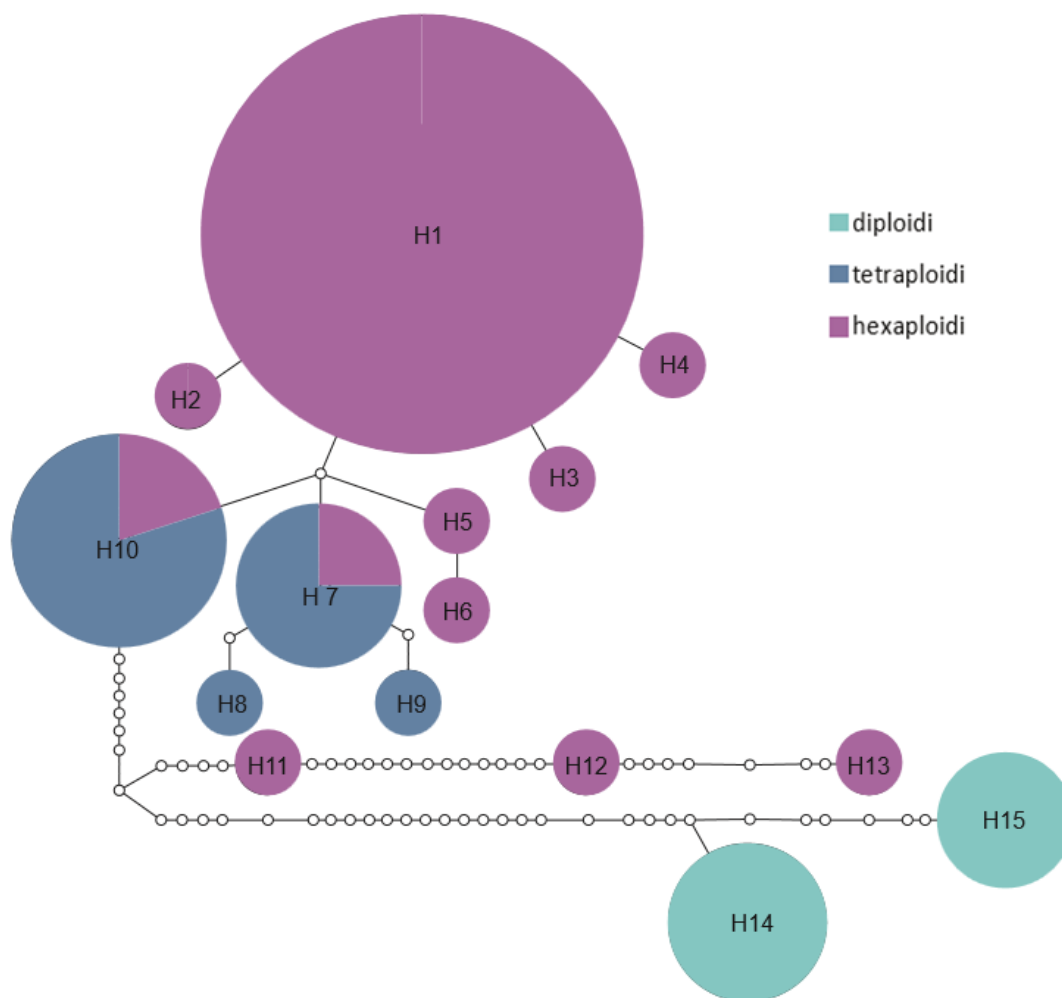


Obr. č. 6: Graf variability jednotlivých chloroplastových markerů. Sloupce znázorňují podíl unikátních nukleotidů v jednotlivých sekvencích porovnávaných mezi sebou.

Porovnáním těchto grafů se jako nejvíce variabilní projeví markery *rpl32-trnL*, *trnD-trnT*, *ndhF-rpl32*, *psbJ-petA*, a *trnD-trnT*. Podle grafu na obrázku č. 5 je patrné, že byly vyřazeny markery obsahující nulovou hodnotu, tedy *trnQ-5'rps16*, *3'rps16-5'trnK*, *atpI-atpH* a *petL-psbE*. V konečném součtu byly vybrány následující chloroplastové markery: *rpl32-trnL*, *ndhF-rpl32*, *psbJ-petA*, a *trnD-trnT*.

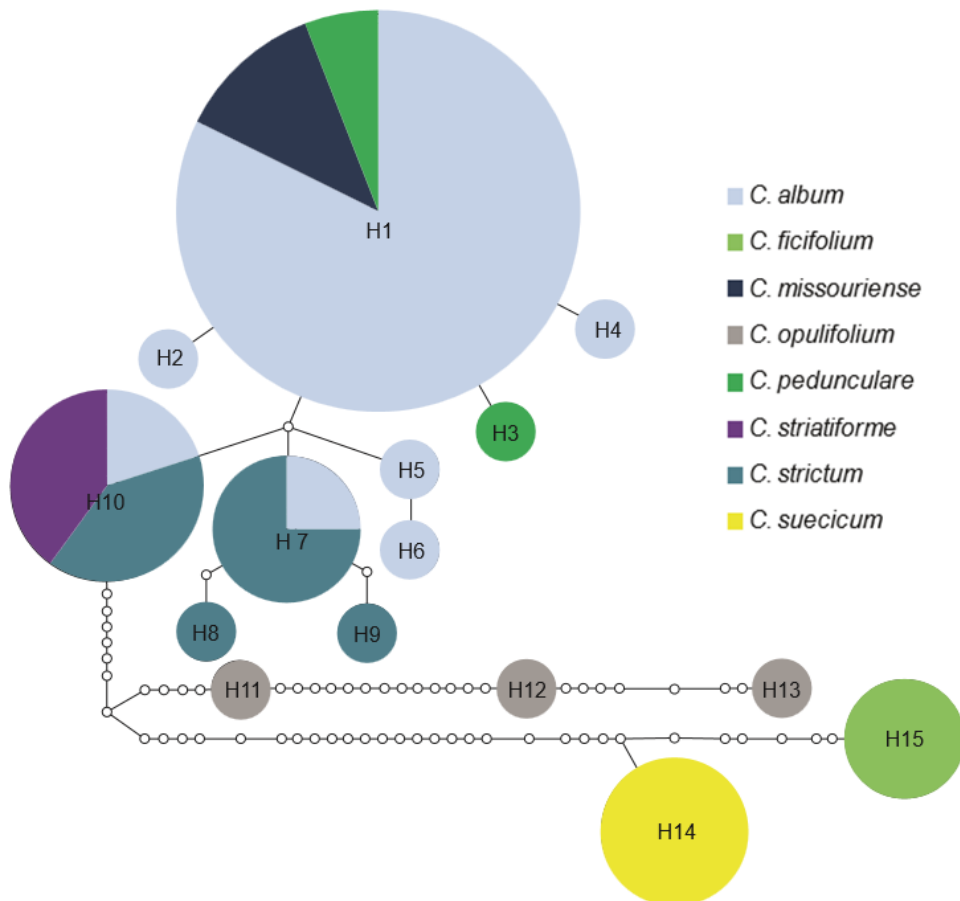
5.4 Haplotypové sítě

Ze 44 jedinců zastupujících 9 druhů (*C. album*, *C. ficifolium*, *C. missouriense*, *C. opulifolium*, *C. pedunculare*, *C. striatiforme*, *C. strictum*, *C. suecicum* a *C. vulvaria*), u kterých byly analyzovány úseky *rpl32-trnL*, *psbJ-petA*, a *trnD-trnT* cpDNA, bylo zaznamenáno 15 různých haplotypů. Jednotlivé haplotypy H1 – H15 byly velikostně rozděleny podle počtu obsažených jedinců na kruhové diagramy, obarveny podle příslušnosti ke druhům nebo podle ploidie. Prázdná kolečka mezi haplotypy označují počet mutací. Obrázek č. 7 představuje haplotypovou síť zobrazující ploidii a obrázek č. 8 haplotypovou síť jednotlivých druhů. Kompletní soupis příslušnosti jedinců k haplotypům obsahuje souhrnná tabulka v příloze č. 1.



Obr. č. 7: Haplotypová síť 15 zjištěných haplotypů s vyznačením ploidii, založená na sekvenování úseků *rpl32-trnL*, *psbJ-petA*, a *trnD-trnT* cpDNA. Jednotlivé kruhy představují haplotypy H1 – H15 a velikost kruhů/výsečí odpovídá počtu jedinců. Fialová barva označuje hexaploidy, modrá tetraploidy a světle modrá diploidy. Jednotlivé mutace jsou znázorněny prázdnými kolečky mezi jednotlivými haplotypy.

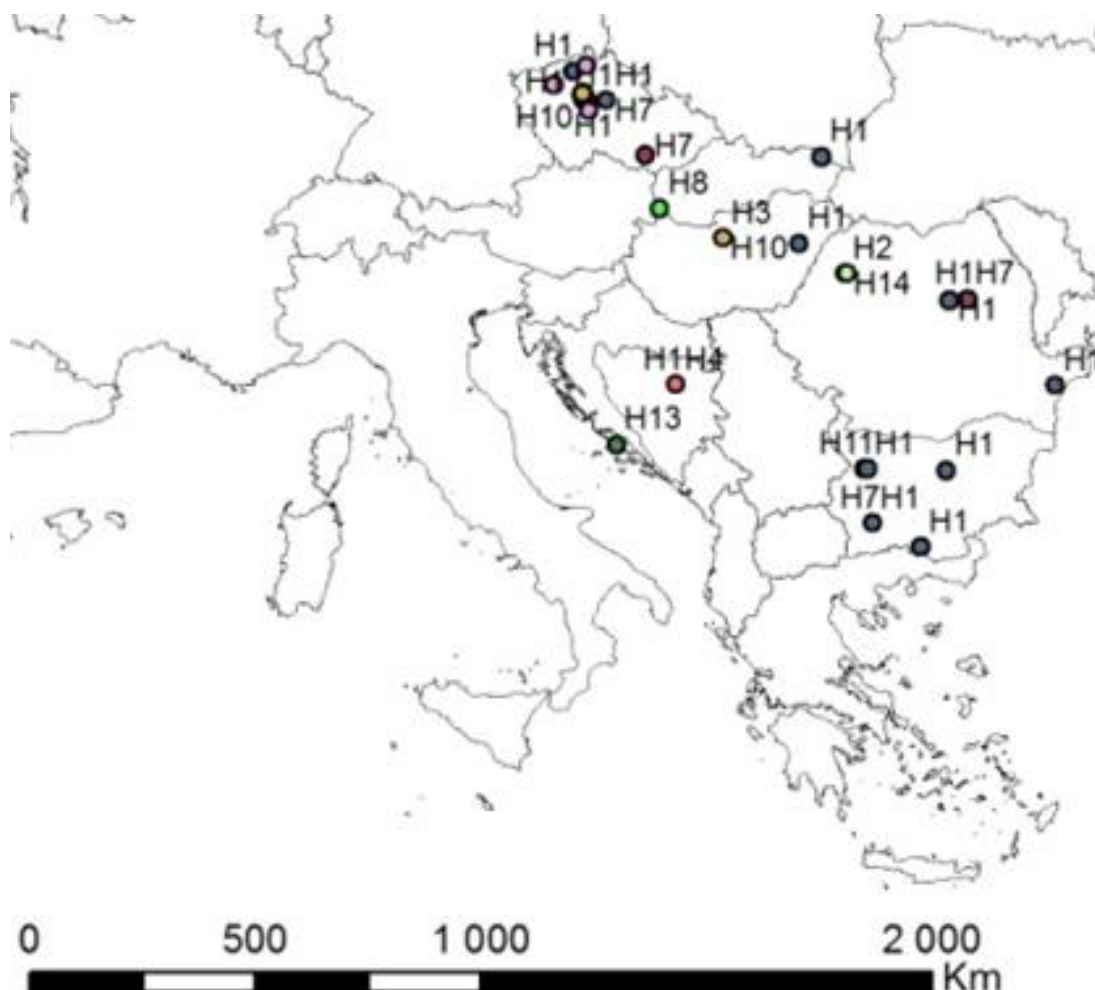
Z obrázku č. 7 je jasně patrné, že diploidy mají odlišný haplotyp než vyšší ploidie. Tetraploidy mají dva samostatné haplotypy H8 a H9 a dva haplotypy H7 a H10 mají společné s hexaploidy. U hexaploidů bylo zaznamenáno 11 rozličných haplotypů.



Obr. č. 8: Haplotypová síť 15 zjištěných haplotypů s vyznačením jednotlivých druhů, založená na sekvenování úseků *rpl32-trnL*, *psbJ-petA*, a *trnD-trnT* cpDNA. Jednotlivé kruhy představují haplotypy H1 – H15 a velikost kruhů/výsečí odpovídá počtu jedinců. Jednotlivé mutace jsou představovány prázdnými kolečky mezi jednotlivými haplotypy. Barevné označení haplotypů odpovídá barvám druhů v legendě.

Nejčastěji se vyskytující byl haplotyp H1 se 17 jedinci (obr. č. 8). Od haplotypu H1 se nejméně evolučních změn projevilo na haplotypech H2, H3 a H4, taktéž tvořených hexaploidy. Haplotyp H7 mají tetraploidní *C. strictum* společný s hexaploidem *C. album*. Stejný haplotyp H10 mají jak tetraploidní taxony *C. strictum* a *C. striatiforme*, tak i hexaploidní *C. album*. Po vlastní evoluční ose se vytvářely odlišné haplotypy pro hexaploidní *C. opulifolium* a další samostatná větev s haplotypy H14 a H15, tvořená diploidy *C. suecicum* a *C. strictum*. *C. vulvaria*, s naprosto rozdílným haplotypem, nebyl nijak napojen do haplotypové sítě. Nejvíce variabilními taxony byly hexaploidní *C. album*, mající 7 různých haplotypů, a tetraploidní *C. strictum* se 4 haplotypy. Dva diploidní taxony měly každý jeden vlastní oddělený haplotyp, *C. suecicum* H14 a *C. ficifolium* H15. S ohledem na evoluční vzdálenost haplotypů tetraploidů a hexaploidů k diploidům lze haplotypy vyšších polyploidů rozdělit do dvou haploskupin. Na základě minimálního rozdílu

v počtu mutací mezi haplotypy H1 – H4 je lze zařadit pod jednu haploskupinu A, zahrnující výhradně hexaploidní taxony. Druhá haploskupina B zahrnuje haplotypy H5 – H10, tvořené tetraploidními i hexaploidními taxony, které se od sebe navzájem liší nejméně jednou mutací, ale jsou si evolučně blízké. Pro názornost byly haploskupiny zaneseny do výsledného fylogenetického stromu (obr. č. 10) a barevně vyznačeny do souhrnné tabulky (příloha č. 1) v oddíle přílohy.



Obr. č. 9: Mapa zastoupení haplotypů rodu *Chenopodium* založená na sekvenování úseků *rpl32-trnL*, *psbJ-petA*, a *trnD-trnT* cpDNA. Detailní pohled na střední a jihovýchodní Evropu. Jednotlivé haplotypy H1 – 15 jsou barevně odlišeny a opatřeny popisem.

Detailní mapka střední a jihovýchodní Evropy se znázorněním zastoupení haplotypů (obr. č. 9). Výskyt haplotypů je nezávislý na geografickém původu jedince. Haplotyp H1 je sdílen jedinci napříč Evropou. Mapy (přílohy č. 4 a 5) znázorňují zastoupení haplotypů rodu *Chenopodium* ve střední a jihovýchodní Evropě a Rusku a v detailním pohledu v České republice. Vzhledem k nahuštění míst sběru vzorků dochází k překryvu haplotypů, detailní rozřazení haplotypů pro všechny zkoumané jedince viz příloha č. 1.

5.5 Fylogenetické stromy

5.5.1 Metoda Neighbour – Joining

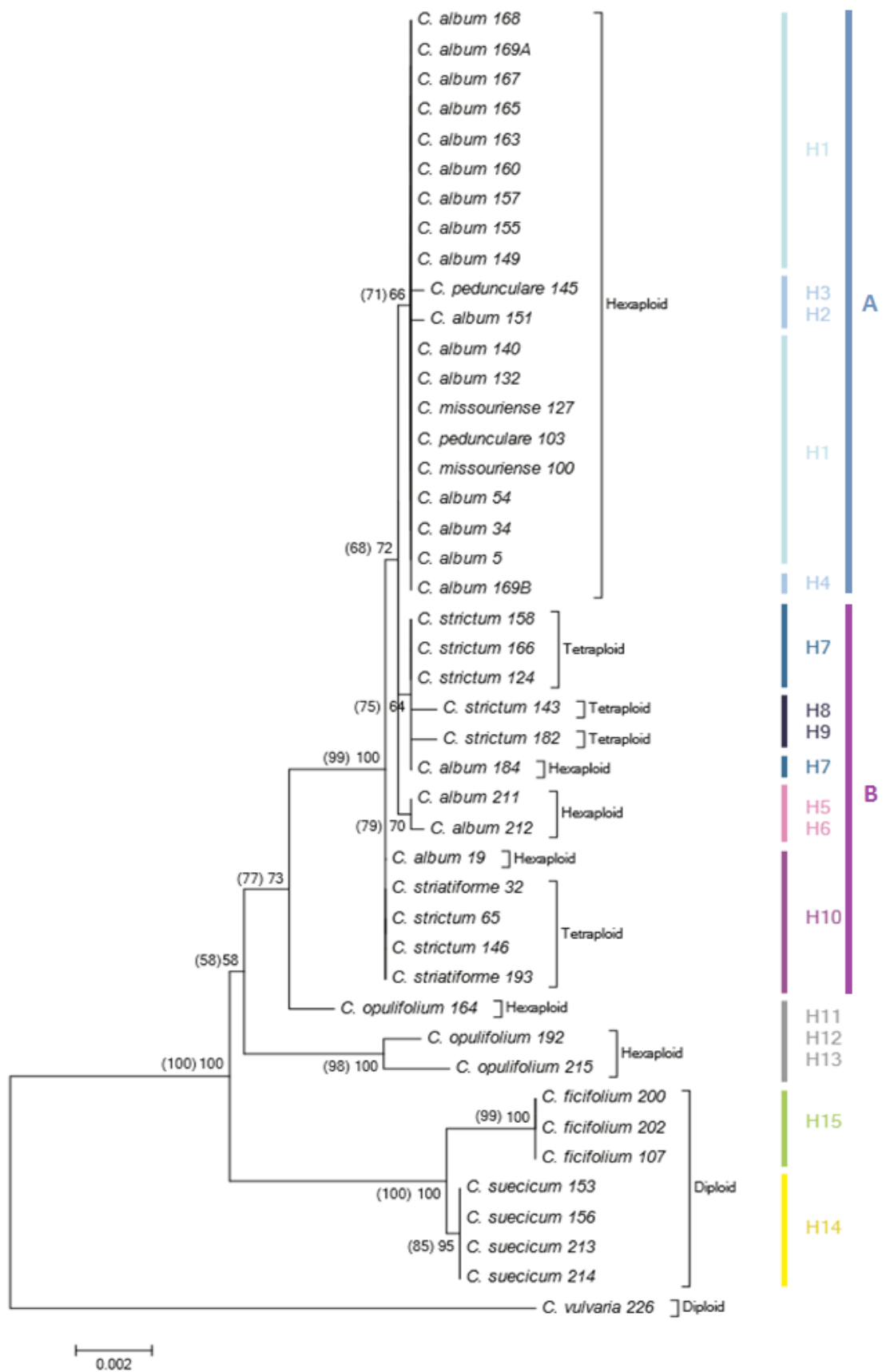
Vyobrazený strom (obr. č. 10) je vytvořen metodou p-distance na základě 44 sekvencí získaných pomocí 3 chloroplastových markerů *rpl32-trnL*, *psbJ-petA* a *trnD-trnT*. Celková délka jednotlivých alignmentů byla 3230 bp a 3263 bp včetně kódovaných indelů. Stromy vytvořené podle Jukes-Cantor modelu (1969) zde nejsou prezentovány, neboť se téměř shodovaly.

5.5.2 Metoda Maximum Parsimony

Vytvořením fylogenetického stromu pomocí „Maximum Parsimony“ byl získán jeden konsenzuální strom. Získané hodnoty podpory topologie byly zaneseny do fylogenetického stromu vytvořeného metodou p-distance (obr. č. 10).

Z obrázku č. 10 je patrné oddělení tří hlavních větví: 1. větev – diploidi (haplotypy H14 a H15), 2. větev – 2 haplotypy *C. opulifolium* (H12 a H13) a 3. větev – třetí haplotyp *C. opulifolium* (H11) a ostatní polyploidi (haplotypy H1 – H10). První větev zahrnuje diploidní taxony *C. ficifolium* z České republiky a *C. suecicum* (Rumunsko – 153, 156, Rusko – 213, 214), které se oddělily s maximální podporou bootstrapu 100 (100). Druhou větev tvoří 2 hexaploidní jedinci *C. opulifolium* (Česká republika – 192, Chorvatsko – 215), a to s nevelkou podporou 58 (58), naopak vnitřní uzly se oddělily s jednoznačnější podporou 100 (98). Poukazuje to na velké evoluční rozdíly mezi nimi. Tyto míry podpory potvrzují i rozestupy mezi všemi třemi haplotypy *C. opulifolium* (obr. č. 7, 8) s velkým počtem mutací mezi jednotlivými jedinci. Třetí a největší větev společně tvoří třetí haplotyp *C. opulifolium* 164 z Bulharska a ostatní vyšší polyploidi s podporou 73 (77). Druh *C. opulifolium* je zde bazálním druhem, tj. je potomkem jednoho z prvních štěpení skupiny a je nejbliže společnému předkovi celé skupiny.

Třetí hlavní větev se dále rozdělila na dvě větve. Jedna větev zahrnuje druhy sdílející haplotyp H10 – tetraploidní *C. strictum* (Česká republika – 65, Maďarsko – 146), *C. striatiforme* (Česká republika) a hexaploidní *C. album* (Česká republika). Tato větev se oddělila s téměř maximální podporou topologie 100 (99). Druhá větev s podporou 72 (68) se dále diferencovala na tři sesterské skupiny.



Obr. č. 10: Fylogenetický strom založený na sekvenování úseků *rpl32-trnL*, *psbJ-petA*, a *trnD-trnT* cpDNA, vytvořený metodou „*Neighbour – joining*“ (p-distance). Zobrazeny jsou bootstrapové hodnoty (1000 opakování) nad 50 % a v závorkách jsou uvedeny hodnoty pro metodu „*Maximum Parsimony*“. Jako „outgroup“ byl zvolen *C. vulvaria*. Jednotlivé haplotypy a haploskupiny jsou barevně odlišeny.

Sesterská skupina „a“ zahrnuje hexaploidní druhy *C. album* v rámci haploskupiny A s podporou 66 (71). Tuto skupinu zastupují rostliny z České republiky, Slovenska, Rumunska, Bulharska, Maďarska a Bosny a Hercegoviny.

Skupina „b“ obsahuje tetraploidy *C. strictum* (Rumunsko – 158, Bulharsko – 166, Česká republika – 124, Maďarsko – 143 a Rusko – 182) a hexaploid *C. album* (Česká republika – 184) s haplotypy H7 – H9 a podporou větvení 64 (75).

Poslední sesterskou skupinu „c“ tvoří dva hexaploidi *C. album* z Ruska s haplotypy H5 a H6 podpořenou topologií 70 (79).

Evolučně nejbliže k hexaploidům *C. album* 19 a *C. album* 184 pocházejícím z ČR mají tetraploidy *C. striatiforme* a *C. strictum*, kteří pocházejí z Bulharska a Maďarska. Sdílejí spolu i stejné haplotypy H7 a H10.

6. DISKUSE

Cílem diplomové práce bylo objasnit původ hexaploidního druhu *C. album* a na základě analýz cpDNA určit po mateřské linii evoluční vztahy mezi diploidními, tetraploidními a hexaploidními zástupci 9 druhů ze skupiny *Chenopodium album* agg.

Nevýhody použití cpDNA

Nevýhodou použití cpDNA je možnost určit pouze mateřskou linii. Při probíhající hybridizaci a polyploidizaci dědí cpDNA jedinec vždy maternálně. Paternální linii nelze určit, nejde tak stanovit oba mateřské jedince, ani jestli došlo k mezidruhovému křížení. Jak tedy získat jistotu, zda k hybridizaci vůbec dochází, aby bylo možné cpDNA použít? Pokusná křížení mezi jedinci rodu *Chenopodium* provedl Mandák et al. (2012) v AVČR v Průhonicích se snahou získat hybridní jedince. Celkem použili ke křížení 5 druhů, které se vyznačovaly přibližně stejnou dobou kvetení. Jelikož u druhu *C. strictum* dochází k pozdnímu kvetení na podzim, použili místo něj dříve kvetoucí *C. striatiforme*. Mezi rostlinami F1 generace nebyl přítomen žádný heteroploidní hybrid, což poukazuje na vzácný výskyt hybridizace nebo na to, že k ní došlo v minulosti a nyní již neprobíhá.

Výběr chloroplastových markerů

Pro výběr univerzálních chloroplastových markerů je nutné, aby úseky, kde nasedají primery, byly dostatečně konzervativní a bez mutací. Proto byly ve studii použity markery, které na širokém spektru nekódujících úseků cpDNA ověřil Shaw et al. (2005; 2007) a které dostatečně postihují variabilitu v cpDNA. Bohužel se nepodařilo získat kvalitní sekvence ze sekvenování úseků čtvrtého vybraného markeru *ndhF-rpl32* a analýzy tak byly ochuzeny o cenné údaje, které by mohly přispět k dokonalejšímu vykreslení fylogenetického stromu. Přesto na základě pairwise differences byla posouzená variabilita úseků jednotlivých chloroplastových markerů použitých v této studii dostatečná pro odlišení jednotlivých taxonů.

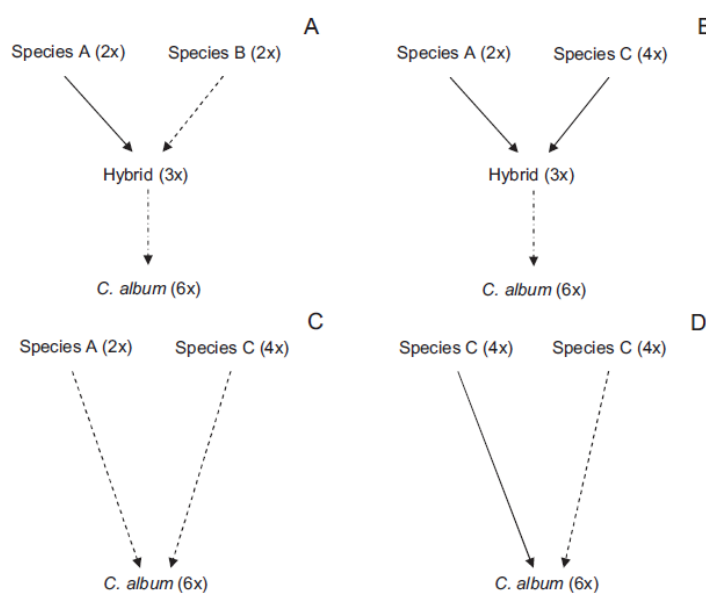
Mnoho studií se v současnosti zabývá variabilitou sekvencí cpDNA a existuje několik desítek chloroplastových markerů, které různě postihují variabilitu cpDNA a jsou univerzální pro většinu krytosemenných rostlin (Shaw et al., 2007). Studie, kterou vypracovali Bafeel et al. (2012), byla zaměřená na barcoding (metoda identifikace taxonu pomocí standardizovaných úseků DNA) genů plastidových úseků (*rbcL* a *matK*) u rodu *Chenopodium*. Pomocí metody pairwise porovnávali získané úseky vzorků s databankou sekvencí (GenBank database). Pairwise porovnání sekvencí ukázalo vyšší podobnost mezi *rbcL* úseky (98%). Pro druhy *C. album* a *C. ficifolium* byla u úseků *rbcL* 100% shoda sekvencí, proto pro takto blízce příbuzné druhy není použití *rbcL* úseku příliš vhodné. U úseku *matK* získali v průměru 94,5% shodu v sekvencích, což naznačuje velkou míru variability těchto úseků. Pro úsek *matK* byla shoda *C. album* a *C. ficifolium* 99%, lze tak s jeho pomocí odhalit variabilitu mezi těmito druhy. Ovšem jako nevýhoda použití variabilního úseku *matK* se zde uvádí jeho často obtížná amplifikace.

Polyploidní komplex *C. album*

Mnoho studií zabývajících se ploidí u rodu *Chenopodium* popisuje *C. album* jako rostliny o různých úrovních ploidie $2n = 2x = 18$ (diploid), $2n = 4x = 36$ (tetraploid) a $2n = 6x = 54$ (hexaploid) a podporuje fakt, že *C. album* tvoří polyploidní komplex (Tanaka et Tanaka, 1980; Partap et Kapoor, 1985; Kolano et al., 2008). V této práci byl taxon *C. album* chápán jako samostatný druh s ploidí $2n = 6x = 54$ (hexaploid).

Možné cesty vzniku hexaploida *C. album*

Jak naznačuje Mandák et al. (2012), jsou pravděpodobné celkem čtyři různé cesty vzniku hexaploidního *C. album*, a to jako allopolyploida mezi dvěma diploidy, diploidem a tetraploidem nebo dvěma tetraploidy (obr. č. 13).



Obr. č. 13: Předpokládané cesty vzniku hexaploida *C. album* s. str. prostřednictvím hybridizace a polyploidizace. Linie zobrazují hybridizaci nebo autopolyploidizaci. Plné čáry prezentují redukované gamety, přerušované čáry představují neredukované gamety a čerchované čáry představují autopolyploidizaci. A – vznik druhu *C. album* zahrnující dva diploidní druhy; B, C – vznik druhu *C. album* zahrnující diploidní a tetraploidní druhy; D – vznik druhu *C. album* zahrnující pouze tetraploidní druhy (Mandák et al., 2012).

Výsledky průtokové cytometrie odhalily, že nejpravděpodobněji mohl vzniknout *C. album* jako hybrid tetraploida a diploida, rozdíl mezi očekávaným obsahem DNA a naměřenými hodnotami se pohyboval od 0,3 – 1,0 % (tab č. 10).

Tab č. 10: Test nejpravděpodobnějšího vzniku hexaploida *C. album* na základě dat z průtokové cytometrie. Porovnání na základě obsahu DNA *C. album* s. str. = 1.524. $2x + 2x$ – vznik hexaploida přes triploidní most následovaný polyploidizací, $2x + 4x$ – spojení redukovaných gamet následované polyploidizací nebo spojením dvou neredukovaných gamet, $4x + 4x$ – spojení redukované a neredukované gamety (Mandák et al., 2012).

Origin	Expected DNA amount	Difference (%)
$2x + 2x$	2.069–2.076	35.8–36.2
$2x + 4x$	1.509–1.519	0.3–1.0
$4x + 4x$	1.229–1.241	18.6–19.4

Gangopadhyay et al. (2002) na základě RAPD analýzy předpokládají vznik hexaploidního *C. album* jako hybrida dvou odlišných diploidních jedinců *C. album* (jeden se širokými listy a druhý s úzkými listy) společně s *C. murale*. Jelikož se zkoumaní jedinci nacházeli v Indii, je možné předpokládat evolučně odlišné linie, než se vyvinuly u evropských druhů.

Rahiminejad a Gornal v roce 2004 publikovali hypotézu o allopolyploidním původu hexaploida *C. album*, založenou na analýze sekundárních metabolitů patnácti blízce příbuzných druhů. Na základě porovnání obsažených flavonoidů vyšel flavonoidní profil *C. album* jako téměř přesný součet flavonoidů obsažených u diploidů *C. suecicum* a *C. ficifolium*. Z jejich pohledu se *C. album* vyvinul hybridizací těchto dvou druhů nebo jim blízce příbuzných druhů a následnou polyploidizací. Na základě svých výsledků a jejich porovnání s prací, kterou publikovali Rahiminejad a Gornal (2004), dává tabulka shrnutí hlavních flavonoidových kombinací (tab. č. 11) možnost zkombinovat diploida *C. suecicum* s tetraploidem *C. strictum*, přičemž zůstanou zachovány všechny hlavní flavonoidy zastoupené u *C. album*. Rozdílné výsledky ovšem mohou podporovat hypotézu, že v západní Evropě se druh *C. album* vyvíjel odlišným způsobem než ve střední a jihovýchodní Evropě.

Tab. č. 11 :Shrnutí hlavních flavonoidových kombinací u 16 druhů rodu *Chenopodium*. Zkratky druhů: *gla* – *C. glaucum*, *hyb* – *C. hybridum*, *pol* – *C. polyspermum*, *mur* – *C. murale*, *fic* – *C. ficifolium*, *sue* – *C. suecicum*, *vul* – *C. vývare*, *ber* – *berlandieri*, *bus* – *C. bushianum*, *nov* – *novopokrovskianum*, *qui* – *C. quinoa*, *str* – *C. strictum*, *alb* – *C. album*, *gig* – *C. giganteum*, *opu* – *C. opulifolium*, *pro* – *C. prostratum* (Rahiminejad et Gornal, 2004).

	<i>Diploid</i>						<i>Tetraploid</i>					<i>Hexaploid</i>				
	<i>gla</i>	<i>hyb</i>	<i>pol</i>	<i>mur</i>	<i>fic</i>	<i>sue</i>	<i>vul</i>	<i>ber</i>	<i>bus</i>	<i>nov</i>	<i>qui</i>	<i>str</i>	<i>alb</i>	<i>gig</i>	<i>opu</i>	<i>pro</i>
Section/subsection ^a :	1	2	3	4	5	5	6	5	5	6	5	6	6	6	6	6
Quercetin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kaempferol		+	+	+		+		+	+	+	+		+	+	+	+
Isorhamnetin	+				+		+			+		+	+	+	+	+
4'-O-methylation			+													
6-O-methylation			+													
7-O-methylation			+													
3-O-glycosylation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7-O-glycolysation				+												
Acylated glycosides	+	+	+	+	+	+				+			+	+	+	+

^a Subsectional taxonomy of Aellen (1960): 1 = sect. *Pseudoblitum*, 2 = sect. *Chenopodium* subsect. *Grossefoveata*, 3 = subsect. *Polysperma*, 4 = subsect. *Undata*, 5 = subsect. *Cellulata*, 6 = subsect. *Leiosperma*

Koňáková (2013) ve své diplomové práci k určení nejpravděpodobnější možnosti vzniku hexaploida *C. album* vycházela ze studie, kterou vypracovali Mandák et al. (2012). Porovnávala rozdíl mezi očekávanou a skutečnou hodnotou indexu u *C. album* a pro případ hybridizace diploida s tetraploidem je odchylka 0,7 %. Signifikantně vyšší odchylka je u vzniku hexaploida cestou spojení dvou diploidů, 36,3 %, a při vzniku ze dvou tetraploidů 19,2 % (tab. č. 12). Potvrzují se tak varianty „B a C“ (obr. č. 13) jako nejpravděpodobnější možnosti vzniku hexaploida *C. album* jako hybrida mezi diploidem a tetraploidem, jak je popsal Mandák et al. (2012).

Tab. č. 12: Tabulka s možnými hypotetickými cestami vzniku hexaploida *C. album*, očekávaná hodnota indexu (O), skutečně naměřená hodnota indexu (S) a rozdíl mezi očekávanou a skutečnou hodnotou indexu (%) (Koňáková Z., 2013).

Původ	Očekávaný index <i>C. album</i> (O)	Skutečný průměrný index <i>C. album</i> (S)	Rozdíl mezi O a S (%)
A 2x + 2x	$(0,3472 + 0,6944) * 2 = 2,0832$	1,5285	36,3
B 2x + 4x	$(0,3472 + 0,4116) * 2 = 1,5176$	1,5285	0,7
C 2x + 4x	$0,6944 + 0,8232 = 1,5176$	1,5285	0,7
D 4x + 4x	$0,4116 + 0,8232 = 1,2348$	1,5285	19,2

Hexaploid *C. album* tak mohl vzniknout pomocí spojení dvou redukovaných gamet (triploid) a stát se hexaploidem následnou polyploidizací, nebo spojením dvou neredukovaných gamet diploida a tetraploida. Předpokládaný vznik hexaploidního *C. album* přes triploida má několik nedostatků. Triploidní *C. album* nebyl nalezen v žádné populaci a ani nevznikl při pokusném křížení (Mandák et al., 2012). O existenci triploida *C. album* nebyly ani dohledatelné zmínky v literatuře. Pokud tedy došlo ke vzniku hexaploidního *C. album* cestou spojení redukovaných gamet a následnou polyploidizací, muselo k tomu dojít v dávné minulosti nebo se tak děje pouze zřídka (Mandák et al., 2012).

V této studii se jako jeden z pravděpodobných mateřských taxonů hexaploida *C. album* potvrdil tetraploid nebo některý předek příbuzný s dnešním tetraploidem. Dva zkoumaní jedinci *C. album* mají shodný haplotyp s tetraploidy *C. strictum* a *C. striatiforme* a i ostatní haplotypy *C. album* a tetraploidů tvořící haploskupinu B jsou si navzájem blízce příbuzné. Naproti tomu haplotypy diploidních druhů jsou od *C. album* evolučně velmi vzdálené. Rovněž haplotypy *C. opulifolium* nesdílejí s žádným haplotypem *C. album*, důvodem může být, že mateřský jedinec v minulosti vyhynul nebo neroste v Evropě. Z navržených cest vzniku hexaploida *C. album* podle Mandáka et al. (2012) a srovnáním výsledků této studie se zdá jako nejpravděpodobnější možnost „C“, kdy hexaploidní jedinec vzniká z diploida a tetraploida a nedochází u něj k redukci gamet.

7. ZÁVĚR

Diplomová práce ukázala evoluční vztahy mezi taxony na základě analýzy sekvencí 44 jedinců 9 druhů rodu *Chenopodium* o různých stupních ploidie a jejich diferenciaci do 15 různých haplotypů. Jak uvádí Dostálek et al. (2003), rod *Chenopodium* je z taxonomického hlediska nedokonale prozkoumán. Práce tak přispěla k určení příbuzenských linií u druhů skupiny *Chenopodium album* agg., u kterých nebyly provedeny rozsáhlejší analýzy DNA. Konkrétně jde o druhy *C. missouriense*, *C. pedunculare*, *C. striatiforme*, *C. strictum* a *C. suecicum*.

Výsledky práce:

- Na základě analýz cpDNA u 7 testovacích vzorků byly vybrány 4 nejvariabilnější chloroplastové markery *rpl32-trnL*, *ndhF-rpl32*, *psbJ-petA* a *trnD-trnT*, z nichž 3 (mimo *ndhF-rpl32*) byly použity pro fylogenetické analýzy a rozřazení 44 jedinců do příslušných haplotypů.
- U diploidních druhů *C. ficifolium* a *C. suecicum* byla v rámci druhu zjištěna malá míra variability v cpDNA. Vytvářejí stabilní samostatné taxony a i v různých geografických oblastech si každý druh zachovává jeden shodný haplotyp.
- Největší rozmanitost mezi jedinci uvnitř druhu vykazoval druh *C. album*. Na základě odlišností v cpDNA utvořil celkem 8 různých haplotypů (včetně *C. missouriense* a *C. pedunculare*).
- Tetraploidní druhy *C. strictum* a *C. striatiforme* nenavazují příbuzensky na diploidní druhy *C. ficifolium* a *C. suecicum*. Tetraploidi se oddělili do vlastní evoluční linie. Lze tak říci, že zkoumané diploidní druhy rostoucí na území střední Evropy a Ruska se nepodílely na vzniku těchto tetraploidů po mateřské linii.
- Analýzami cpDNA byl vyloučen hybridní původ *C. album* po mateřské linii jako potomka diploidů *C. suecicum* a *C. ficifolium* z důvodu velkého počtu evolučních změn v haplotypech.
- *C. album* sdílí shodné haplotypy s tetraploidními druhy *C. striatiforme* a *C. strictum*. Z výsledků analýz cpDNA je možné určit pouze mateřskou linii, která naznačuje možný původ *C. album* jako autopolyploida z tetraploidních druhů *C. striatiforme* nebo *C. strictum*. Na základě srovnání výsledků této

práce, dat z cytometrie (Koňáková, 2013) a obsahu flavonoidů (Rahiminejad et Gornal, 2004) u *C. album* se spíše jedná o allopolyploidní původ *C. album* jako hybrida tetraploida s diploidem.

- U hexaploida *C. opulifolium* byli analyzováni tři zástupci, po jednom z Bulharska, České republiky a Chorvatska. Každý vytvořil vlastní, evolučně velmi odlišný haplotyp. Je možné konstatovat, že se v minulosti odštěpili od společného předka a dál se vyvíjeli v různých geografických oblastech po vlastní evoluční ose a variabilita mezi nimi je tudíž geograficky podmíněná. Společný předek *C. opulifolium* již s největší pravděpodobností zanikl nebo se na vzniku *C. opulifolium* podílel v roli matky jiný druh (pokud je vůbec *C. opulifolium* hybridního původu), jenž nebyl analyzován v této práci.
- *C. pedunculare* a *C. missouriense* se na základě shody v haplotypech s *C. album* a příslušnosti ke stejné linii ve fylogenetickém stromě jeví jako stejný druh. Může se tak jednat pouze o variety druhu *C. album*, nikoli o samostatné druhy. Relevantnost výsledku by potvrdila analýza většího množství zástupců klasifikovaných jako *C. pedunculare* a *C. missouriense*.

Na základě výsledků analýz je možné částečně potvrdit hypotézu, že vyšší polyploidi (4x – *C. striatiforme*, *C. strictum*; 6x – *C. album*) vznikají ve střední a jihovýchodní Evropě a Rusku stejnou cestou, ovšem existuje u nich variabilita v cpDNA. K hybridizaci mezi vyššími polyploidy docházelo současně a nezávisle v různých geografických oblastech.

Zpracované sekvence se stanou součástí dalších výzkumů rodu *Chenopodium* v Botanickém ústavu AVČR v Průhonicích.

8. PŘEHLED LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ

ADAMS K. L., 2007: Evolution of duplicate gene expression in polyploidy and hybrid plants. *Journal of Heredity* 98: 136 – 141.

AELLEN P., 1960: *Chenopodium* L. In: HEGI G. [ed.]: Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Carl Hanser-Verl, München.

AELLEN P. et JUST T., 1943: Key and synopsis of the American species of the genus *Chenopodium* L. *The American Midland Naturalist* 30: 47 – 76.

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. et WALTER P., 2002: The genetic systems of mitochondria and plastids. In: ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. et WALTER P. [eds]: Molecular Biology of the Cell. *Garland science, New York*, 767 – 831.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003: An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.

APER J., DE CAUWER B., DE ROO S., LOURENCO M., FIEVEZ V., BULCKE R. et REHEUL D., 2013: Seed germination and viability of herbicide resistant and susceptible *Chenopodium album* populations after ensiling, digestion by cattle and manure storage. *European Weed Research Society* 54: 169 – 177.

ARNOLD M. L., 1997: Natural Hybridization and Evolution. *Oxford University press, New York*, 232 s.

ARNOLD M. L. et HODGES S. A., 1995: Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology & Evolution* 10: 67 – 71.

BACHMAN K., 1994: Molecular markers in plant ecology. *New Phytologist* 126: 403 – 418.

BAER CH. F., MIYAMOTO M. M. et DENVER D. R., 2007: Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. *Nature Reviews Genetics*. 8. 619-631.

BAFEEL S. O., ARIF I. A., AL-HOMAIDAN A. A., KHAN H. A., AHAMED A. et BAKIR M. A., 2012: Assessment of DNA Barcoding for the Identification of *Chenopodium murale* L (*Chenopodiaceae*). *International Journal of Biology* 4: 66 – 74.

- BENNETT M. D., 2004:** Perspectives on polyploidy in plants – ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 411 – 423.
- BENNETT M. D. et SMITH J. B., 1991:** Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 334: 309 – 345.
- BHARTHAN G., LAMBERT G. et GALBRAITH D. W., 1994:** Nuclear DNA content of monocotyledons and related taxa. *American Journal of Botany* 81: 381 – 386.
- BRIGGS D. et WALTERS S. M., 2001:** Proměnlivost a evoluce rostlin. *Univerzita Palackého, Olomouc*, 531 s.
- BROWN T. A., 2006:** Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. *Blackwell Science Ltd, Oxford*, 386 s.
- CLEMENTS S. E. et MOSYAKIN S. L., 2003:** *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.
- CLEMENT M., POSADA D. et CRANDALL K. A., 2000:** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 10: 1657 – 1660.
- COLE M. J., 1957:** Variation and intraspecific relationships of *Chenopodium album* L. in Britain. *University of Southampton, Watsonia* 1961, 5: 47 – 58.
- CORRENS C., 1909:** Vererbungsversuche mit blass (gelb) grünen und buntblättrigen Sippen bei *Mirabilis jalapa*, *Urtica pilulifera* und *Lunularia annua*. *Zeitschrift für Vererbungslehre I*: 291 – 329.
- CORRIVEAU J. L. et COLEMAN A. W., 1988:** Rapid screening methods to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results of over 200 angiosperm species. *American Journal of Botany* 75: 1443 – 1458.
- CRAWFORD D. J., 1990:** Plant molecular systematics. *New York, Willey*.
- DARWIN C., 1859:** On the origin of species by means of natural selection. *London, Murray*.
- DOLEŽEL J., BARTOŠ J. et GREILHUBER J., 2003:** Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51A: 127 – 128.

DOSTÁLEK J. ml., HEJNÝ S., HUSÁK Š., SCHWARZOVÁ T. et DVOŘÁK F., 2003: *Chenopodium*. In: HEJNÝ S. et SLAVÍK B. [eds.]: Květena ČR, díl 2. *Academia, Praha*, 540 s.

DOWNIE S. R. et PALMER J. D., 1994: A Chloroplast DNA Phylogeny of the *Caryophyllales* Based on Structural and Inverted Repeat Restriction Site Variation. *Systematic Botany* 19: 236 – 252.

DVOŘÁK F., 1990: Study of *Chenopodium interjection* J. Murr, *Ch. mixtifolium* J. Murr and *Ch. laciniatum* J. Murr. *Feddes Repertorium* 101: 347 – 371.

DVOŘÁK F., 1992a: Study of *Chenopodium subopulifolium* J. Murr emend. D. *Feddes Repert.* 103: 49 – 69.

DVOŘÁK F., 1992b: Study of *Chenopodium purpurascens* B. de Juss. ex Jacq. and on some related taxa. *Feddes Repertorium* 103: 153 – 173.

DVOŘÁK F., 1993: Relationships and diagnostic characters of *Chenopodium striatiforme* J. Murr, *C. strictum* (Krašán) J. Murr and *C. strictum* Roth. *Feddes Repertorium* 104: 439 – 449.

DVOŘÁK F., 1994: Study of some species subsumed under *Chenopodium Probstii* A. and on *C. purpurascens* B. de Juss. ex Jacq. *Feddes Repertorium* 105: 113 – 139.

EVENARI M., 1989: The history of research on white-green variegated plants. *Botanical review* 55: 106 – 139.

FLEGR J., 2009: Evoluční biologie. *Academia, Praha*, 569 s.

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: 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: 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.

- GIBBY M., 1981:** Polyploidy and its evolutionary significance. In: Forey P. L. [ed.]: The evolving biosphere. *British Museum of Natural History & Cambridge University Press, Cambridge*, 311 s.
- GRANT V., 1981:** Plant speciation. 2. vydání, *Columbia University Press, New York*.
- GREILHUBER J., DOLEŽEL J., LYSÁK M. A. et BENNETT M. D., 2005:** The origin, evolution and proposed stabilization of the terms „genom size“ and „C-value“ to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany* 95: 255 – 260.
- GREILHUBER J., BORSCH T., MÜLLER K., WORBERG A., POREMBSKI S. et BARTHLOTT W., 2006:** Smallest angiosperm genomes found in *Lentibulariaceae*, with chromosomes of bacterial size. *Plant Biology* 8(6): 770 – 777.
- HALL T. A., 1999:** BioEdit, a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95 – 98.
- HARBORNE J. B., 1973:** Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis. *Chapman and Hall, London*.
- HARRIS S. A. et INGRAM R., 1991:** Chloroplast DNA and biosystematics: the effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon* 40: 393 – 412.
- HAWKINS J. S., GROVER C. E. et WENDEL J. F., 2008:** Repeated big bangs and the expanding universe: Directionality in plant genome size evolution. *Plant Science* 174: 557 – 562.
- HENNIG W., 1982:** Phylogenetische Systematik. *Paul Parey, Berlin*.
- HEPTINSTALL J., 2000:** Spectrophotometric analysis of nucleic acids. In: RAPLEY R. [ed.]: The Nucleic Acid Protocols Handbook. *Humana, Totowa*, 57 – 60.
- CHLOUPEK O., 2008:** Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. *Academia, Praha*, 312 s.
- CHU G., MOSYAKIN S. L. et CLEMANTS S. E., 2003:** *Chenopodiaceae*. In: Wu Z. Y., Raven P. [eds.]: *Flora of China*, vol. 5, *Science Press, Beijing*, 505 s.
- CHYTRÝ M., KUČERA T., KOČÍ M., GRULICH V. et LUSTYK P. [eds], 2010:** Katalog biotopů České republiky. Ed. 2. *Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha*, 445 s.

JUKES T. H. et CANTOR C. R., 1969: Evolution of protein molecules. In: Munro H. N. [ed.]: Mammalian Protein Metabolism. *Academic Press, New York*, 21 – 132.

JÜTTERSONKE B. et ARLT K., 1989: Experimentelle Untersuchungen über die infraspezifische Struktur von *Chenopodium album* L. sowie Untersuchungen an *Chenopodium suecicum* J. Murr. *Feddes Repertorium* 100: 1 – 63.

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: 959 – 986.

KIHARA H. et ONO T., 1926: Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der *Rumex* – Arten. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 4: 475 – 481.

KIRK J. T. O. et TILNEY-BASSETT R. A. E., 1978: The plastids: their chemistry, structure, growth and inheritance. 2. vydání, Elsevier, Amsterdam.

KOLANO B., SIWIŃSKA D. et MALUSZYŃSKA J., 2008: Comparative cytogenetic analysis of diploid and hexaploid *Chenopodium album* agg. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 77: 293 – 298.

KOLÁŘ F. et VÍT P., 2008: Endemické rostliny českých hadců 3. Rožec kuřičkolistý a kuřička Smejkalova. *Živa* 56/3: 111 – 113.

KOLÁŘ F., MATĚJŮ J., LUČANOVÁ M., CHLUMSKÁ Z., ČERNÁ K., PRACH J., BALÁŽ V. et FALTEISEK L., 2012: Ochrana přírody z pohledu biologa. Proč a jak chránit českou přírodu. *Dokořán, Praha*, 213 s.

KOŇÁKOVÁ Z., 2013: Variabilita ve velikosti genomu vybraných druhů rodu *Chenopodium*. *Nepublikováno, Praha*.

KRAHULCOVÁ A., 1998: Karyologie cévnatých rostlin při aplikaci metod klasického barvení chromozómů. *PřF UK v Praze*.

KRAK K., 2011: Využití sekvencí DNA při studiu evoluce rostlin. In: MANDÁK B., KRAHULEC F., HROUDOVÁ [eds], 2011: Evoluční aspekty biologie rostlin. *Materiály 25, Zprávy České botanické společnosti, 46/2011*, 140 s.

KOCIÁN P., 2003: Květena ČR: *Verbascum*, online: <http://www.kvetenacr.cz/>, cit. 16. 11. 2014.

KÜHN U., 1993: *Chenopodiaceae*. In: KUBITZKI K. [ed.]: The families and genera of vascular plants. *Springer, Hamburg*, 253 – 281.

LEITCH I. J. et BENNETT M. D., 1997: Polyploidy in angiosperms. *Trends in plant science* 2: 470 – 476.

LEITCH I. J. et BENNETT M. D., 2004: Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of Linnean Society* 82: 651 – 663.

LEVIN D. A., 1978: The origin of isolating mechanism in flowering plants. *Evolutionary Biology* 11: 185 – 317.

LEVIN D. A., 1979: The nature of plant species. *Science* 204: 381 – 384.

LEVIN D. A., 2002: The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. *Oxford University Press, Oxford*, 240 s.

LINDMAN C. A. M., 1901: Bilder ur Nordens Flora. *Stockholm*, online: <http://runeberg.org/nordflor/>, cit: 20. 2. 2014.

LYSÁK M. A., DOLEŽELOVÁ M., HORRY J. P., SWENNEN R. et DOLEŽEL J., 1999: Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1344 – 1350.

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: 530 – 540.

MAXAM A. et GILBERT W., 1977: A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 74: 560 – 564.

MAYR E., 1992: A local flora and biological species concept. *American Journal of Botany* 79: 222 – 238.

MAYR E., 2009: Co je evoluce. *Academia, Praha*.

MORTON B. R., 1997: The influence of neighboring base composition on substitutions in plant chloroplast coding sequences. *Molecular Biology and Evolution* 14: 189 – 194.

- MORTON B. R. et CLEGG M. T., 1995:** Neighboring base composition is strongly correlated with base substitution bias in a region of the chloroplast genome. *Journal of Molecular Evolution* 41: 597 – 603.
- MÜLLER K., 2005:** SeqState – primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics* 4: 65 – 69.
- MÜLLER K. F. 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: 66 – 102.
- OLMSTEAD R. G. et PALMER J. D., 1994:** Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany* 81: 1205 – 1224.
- OPITZ VON BOBERFELD W., 1993:** Grünlandlehre. *Ulmer, Stuttgart*, 336 s.
- PARTAP T. et KAPOOR P., 1985:** The Himalayan grain chenopods. II. Copmarative morphology. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 14: 201 – 220.
- PRIMACK R. B., KINDLMAN P. et JERSÁKOVÁ J., 2011:** Úvod do biologie ochrany přírody. *Portál, Praha*, 472 s.
- QIU Y.-L., LEE J., BERNASCONI-QUADRONI F., SOLTIS D. E., SOLTIS P. S., ZANIS M., ZIMMER E. A., CHEN Z., SAVOLAINEN V. et CHASE M. W., 1999:** The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402: 404 – 407.
- RAHIMINEJAD M. R. et GORNALL R. J., 2004:** Flavonoid evidence for allopolyploidy in the *Chenopodium album* aggregate (*Amaranthaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 246: 77 – 87.
- RAMSEY J. et SCHEMSKE D. W., 1998:** Pathways, mechanisms and rate of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 467 – 501.
- RIEGER R., MICHAELIS A. et GREEN M. M., 1976:** Glossary of genetics and cytogenetics. *Springer Verlag, New York & Heidelberg, Berlin*, 647 s.
- RIESEBERG L. H., 1991:** Homoploid reticulate evolution in *Helianthus* (*Asteraceae*) – evidence from ribosomal genes. *American Journal of Botany* 78: 1218 – 1237.

RIESEBERG L. H., 1997: Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 359 – 389.

SAMBROOK J., FRITSCH E. F. et MANIATIS T., 1989: Molecular Cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1659 s.*

SANGER F. et COULSON A. R., 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 74 (12): 5463 – 5467.

SHAW J., LICKEY E. B., BECK J. T., FARMER S. B., LIU W., MILLER J., SIPURIN K. C., WINDER CH. T., SCHILLING E. E. et SMALL R. L., 2005: The Tortoise and the Hare II: Relative Utility of 21 Noncoding Chloroplast DNA Sequences for Phylogenetic Analysis. *American Journal of Botany* 92 (1): 142 – 166.

SHAW J., LICKEY E. B., SCHILLING E. E. et SMALL R. L., 2007: Comparison of Whole Chloroplast Genome Sequences to Choose Noncoding Regions for Phylogenetic Studies in Angiosperms: The Tortoise and the Hare III. *American Journal of Botany* 94 (3): 275 – 288.

SCHAAL B. A., HAYWORTH D. A., OLSEN K. M., REUSCHER J. T. et SMITH W. A., 1998: Phylogeographic studies in plant prospects. *Molecular Ecology* 7: 465 – 474.

SCHAAL B. A., O'KANE S. L. et ROGSTAD S. H., 1991: DNA variation in plant populations. *Trends in Ecology & Evolution* 6: 329 – 333.

SIMMONS M. P. et OCHOTERENA H., 2000: Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* 49: 369 – 381.

SNUSTAD D. P. et SIMMONS M. J., 2009: Genetika. *Masarykova univerzita, Brno, 894 s.*

SOLTIS D. E. et SOLTIS P. S., 1993: Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12: 243 – 273.

SOLTIS D. E., SOLTIS P. S. et ZANIS M. J., 2002: Phylogeny of seed plants based on evidence from eight genes. *American Journal of Botany* 89: 1670 – 1681.

- SOLYMOSI P. et LEHOCZKI E., 1989:** Characterization of triple (atrazine-pyrazon-pyridate) resistant biotype of Common Lambsquarters (*Chenopodium album* L.). *Journal of Plant Physiology* 134: 685 – 690.
- STRASBURGER E., 1910:** Chromosomenzahl. *Flora* 100: 398 – 446.
- SUDA J., 2004:** An employment of flow cytometry into plant biosystematics. *PhD. Thesis. Karlova Univerzita, Praha.*
- SUDA J., 2009:** Darwinova „odporná záhada“ po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí krytosemenných rostlin? *Živa* 5: 204 – 208.
- SWIFT H., 1950:** The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 36: 643 – 654.
- TABERLET P., GIELLY L., PATOU G. et BOUVET J., 1991:** Universal primers for amplification of free non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105 – 1109.
- TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M. et KUMAR S., 2011:** MEGA5, Version 5.2.2.: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731 – 2739.
- TANAKA R. et TANAKA A., 1980:** Karyomorphological studies of halophytic plants. I. Same taxa of *Chenopodium*. *Cytologia* 45: 257 – 269.
- TECHNELYSIUM, 1998:** Software for DNA sequencing, Chromas Lite 2.1, *online: <http://technelysium.com.au/>, cit. 26. 11. 2013.*
- THIEL H. et VARRELMAN M., 2014:** Identification of a new PSII target site psa mutation leading to D1 amino acid Leu 218 Val exchange in the *Chenopodium album* D1 protein and comparison to cross-resistance profiles of known modifications at positions 251 and 264. *Pest Management Science* 70: 278 – 285.
- THOMPSON J. D. et LUMARET R., 1992:** The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends in Ecology & Evolution* 7: 302 – 306.
- VALENTINE D. H., 1956:** Studies in British Primulas. V. The inheritance of seed incompatibility. *New Phytologist* 55: 305 – 318.

VILLESEN P., 2007: FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes* 7 (6), 965 – 968, online: http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/alignment_joiner.php, cit: 26. 11. 2013.

WATSON L. et DALLWITZ M.J. 1992: The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. *Version: 19th October 2013.* <http://delta-intkey.com>.

WEISS-SCHNEEWEISS H., GREILHUBER J. et SCHNEEWEISS G. M., 2006: Genome size evolution in holoparasitic *Orobanche* (*Orobanchaceae*) and related genera. *American Journal of Botany* 93: 148 – 156.

WENDEL J. F., 2000: Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42: 225 – 249.

WINGE Ø., 1917: The Chromosomes, Their Numbers and General Importance. *Carlsberg laboratoriet*, 275 s.

9. PŘÍLOHY

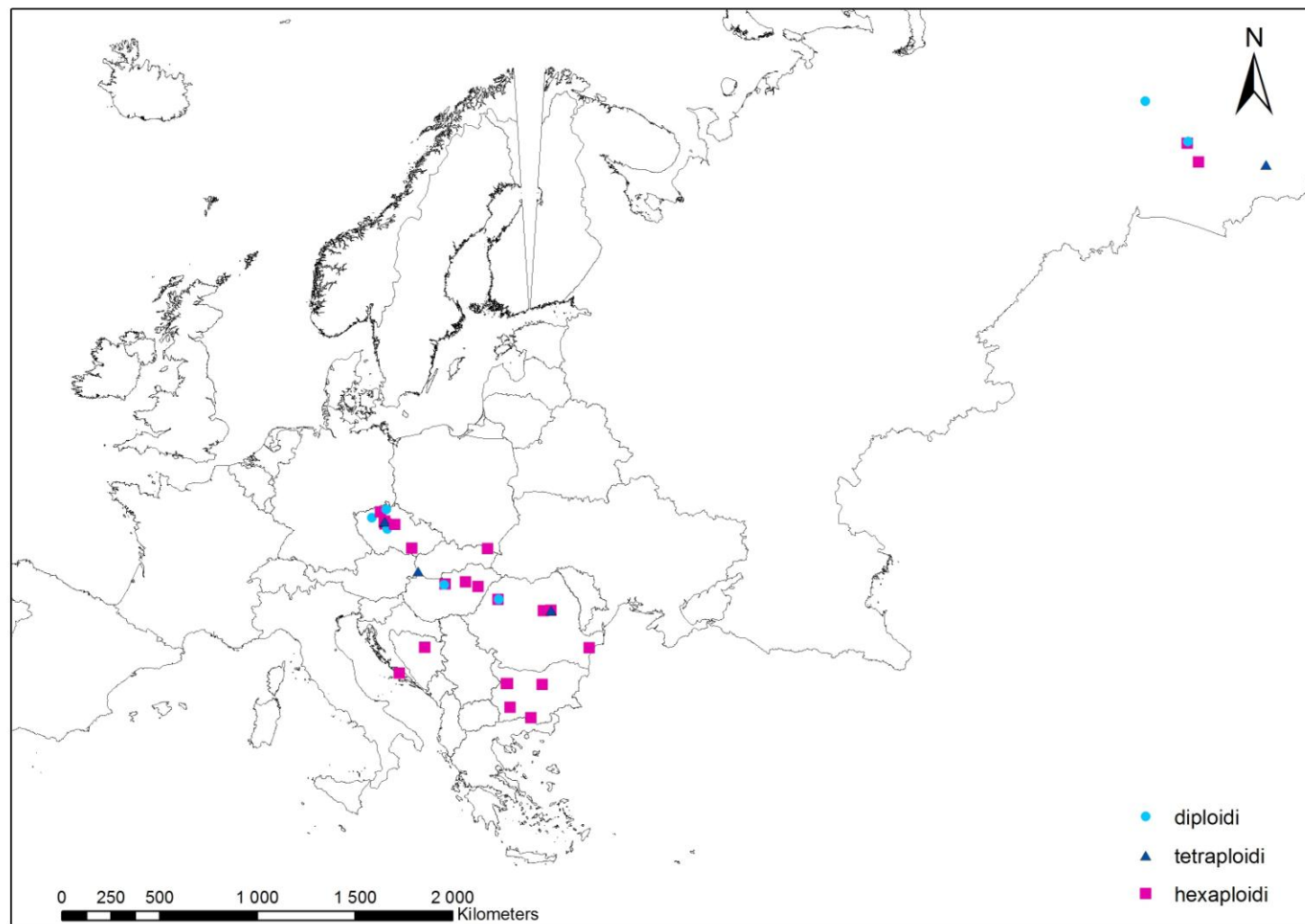
Příloha č. 1: Souhrnná tabulka s názvy jedinců, druhovou příslušností, nalezištěm, koordinátami, ploidií a haplotypovou příslušností haploskupina A je vyznačena modře a haploskupina B fialově.

Druh	Země	Lokalita stanoviště	Koordináty		Ploidie	Haplotyp
<i>C. album</i> 5	Česká republika	Praha-Holešovice, mezi mostem Barikádníků a železničním mostem, na L břehu Vltavy, násep železniční trati	50°06'45,34" N	14°26'47,74" E	6	H1
<i>C. album</i> 19	Česká republika	Vestec (Praha-západ), na S okraji obce, čerstvě nahrnutá zemina	49°58'55,97" N	14°29'52,87" E	6	H10
<i>C. suecicum</i> 27	Česká republika	Praha-Holešovice, mezi mostem Barikádníků a železničním mostem, na L břehu Vltavy, násep železniční trati	50°06'45,34" N	14°26'47,74" E	2	
<i>C. striatiforme</i> 32	Česká republika	Praha-Troja, v ulici Na dlážděnce, podél silnice	50°06'58,67" N	14°25'59" E	4	H10
<i>C. album</i> 34	Česká republika	Praha-Troja, v ulici Na dlážděnce, podél silnice	50°06'58,67" N	14°25'59" E	6	H1
<i>C. album</i> 54	Česká republika	Průhonice (Praha-západ), navážky zeminy u experimentální zahrady Botanického ústavu AV ČR, čerstvá navážka zeminy	49°59'30,67" N	14°34'1,16" E	6	H1
<i>C. strictum</i> 65	Česká republika	Praha-Holešovice, cíp ruderalní plochy za nádražím Holešovice směrem k Vltavě, nasypaná zemina			4	H10
<i>C. missouriense</i> 100	Česká republika	Lovosice (Litoměřice), dvůr obilního sila, v areálu překladiště na břehu labského kanálu, čerstvá navážka zeminy			6	H1
<i>C. pedunculare</i> 103	Česká republika	Lovosice (Litoměřice), na břehu labského kanálu, mezery říční navigace			6	H1
<i>C. ficifolium</i> 107	Česká republika	Ústí nad Labem, starý přístav (Agroport), v kolejišti			2	H15
<i>C. strictum</i> 124	Česká republika	Starý Kolín (Kolín), areál zemědělského družstva, volná ruderalní plocha			4	H7
<i>C. missouriense</i> 127	Česká republika	Starý Kolín (Kolín), areál zemědělského družstva, volná ruderalní plocha			6	H1
<i>C. album</i> 132	Česká republika	Starý Kolín (Kolín), pole u nádraží, pole			6	H1
<i>C. album</i> 140	Slovensko	Medzilaborce, volná plocha u prodejny Tesco, volná ruderalní plocha	49°16'08,70" N	21°54'14,44" E	6	H1
<i>C. strictum</i> 143	Maďarsko	Rajka, okraj parkoviště	48°00'36,72" N	17°10'35,76" E	4	H8
<i>C. pedunculare</i> 145	Maďarsko	Budapešť, ulice Kacsóh Pongrác, odpočívadlo u silnice M3	47°32'01,02" N	19°06'10,32" E	6	H3
<i>C. strictum</i> 146	Maďarsko	Budapešť, ulice Kacsóh Pongrác, odpočívadlo u silnice M3	47°32'01,02" N	19°06'10,32" E	4	H10
<i>C. album</i> 147	Maďarsko	Budapešť, ulice Kacsóh Pongrác, odpočívadlo u silnice M3	47°32'01,02" N	19°06'10,32" E	6	
<i>C. urbicum</i> 148	Maďarsko	Besenyőtelek, při silnici č. 33 směrem na Poroszló, pusta	47°41'12,16" N	20°28'05,45" E	6	
<i>C. album</i> 149	Maďarsko	Nagyhegyes, ulice Ady Endre, podél silnice	47°31'04,62" N	21°21'27,48" E	6	H1
<i>C. album</i> 151	Rumunsko	Bucea, cca 2.6 km VSV obce, kamenitý náplav řeky Sebes-Körös, kamenitý náplav řeky	46°57'06,62" N	22°43'28,20" E	6	H2
<i>C. suecicum</i> 153	Rumunsko	Bucea, cca 2.6 km VSV obce, kamenitý náplav řeky Sebes-Körös, kamenitý náplav řeky	46°57'06,62" N	22°46'28,20" E	2	H14

Druh	Země	Lokalita stanoviště	Koordináty		Ploidie	Haplotyp
<i>C. album</i> 155	Rumunsko	Siculeni, při silnici E578, na SV okraji obce, bramborové pole	46°26'30,30" N	25°45'42,18" E	6	H1
<i>C. suecicum</i> 156	Rumunsko	Preluci, kamenité náplavy řeky Trotus, kamenitý náplav řeky	46°27'39,48" N	26°16'04,20" E	2	H14
<i>C. album</i> 157	Rumunsko	Preluci, kamenité náplavy řeky Trotus, kamenitý náplav řeky	46°27'39,48" N	26°16'04,20" E	6	H1
<i>C. strictum</i> 158	Rumunsko	Preluci, kamenité náplavy řeky Trotus, kamenitý náplav řeky	46°27'39,48" N	26°16'04,20" E	4	H7
<i>C. album</i> 160	Rumunsko	Mihai Viteazu, cca 3.2 km S města při silnici E87 na město Baia, okraj kukuřičného pole	44°40'24,71" N	28°41'04,27" E	6	H1
<i>C. album</i> 163	Bulharsko	Veliko Tarnovo, podél silnice E85, na J okraji města, podél silnice	43°03'38,10" N	25°37'57,30" E	6	H1
<i>C. opulifolium</i> 164	Bulharsko	Gara Lakatnik, na V okraji obce, podél silnice č. 16, podél silnice	43°05'14,34" N	23°23'46,08" E	6	H11
<i>C. album</i> 165	Bulharsko	Opletnya, cca 2 km JV obce, silnice podél řeky Iskar, na okraji cesty	43°05'23,94" N	23°27'57,60" E	6	H1
<i>C. strictum</i> 166	Bulharsko	Yakoruda, cca 2.7 km JZ obce, podél silnice č. 84, podél silnice	42°00'24,60" N	23°38'24,30" E	4	H7
<i>C. album</i> 167	Bulharsko	Yakoruda, cca 2.7 km JZ obce, podél silnice č. 84, podél silnice	42°00'24,60" N	23°38'24,30" E	6	H1
<i>C. album</i> 168	Bulharsko	Srednogortsi, cca 1 km SV obce, podél silnice	41°32'03,96" N	24°55'05,82" E	6	H1
<i>C. album</i> 169A	Bosna a Hercegovina	Maglaj, na S okraji obce, hnojiště	44°33'18,36" N	18°06'22,62" E	6	H1
<i>C. album</i> 169B	Bosna a Hercegovina	Maglaj, na S okraji obce, hnojiště	44°33'18,36" N	18°06'22,62" E	6	H4
<i>C. strictum</i> 182	Rusko	Altai Republic, Altaiské hory, distr. Shebalino, Kalmak: jihovýchodní okraj obce, 401 m n.m., mezi silnicí a řekou	51°37'11,00" N	85°39'13,00" E	4	H9
<i>C. album</i> 184	Česká republika	Hrušovany u Brna	49°02'35,68" N	16°34'26,31" E	6	H7
<i>C. opulifolium</i> 192	Česká republika	Praha, ulice Slovenská	50°04'21,86" N	14°26'57,12" E	6	H12
<i>C. striatiforme</i> 193	Česká republika	Praha, Karlovo náměstí	50°04'26,21" N	14°25'08,82" E	4	H10
<i>C. ficifolium</i> 200	Česká republika	Benešov, vodárna	49°47'02,81" N	14°42'01,89" E	2	H15
<i>C. ficifolium</i> 202	Česká republika	Běsno, chmelnice	50°11'01,76" N	13°30'23,58" E	2	H15
<i>C. suecicum</i> 205	Česká republika	Benešov, vodárna	49°47'02,81" N	14°42'01,89" E	2	
<i>C. album</i> 211	Rusko	Novosibirsk, Obskyi more	54°50'01,03" N	83°04'13,03" E	6	H5
<i>C. album</i> 212	Rusko	Suzunskij les	53°55'04,08" N	82°34'32,05" E	6	H6
<i>C. suecicum</i> 213	Rusko	Novosibirsk, Akademgorodok	54°51'16,09" N	83°11'36,04" E	2	H14
<i>C. suecicum</i> 214	Rusko	Novosibirsk, u jezera	57°27'18,09" N	83°21'21,07" E	2	H14
<i>C. opulifolium</i> 215	Chorvatsko	ostrov Brač, Bol, volná ruderalní plocha	43°15'48,26" N	16°39'03,61" E	6	H13
<i>C. vulvaria</i> 226	Maďarsko	Budapešť, Hunyadi János utca, podél zdi	47°29'57,01" N	19°02'12,19" E	2	

* pro neznámé koordináty byly do mapy zaneseny koordináty přibližně odpovídající místu nálezu

Rozšíření zástupců rodu *Chenopodium* v Evropě

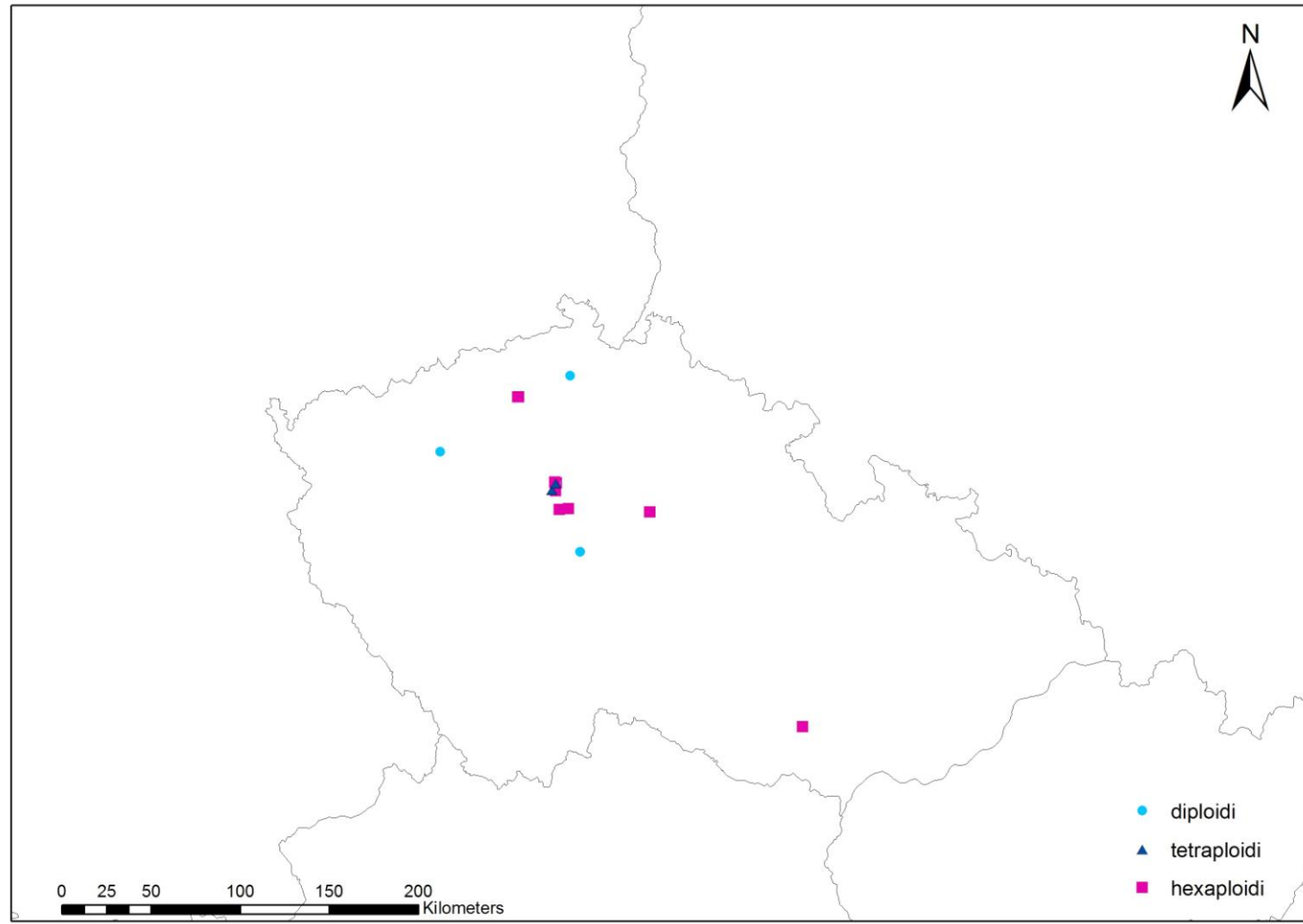


Příloha č. 2: Mapa rozšíření zástupců rodu *Chenopodium* ve střední a jihovýchodní Evropě a Rusku. Modré kolečko představuje diploidy, modrý trojúhelník označuje tetraploidy a růžový čtverec hexaploidy.

Podkladová mapa dostupná <http://www.diva-gis.org/Data> (13.4.2014)

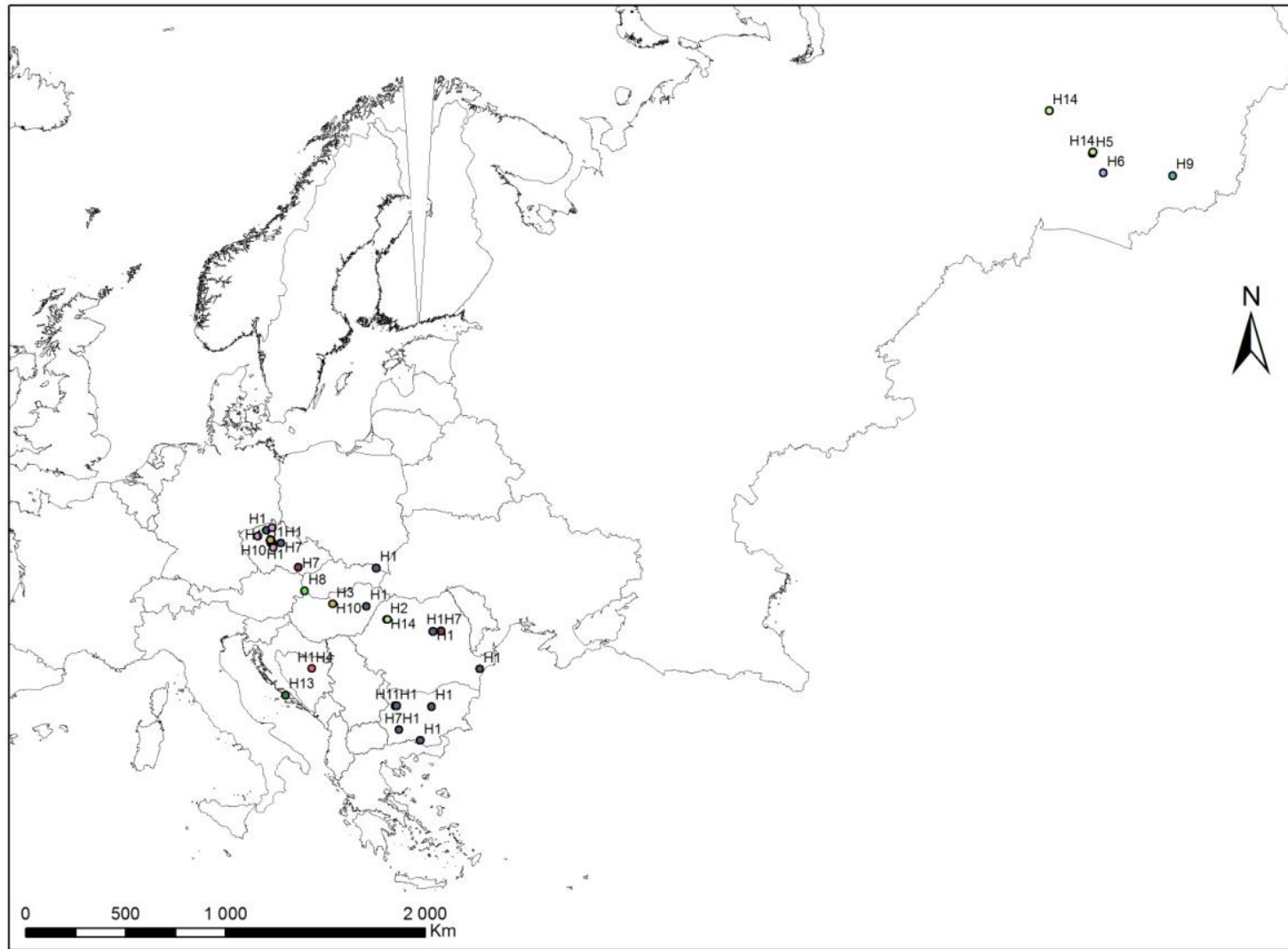
Author: Bc. Tereza Bazgerová

Rozšíření zástupců rodu *Chenopodium* v ČR



Příloha č. 3: Mapa rozšíření zástupců rodu *Chenopodium* v ČR. Modré kolečko představuje diploidy, modrý trojúhelník označuje tetraploidy a růžový čtverec hexaploidy.

Zastoupení haplotypů rodu *Chenopodium* v Evropě

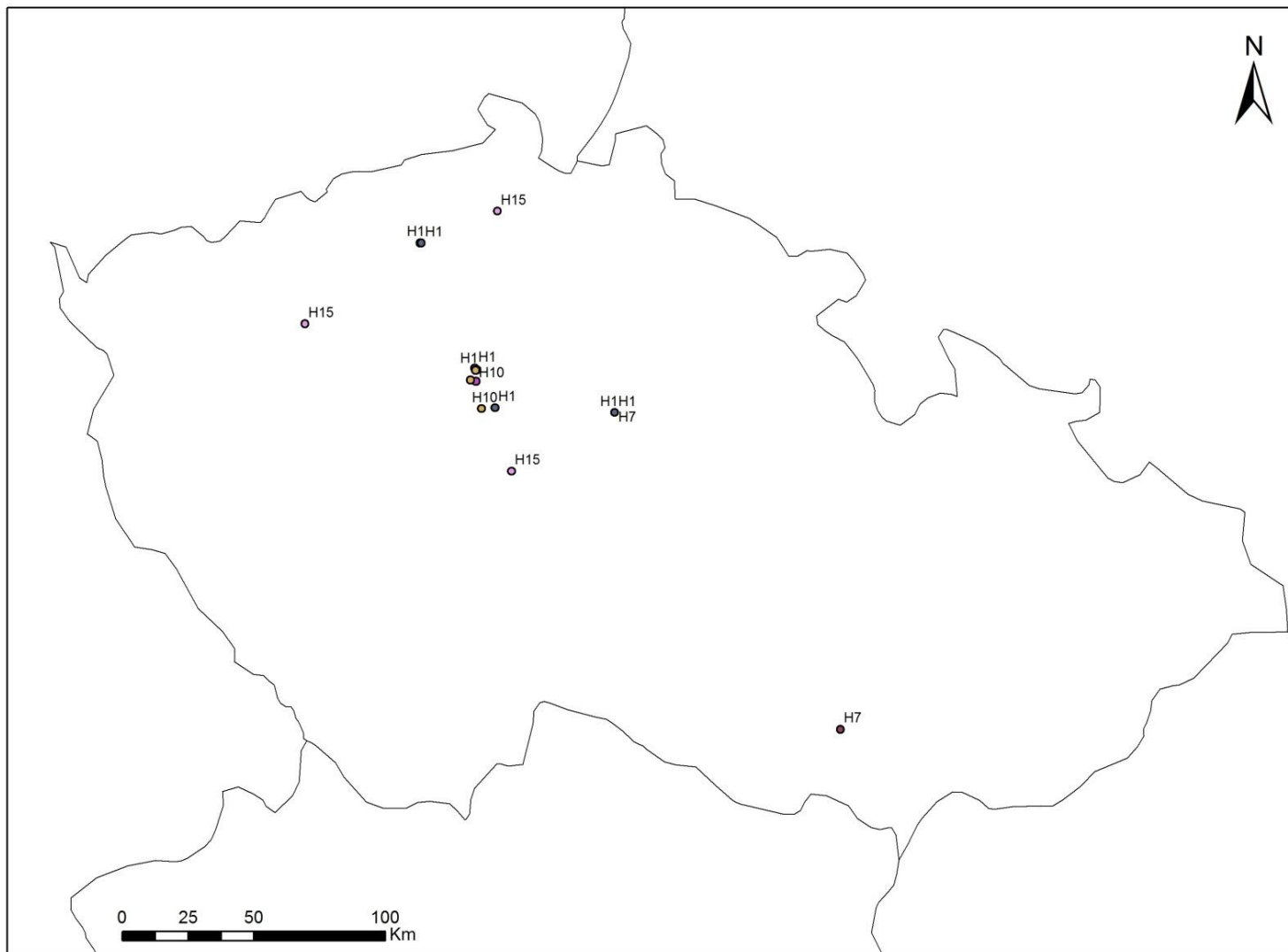


Podkladová mapa dostupná <http://www.diva-gis.org/Data> (13.4.2014)

Author: Bc. Tereza Bazgerová

Příloha č. 4: Mapa zastoupení haplotypů rodu *Chenopodium* ve střední a jihovýchodní Evropě a Rusku založená na sekvenování úseků *rpl32-trnL*, *psbJ-petA* a *trnD-trnT* cpDNA. Jednotlivé haplotypy H1 – 15 jsou barevně odlišeny a opatřeny popisem.

Zastoupení haplotypů rodu *Chenopodium* v ČR.



Příloha č. 5: Mapa zastoupení haplotypů rodu *Chenopodium* v ČR založená na sekvenování úseků *rpl32-trnL*, *psbJ-petA* a *trnD-trnT* cpDNA. Jednotlivé haplotypy H1 – 15 jsou barevně odlišeny a opatřeny popiskem.

Příloha č. 6: Tabulka se vzorky (1 – 48), naměřenými hodnotami koncentrace DNA (ng/μl) a poměry absorbancí (260/280 a 260/230).

	vzorek	ng/μl	260/280	260/230		vzorek	ng/μl	260/280	260/230
1	5	116	1,75	1,08	25	157	177	1,79	1,74
2	19	66	1,40	0,38	26	158	242	1,78	1,69
3	27	42	2,01	0,38	27	160	239	1,83	1,68
4	32	222	3,04	1,00	28	163	288	1,80	1,73
5	34	70	1,77	1,03	29	164	83	1,81	1,33
6	54	214	1,84	1,64	30	165	111	2,07	1,00
7	65	75	1,77	2,77	31	166	77	1,79	1,31
8	100	87	2,06	1,48	32	167	232	1,84	1,77
9	103	94	1,85	0,87	33	168	189	1,72	1,70
10	107	66	1,65	1,40	34	169 A	95	1,73	1,11
11	124	358	1,84	1,87	35	169 B	119	1,71	1,13
12	127	183	1,74	1,81	36	182	50	1,59	1,80
13	132	94	1,83	1,13	37	184	60	1,97	1,32
14	140	158	1,74	1,68	38	192	126	1,76	1,34
15	143	61	1,91	1,02	39	193	447	1,84	1,85
16	145	160	1,77	1,31	40	200	301	1,85	1,86
17	146	135	1,88	1,50	41	202	146	1,86	0,77
18	147	107	1,81	1,72	42	205	400	1,86	2,18
19	148	101	1,75	1,57	43	211	124	1,82	1,27
20	149	190	1,76	1,46	44	212	57	1,65	1,70
21	151	193	1,75	1,80	45	213	66	1,61	1,16
22	153	99	1,73	1,28	46	214	116	1,70	1,60
23	155	159	1,71	1,46	47	215	50	2,55	0,81
24	156	180	1,81	1,31	48	226	50	1,88	2,28

Příloha č. 7: Tabulky pairwise differences pro chloroplastové markery *rpl32-trnL*, *trnQ-5'rps16*, *3'trnV-ndhC*, *ndhF-rpl32*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA*, *3'rps16-5'trnK*, *atpI-atpH*, *petL-psbE* a *trnD-trnT*.

No.	<i>rpl32-trnL</i>	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>C. strictum 118</i>							
2	<i>C. striatiforme 40</i>	0,002						
3	<i>C. striatiforme 3-3</i>	0,002	0,000					
4	<i>C. album 216</i>	0,002	0,000	0,000				
5	<i>C. opulifolium 111</i>	0,002	0,000	0,000	0,000			
6	<i>C. ficifolium F3-5</i>	0,020	0,018	0,018	0,018	0,018		
7	<i>C. suecicum S2-2</i>	0,017	0,014	0,014	0,014	0,014	0,005	

No.	<i>trnQ-5'rps16</i>	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>C. striatiforme 3-3</i>							
2	<i>C. striatiforme 40</i>	0,000						
3	<i>C. ficifolium F3-5</i>	0,009	0,009					
4	<i>C. suecicum S2-2</i>	0,010	0,010	0,001				
5	<i>C. opulifolium 111</i>	0,000	0,000	0,009	0,010			
6	<i>C. strictum 118</i>	0,000	0,000	0,009	0,010	0,000		
7	<i>C. album 216</i>	0,000	0,000	0,009	0,010	0,000	0,000	

No.	<i>ndhF-rpl32</i>	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>C. striatiforme 3-3</i>							
2	<i>C. striatiforme 40</i>	0,000						
3	<i>C. opulifolium 111</i>	0,000	0,000					
4	<i>C. strictum 118</i>	0,002	0,002	0,002				
5	<i>C. album 216</i>	0,001	0,001	0,001	0,003			
6	<i>C. ficifolium F3-5</i>	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012		
7	<i>C. suecicum S2-2</i>	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,004	

No.	<i>psbD-trnT</i>	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>C. opulifolium 111</i>							
2	<i>C. strictum 118</i>	0,000						
3	<i>C. album 216</i>	0,000	0,000					
4	<i>C. striatiforme 3-3</i>	0,001	0,001	0,001				
5	<i>C. striatiforme 40</i>	0,001	0,001	0,001	0,000			
6	<i>C. ficifolium F3-5</i>	0,009	0,009	0,009	0,008	0,008		
7	<i>C. suecicum S2-2</i>	0,008	0,008	0,008	0,007	0,007	0,003	

No.	<i>psbJ-petA</i>	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>C. strictum</i> 118							
2	<i>C. album</i> 216	0,001						
3	<i>C. suecicum</i> S2-2	0,010	0,012					
4	<i>C. striatiforme</i> 40	0,000	0,001	0,010				
5	<i>C. opulifolium</i> 111	0,000	0,001	0,010	0,000			
6	<i>C. striatiforme</i> 3-3	0,000	0,001	0,010	0,000	0,000		
7	<i>C. ficifolium</i> F3-5	0,012	0,013	0,001	0,012	0,012	0,012	

No.	<i>3'rps16-5'trnK</i>	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>C. striatiforme</i> 3-3							
2	<i>C. striatiforme</i> 40	0,000						
3	<i>C. opulifolium</i> 111	0,000	0,000					
4	<i>C. ficifolium</i> F3-5	0,008	0,008	0,008				
5	<i>C. strictum</i> 118	0,001	0,001	0,001	0,009			
6	<i>C. album</i> 216	0,000	0,000	0,000	0,008	0,001		
7	<i>C. suecicum</i> S2-2	0,008	0,008	0,008	0,000	0,009	0,008	

No.	<i>atpI-atpH</i>	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>C. striatiforme</i> 3-3							
2	<i>C. striatiforme</i> 40	0,000						
3	<i>C. opulifolium</i> 111	0,000	0,000					
4	<i>C. strictum</i> 118	0,000	0,000	0,000				
5	<i>C. ficifolium</i> F3-5	0,006	0,006	0,006	0,006			
6	<i>C. suecicum</i> S2-2	0,007	0,007	0,007	0,007	0,001		
7	<i>C. album</i> 216	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,007	

No.	<i>petL-psbE</i>	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>C. strictum</i> 118							
2	<i>C. album</i> 216	0,000						
3	<i>C. striatiforme</i> 3-3	0,000	0,000					
4	<i>C. striatiforme</i> 40	0,000	0,000	0,000				
5	<i>C. opulifolium</i> 111	0,000	0,000	0,000	0,000			
6	<i>C. ficifolium</i> F3-5	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009		
7	<i>C. suecicum</i> S2-2	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,003	

No.	<i>trnD-trnT</i>	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>C. strictum</i> 118							
2	<i>C. album</i> 216	0,000						
3	<i>C. suecicum</i> S2-2	0,009	0,009					
4	<i>C. striatiforme</i> 3-3	0,000	0,000	0,009				
5	<i>C. striatiforme</i> 40	0,001	0,001	0,010	0,001			
6	<i>C. opulifolium</i> 111	0,001	0,001	0,010	0,001	0,000		
7	<i>C. ficifolium</i> F3-5	0,010	0,010	0,001	0,010	0,011	0,011	