

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Katedra ekologie



Studie rodu *Crocus* (šafrán) v České republice
a sousedních územích

Study of the *Crocus* genus in the Czech Republic and
adjacent areas

Diplomová práce

Diplomantka: Bc. Adéla Kulichová
Konzultant: Mgr. Jindřich Chrtek, CSc.
Vedoucí práce: Ing. Karel Boublík, Ph.D.

2017

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Adéla Kulichová

Ochrana přírody

Název práce

Studie rodu *Crocus* (šafrán) v České republice a sousedních územích

Název anglicky

Study of the *Crocus* genus in the Czech Republic and adjacent areas

Cíle práce

1. Zhodnocení morfologické variability našich populací druhů *Crocus albiflorus* a *C. heuffelianus* a některých hybridogenních, zřejmě kulturních typů vysazovaných do volné přírody.
2. Zjištění ploidní úrovně a velikosti genomu (zajímavé jsou např. krkonošské rostliny, které jsou podle prvních zjištění pouze diploidní, nicméně morfologicky značně variabilní a ne zcela shodné s diploidním *C. albiflorus*; na polské straně se ale naopak vyskytují polyploidy, odlišní ale od *C. heuffelianus*); hybridogenní typy jsou vesměs vysoce polyploidní a dají se cytometricky jednoduše odlišit od původních druhů. Souběžně zjištění variability v počtu chromozomů a vztahu k velikosti genomu.
3. Případně srovnání s karpatskými populacemi *C. heuffelianus* a alpskými *C. albiflorus*.
4. Podle finančních možností zjištění fylogenetických vztahů (analýza cpDNA).

Metodika

Sběr dat v terénu (monitoring populací, případně proměřování některých znaků), pěstování, stanovení počtu chromozomů metodou roztlakových preparátů, stanovení ploidní úrovně a velikosti genomu metodou průtokové cytometrie, morfometrická analýza (včetně geometrické morfometrie), případně (podle finančních možností) analýza cpDNA.

Doporučený rozsah práce

30-40 stran + přílohy

Klíčová slova

Crocus, Iridaceae, morfometrika, počty chromozomů, průtoková cytometrie, původní a nepůvodní výskyt, Česká republika

Doporučené zdroje informací

- Brighton C. A. (1976): Cytological problems in the genus *Crocus* (Iridaceae): 1. *Crocus vernus* aggregate. – Kew Bull. 31:33–46.
- Čeřovský J. et Jatiová M. (1999): *Crocus albiflorus* Kit. – In: Čeřovský J., Feráková V., Holub J., Maglocký Š. et Procházka F. [red.], Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů 5: 117, Příroda, Bratislava.
- Harpke D., Carta A., Tomović G., Ranđelović V., Ranđelović N., Blattner F. R. et Peruzzi L. (2015): Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus* series Verni (Iridaceae). – Pl. Syst. Evol. 301: 309–325.
- Chrtek J. jun. (2004): *Crocus* L. – šafrán. – In: Štěpánková J. (ed.), Květena České republiky 8: 556–559, Academia, Praha.
- Krist V. (1934): Šafrány československé republiky (Náčrt zeměpisného rozšíření). – Příroda 27: 206–209, 231–233.
- Leneček O. (1934): Unsere wilden Safran-Arten. – Natur u. Heimat, Aussig, 5: 36–42, 83–85.
- Mathew B. (1982): The *Crocus*: a revision of the genus *Crocus* (Iridaceae). – London.
- Pavličko A. et Buřková I. (1998): Šafrán bělokvětý (*Crocus albiflorus*) na Šumavě. – Zpr. Čes. Bot. Společ. 32(1997): 149–152.
- Pilous V. (1975): Příspěvek k rozšíření šafránu Heuffelova (*Crocus heuffelianus* Herb.) a bělokvětého (*Crocus albiflorus* Kit.) ve východních Krkonoších. – Opera Corcont. 12: 163–176.
- Rafiński J. N. (1976): O pozycji systematycznej krokusów rosnących w Górach Izerskich. – Fragm. Florist. Geobot. 22: 9–12.

Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Karel Boublík, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

Mgr. Jindřich Chrtek, CSc.

Elektronicky schváleno dne 16. 3. 2016

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 16. 3. 2016

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 27. 02. 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Karla Boublíka, Ph.D., a Mgr. Jindřicha Chrtka, CSc., a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Praze dne 18. 4. 2017

.....

Poděkování

Za toto zajímavé téma, rady a ochotnou pomoc v terénu i za konzultace děkuji svému konzultantovi Mgr. Jindřichovi Chrtkovi, CSc. Za pomoc při terénním výzkumu speciálně ještě děkuji mému tatškovi, který se mnou objezdil většinu lokalit. Také děkuji svému vedoucímu práce - Ing. Karlovi Boublíkovi, Ph.D., že mi toto téma umožnil zpracovávat, a za kontrolu práce. Ing. Mgr. Pavlovi Trávníčkovi, Ph.D. děkuji za odborné vedení v laboratoři průtokové cytometrie v Botanickém ústavu AV ČR. Za objasnění některých funkcí programu Tps morphometric děkuji Mgr. Kristýně Hanušové. Za překlad německých článků děkuji Ing. Pavlovi Tolárkovi, CSc. Za pomoc při práci s programem ArcGIS děkuji Bc. Stanislavovi Švačkovi, a za další věci technického rázu děkuji Jakubovi Růckerovi. Velké díky patří v první řadě celé mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala, a kamarádce Kamče.

V Praze dne 18. 4. 2017

.....

Abstrakt

Rod *Crocus* (šafrán) patří mezi taxonomicky obtížné skupiny. Zahrnuje 80–200 druhů (dle autora) rozšířených od západní Evropy a severní Afriky až do západní Číny. Centrum diverzity se nachází na Balkánském poloostrově a v Malé Asii. V této práci se zaměřuji na okruh jarních šafránů (série *Verni*) v České republice a na jedné lokalitě v Polsku. U nás se vyskytují tři druhy. *C. vernus* (š. bělokvětý) a *C. heuffelianus* (š. karpatský) jsou na seznamu silně ohrožených rostlin, posledním druhem je *C. tommasinianus*, který zatím ochrany nepozbývá; kromě toho jsou do přírody vysazovány kulturní šafrány, zde označované jako *C. vernus* agg. Bylo navštíveno celkem 20 lokalit na Šumavě, v moravských Karpatech, v severovýchodních Čechách a na polské straně Krkonoš. Vzorky byly odebrány na 19 lokalitách (1 zanikla). Úkolem práce bylo zrevidovat lokality – zjistit, o jaké druhy se jedná, zhodnotit morfologickou variabilitu, zjistit ploidní úroveň a velikosti genomu našich populací a případně zjistit variabilitu v počtu chromozomů a vztah k velikosti genomu, nakonec porovnání populací (lokalit) mezi sebou a s dalšími pracemi. Morfologická rozdílnost byla měřena na místě a poté i doma, barva byla popisována stejně tak. Dále byl použit program Tps morphometric pro testování tvarové podobnosti okvětních lístků. Ploidní úroveň a velikost genomu byla zjištěna v laboratoři pomocí průtokové cytometrie. Pro zobrazení výsledků byla použita popisná i mnohorozměrná statistika (PCA a DA). Bylo zjištěno, že nejlepší rozlišovací morfologické znaky druhů jsou v květu, hlavními je rozdíl ve výšce prašníků a blizen, šířka a délka okvětních lístků. Průtoková cytometrie se ukázala jako nejvhodnější (rychlá, přesná a levná) pomocná metoda při určování šafránů, neboť velikost genomu dobře odpovídá již dříve zjištěným počtům chromozomů i morfologickým znakům. Na základě rozdílné velikosti genomu je možné spolehlivě odlišit výsadby zahradních kultivarů od populací morfologicky podobného druhu *C. heuffelianus*; byly také rozlišeny dvě skupiny populací druhu *C. heuffelianus*: „západokarpatská“ a „krkonošská“, lišící se počtem chromozomů i velikostí genomu. Hlavním výsledkem je také první bližší prozkoumání populace *C. tommasinianus*, která dosud nebyla známa. Diplomová práce komplexně hodnotí šafrány ČR a přináší nové originální poznatky. Mohly by na ně navázat další výzkumy, jako je například porovnání našich populací se zahraničními.

Klíčová slova: průtoková cytometrie, ploidie, morfologie, morfometrika, velikost genomu, chromozomový počet, původní a nepůvodní výskyt, Iridaceae

Abstract

The genus *Crocus* (saffron) belongs to a taxonomically difficult group. It includes 80–200 species, depending on a concept accepted, distributed from Western Europe and northern Africa to western China with diversity centers in the Balkan Peninsula and Asia Minor. This study is focused on series Verni in Czech Republic and one other locality in Poland. There are three species in Czech Republic: *C. vernus* and *C. heuffelianus* which are on list of highly endangered plants and *C. tommasinianus* which has not had protection yet. Besides of them, field populations of cultivated plants are known from several sites. Twenty localities in the Šumava Mts., northeastern Bohemia and Moravian Carpathians was visited. Samples were collected at 19 localities (1 extinct). The aim of the study was to revise localities, determine the plants, assess morphological variability, determine ploidy level and genome size and optionally determine variability in chromosome number and its relation to genome size. Morphological characters were measured in the field and at home too, color of blossoms as well as, geometrical morphometric was used for testing shape similarity of petals. Ploidy level and genome size was detected by flow cytometry. Descriptive and multivariate statistics (PCA and DA) were used to show results. The best morphological characteristics to determinate species are the position of anthers and stigma and width and length of the petals. Flow cytometry has proved the best (fast, exact and cheap) supportive method to determinate species of saffron because genome size corresponds well to previously identified chromosome numbers and morphological characters. Based on difference in the genome size, two groups were recognized within *C. heuffelianus*, namely the “west Carpathian” and “Krkonoše” groups. A valuable results is also the morphological and genome size analysis of the hitherto only one known population of *C. tommasinianus*. Diploma thesis evaluate complexly saffron of the Czech Republic and brings new original data. Further studies should be aimed at comparison of Czech and other central European populations.

Keywords: flow cytometry, ploidy, morphology, morphometry, genome size, chromosome number, the original and non-original occurrence, Iridaceae

Obsah	
1	Úvod 8
2	Cíle práce..... 9
3	Literární rešerše.....10
3.1	Rod <i>Crocus</i>10
3.1.1	Obecná charakteristika10
3.1.2	Druhy rodu <i>Crocus</i> v ČR.....13
3.2	Průtoková cytometrie20
3.3	Geometrická morfometrika22
4	Metodika.....24
4.1	Sběr dat.....24
4.2	Zpracování vzorků29
4.2.1	Průtoková cytometrie29
4.2.2	Morfometrika okvětních lístků30
4.3	Analýza dat.....30
4.3.1	Morfologie30
4.3.2	Velikost genomu.....31
4.3.3	Morfometrika okvětních lístků31
5	Výsledky.....32
5.1	Morfologie32
5.2	Velikost genomu41
5.3	Morfometrika okvětních lístků49
6	Diskuze.....51
6.1	Morfologie a morfometrika51
6.2	Vývoj loka lit.....52
6.3	Velikost genomu57
7	Závěr.....61
8	Seznam použité literatury62
9	Seznam příloh69
10	Přílohy70
10.1	Taxonomie rodu <i>Crocus</i> dle Mathewa (1984).....70
10.2	Monitoring druhů <i>C. vernus</i> a <i>C. heuffelianus</i> dle NDOP.....71
10.3	Popisná statistika morfologických znaků vyjádřená pomocí boxplotů72
10.4	Hodnoty morfologických znaků na všech loka litách75
10.5	Fotodokumentace lokalit.....78

1 Úvod

V této diplomové práci se budu zabývat rodem *Crocus* (šafrán), který patří mezi taxonomicky obtížné skupiny. Počet rozlišovaných druhů značně kolísá v závislosti na přijatém pojetí, zhruba od 80 po 200 (Chrtek, 2010; Peruzzi, 2016). Šafrány jsou rozšířeny od západní Evropy a severní Afriky až do západní Číny. Centrum diverzity se nachází na Balkánském poloostrově a v Malé Asii (Harpke et al., 2013; Petersen et al., 2008). V České republice se vyskytují zejména na jaře kvetoucí šafrány ze série *Verni* (*Crocus vernus* agg.). Nejvýznamnějšími zástupci jsou druhy *C. vernus* (= *C. albiflorus*, š. bělokvětý) a *C. heuffelianus* (š. karpatský), teprve nedávno byl u nás rozlišen i *C. tommasinianus* (š. Tommasiniho). Kromě toho jsou do přírody vysazovány zahradní kultivary (zde označované jako *C. vernus* agg.).

Vzájemné odlišení druhů je v některých případech obtížné. Může za to vysoká morfologická proměnlivost, hlavně květů a jejich zbarvení. Tato variabilita se často projevuje i v rámci jedné lokality (Rafiňsky, 1976). *Crocus vernus* je pravděpodobně původní na Šumavě, v Novohradských horách (Pavlíčko et Buřková, 1998; Chrtek, 2010), v Bílých Karpatech a na některých lokalitách na Valašsku (Kuča et al., 1991). Nepůvodní je pravděpodobně v Krkonoších (Pilous, 1975) a na dalších izolovaných lokalitách. Těžiště výskytu druhu *C. heuffelianus* je v Moravskoslezských Beskydech (Popelářová et al., 2011). Původnost na krkonošských a orlickohorských lokalitách je sporná (Chrtek, 2010), dle Hendrycha (1987) však není původní na žádné lokalitě v České republice. V severních Čechách jde o výskyt zahradních kultivarů *C. vernus* agg. (Višňák, 2016).

Obsahem práce bylo zmapovat a zrevidovat co největší počet lokalit známých z literatury v rámci ČR a zjistit pomocí morfologických a cytometrických metod, jestli se jedná o druhy, které jsou na jednotlivých lokalitách uváděny. Díky těmto metodám můžeme zjistit i variabilitu našich druhů (*C. vernus* a *C. heuffelianus*) a zjistit morfologické i genetické rozdíly mezi pravděpodobně původními populacemi a zahradními kultivary. Hlavními metodami, které jsou v práci použity pro určení druhů, jsou klasická morfometrika (měření znaků), geometrická morfometrika (porovnávání tvarů) okvětních lístků a průtoková cytometrie, která je rychlou metodou, používanou pro určení ploidie a velikosti genomu (Suda et Pyšek, 2010).

2 Cíle práce

Hlavní cíle práce jsou:

- zhodnocení morfologické variability našich populací druhů *Crocus vernus* a *Crocus heuffelianus* a některých hybridogenních, zřejmě kulturních typů vysazovaných do volné přírody;
- zjištění ploidní úrovně a velikosti genomu;
- souběžné zjištění variability v počtu chromozomů a jejich vztahu k velikosti genomu;
- případné srovnání s karpatskými populacemi *C. heuffelianus* a alpskými *C. vernus*;
- zjištění fylogenetických vztahů - analýza cpDNA (podle finančních možností).

3 Literární rešerše

3.1 Rod *Crocus*

3.1.1 Obecná charakteristika

Šafrány jsou jednoděložné rostliny z čeledi Iridaceae. Zkoumaný rod *Crocus* L. patří mezi taxonomicky obtížné skupiny. Počet rozlišovaných druhů značně kolísá v závislosti na přijatém taxonomickém konceptu. Petersen et al. (2008) uvádí 88 druhů, Saxena (2010) 85–100 druhů; nejnovější studie využívající morfologické, karyologické a molekulární metody pak až 200 druhů (Harpke et al., 2013; Peruzzi 2016). Petersen et al. (2008) ve fylogenetické studii založené na sekvencích vybraných úseků chloroplastové DNA a dříve získaných morfologických datech (Mathew, 1982) rozdělují zástupce rodu *Crocus* do dvou podrodů: *Crocus* a *Crociris*. Podrod *Crociris* Mathew obsahuje jen druh *C. banaticus* J. Gay (syn. *C. iridiflorus* Heuff. ex Rchb.). Podrod *Crocus* se dále dělí na 2 sekce: *Crocus* a *Nudiscapus* Mathew. Sekce *Crocus* se pak dělí na 6 okruhů a sekce *Nudiscapus* na 9 okruhů (Petersen et al. 2008, Matthew et al. 2009, Harpke et al. 2013). Tyto 2 sekce byly vymezeny na základě přítomnosti bazální listové šupiny (prophyll) a dalších morfologických znaků, jako jsou například struktura obalů hlíz, přítomnost nebo nepřítomnost blanitých listenců, barva prašníků a doba kvetení (Peterson et al., 2008). Přehled členění podrodu *Crocus* dle Mathewa (1982) na sekce a okruhy je uveden v příloze 1. Harpke et al. (2013) v zatím poslední fylogenetické studii celého rodu založené na sekvencích chloroplastového úseku trnL-trnF, jaderné ITS a jednoho single-copy genu zpochybnili oddělování druhu *C. banaticus* do samostatného podrodu a v podstatě potvrdili oprávněnost doposud rozlišovaných okruhů (sérií).

Všechny druhy rodu *Crocus* jsou vytrvalé byliny, se zploštělou kulovitou bazální stonkovou hlízou, která je obalena síťnatě rozpadavými zbytky listových pochev. Stonek je výrazně zkrácený, pouze podzemní. Listy jsou přízemní, čárkovité, v dolní části obalené kožovitými šupinami (katafyly), lysé, hladké, tmavě zelené, tupé, kožovité s bělavým středním pruhem; vyrůstají současně s květy nebo po odkvětu. Květy vyrůstají přímo z hlízy většinou jednotlivě, vzácně po dvou až třech. Květy jsou oboupohlavné, pravidelné, s nálevkovitým okvětím; okvětní trubka je přímá, dlouhá

a válcovitá, zasahující z části pod povrch půdy, téměř celá krytá blanitým listenem; okvětních lístků je 6, vyrůstají ve 2 kruzích, jsou podlouhlé, obkopynaté nebo eliptické. V květu jsou zpravidla 3 tyčinky, nitky jsou rovné a přirůstají k bázi vnějších okvětních lístků; prašníky jsou šípovité; čnělka je nitkovitá a dlouhá, v horní části členěná do 3 nálevkovitých až vějířovitých bliznových ramen, semeník je spodní a je umístěn těsně pod povrchem půdy. Plodem je trojpouzdrá tobolka; semena jsou široká, vejcovitá až kulovitá s poutkem a masíčkem. Při dozrávání semen se stopka prodlužuje a tobolky se tak dostávají nad povrch půdy. Šafrány jsou entomogamní a protandrické rostliny (Chrtek, 2010). Množí se semeny nebo vegetativně dceřnými hlízami (Čeřovský et Jatiová, 1999).

Šafrány jsou rozšířeny od západní Evropy a severní Afriky na východ, až do západní Číny. Hlavní centra diverzity rodu se nachází na Balkánském poloostrově a v Malé Asii (Petersen et al., 2008; Harpke et al., 2013). Tyto dva regiony jsou charakterizovány mírnými zimami se srážkami od podzimu do jara. Rod *Crocus* je tedy dobře přizpůsoben těmto podmínkám a aktivně roste od podzimu do pozdního jara. Horké léto rostliny přežívají pod zemí v podobě hlíz. Kvetou jeden až dva týdny na jaře nebo na podzim (Saxena, 2010), tato doba se však může rok od roku trochu lišit, neboť je závislá na průběhu počasí (Pilous, 1975).

Crocus* série *Verni

Mezi taxonomicky nejobtížnější skupiny šafránů patří okruh jarních šafránů – série *Verni*, zahrnující podle zatím poslední studie (Harpke et al., 2015) druhy *C. etruscus* Parl. (Toskánsko, Itálie), *C. ilvensis* Peruzzi et Carta (Elba, Itálie), *C. kosaninii* Pulević (Srbsko), *C. tommasinianus* Herb. (Balkánský poloostrov, na sever až po j. Maďarsko), *C. vernus* (L.) Hill (= *C. albiflorus* Kit., Pyreneje, Alpy, středoevropské hornatiny, Balkánský poloostrov), *C. neapolitanus* (Ker Gawl.) Loisel. (s. Španělsko, Pyreneje, j. Alpy, Apeniny), *C. neglectus* Peruzzi et Carta (Itálie), *C. siculus* Tineo (Sicílie), *C. heuffelianus* Herb. (ČR, Slovensko, Ukrajina, Rumunsko) a *C. longiflorus* Raf., dříve řazený do série *Longiflori* (jz. Itálie, Sicílie, Malta). Mezi hlavní evoluční mechanismy patřila zřejmě polyploidní diferenciace, spojená s fúzemi a štěpením chromozomů, alopatriká diferenciace a v menší míře i hybridizace (Harpke et al. 2015). Systematika šafránů série *Verni* je obtížná, zejména kvůli

jednoduché morfologické stavbě rostlin, a tím pádem nedostatkem hodnotitelných znaků, ale současně i kvůli velké proměnlivosti některých znaků na populační úrovni - zejména barvě květů.

Použitelným pomocným znakem může být počet chromozomů a s tím související velikosti genomu. Diferenciace v počtu chromozomů je velká: $2n=8-23$ (Rafiňský, 1976; Harpke et al., 2013), u některých morfologicky vymezených druhů je ale známo i více chromozomových počtů.

V rámci série *Verni* je pak taxonomicky nejkomplicovanější okruh *Crocus vernus*, z výše uvedených druhů zahrnující *C. heuffelianus*, *C. neapolitanus*, *C. neglectus*, *C. siculus* a *C. vernus*. Jméno *C. vernus* je přitom po nedávné lektotypifikaci jména *C. sativus* var. *vernus* použito pro rostliny dříve označované jako *C. vernus* subsp. *albiflorus* (Kit.) Ces. (\equiv *C. albiflorus* Kit.) (Peruzzi et al. 2013). Správné jméno pro rostliny dříve označované jako *C. vernus* subsp. *vernus* je pak *C. neapolitanus*. Uvedené pojetí, tj. rozlišování pěti taxonů na druhové úrovni ale nebylo a není všeobecně přijímáno. Mathew (1980) uvádí pouze druh *C. vernus* členěný do dvou poddruhů – subsp. *vernus* a subsp. *albiflorus*. Mnozí autoři naopak řadí ke druhu *C. heuffelianus* pouze východo- a jihokarpatské populace, zatímco západokarpatské populace oddělují do samostatného druhu *C. discolor* G. Reuss (*C. scepusiensis* Rehmer et Woł.; Májovský et al., 1991, Marhold et al., 2007). Některé další morfologicky vymezené typy nebyly zatím formálně popsány (např. *Crocus* sp. 'Cakor Pass', Dietrich, 2002). Nejdůležitější rozlišovací znaky jsou tvar a barva okvěti, tvar blizny a vzájemné postavení blizny a prašníků.

Rod *Crocus* v České republice

V České republice se vyskytují zejména na jaře kvetoucí šafrány z okruhu *Crocus vernus*. Většinu v přírodě rostoucích populací je možné přiřadit ke druhům *C. vernus* a *C. heuffelianus*, v některých případech jde ale zřejmě o vysázené vyšlechtěné zahradní kultivary; v nedávné době byl u nás rozlišen i druh *C. tommasinianus*.

Na dvou místech v Českém krasu byl vysazen rovněž na jaře kvetoucí *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. ze série *Biflori* Mathew a dříve byl pěstován na podzim

kvetoucí *Crocus sativus* L. ze sekce *Crocus*, sterilní triploid odvozený zřejmě od druhu *C. cartwrightianus* (Mathew, 1982).

3.1.2 Druhy rodu *Crocus* v ČR

3.1.2.1 *Crocus vernus* (= *Crocus albiflorus*) – šafrán bělokvětý

Morfologie

Crocus vernus je 5–15 cm vysoká bylina. Hlíza měří 10–12 mm v průměru. Listy vyrůstají současně s květem a jsou většinou čtyři, vzácně dva nebo tři, v době květu jsou 2–6 cm dlouhé a nepřesahují vrchol květu, po odkvětu ale dosahují délky až 30 cm; Květy jsou obvykle jednotlivé, vzácně vyrůstají po dvou. Okvětní trubka vyrůstající přímo z hlízy je v horní části bílá, fialová nebo s fialovými proužky; okvětní cípy jsou bílé, v různých odstínech fialové, nebo pouze s fialovými proužky na bílém podkladu, podlouhle kopinaté až obkopinaté, vzácněji i podlouhle eliptické, 1,8–3,5 cm dlouhé, 0,6–1,1 cm široké, lžicovitě vyduté, na vrcholu zaokrouhlené nebo vzácně tupé, při bázi (v ústí okvětní trubky) někdy s fialovými měkkými chloupky. Tyčinky s prašníky vždy převyšují vrchol pestíků, nitky tyčinek jsou rovné, bílé, cca 8 mm; prašníky jsou oranžové, 0,9–1,1 cm dlouhé; semeník je elipsoidní, 6–7 mm v průměru, čnělka nitkovitá, bělavá, 5–8 cm dlouhá, v horní části členěná do tří nálevkovitých až vějířovitých oranžových ramen s bliznami. Tobolky jsou elipsoidní, 10–15 mm dlouhé a 4–6 mm široké; semena jsou kulatá, přibližně 2 mm v průměru, červenohnědá.

Vegetační doba *C. vernus* je krátká, trvá od března do května (Čeřovský et Jatiová, 1999). Tento druh je proměnlivý zejména v barvě květů. Květy mohou být světle až sytě fialové, zcela bílé nebo s fialovými žilkami na bílém podkladu. Populace mohou být tvořeny buď jednou barvou květů, nebo mohou být barevně smíšené (Chrtěk, 2010). Populace se světle fialovými květy mohou být označeny jako *f. violaceus* Derganc.

Celkové rozšíření *C. vernus*

Šafrán bělokvětý je horský druh, vyskytující se na loukách a pastvinách v Pyrenejích, Alpách a pohořích Balkánského poloostrova na jihovýchod po Albánii; oddělené arely jsou v pohořích Massif Central, Jura, v Českém masivu, Západních Karpatech a jinde (Mathew, 1982).

Rozšíření *C. vernus* v ČR

Výskyt šafránu bělokvětého v České republice je soustředěn do tří hlavních oblastí – na Šumavu, do Novohradských hor, do zejména východní části Krkonoš a na Valašsko do povodí říčky Smoliny.

Na Šumavě bylo původně 13 lokalit, čtyři poté zanikly (Pavlíčko et Buřková, 1998). Všechny lokality se soustřeďují do 3 hlavních oblastí – Strážný, Křišťanov (Arnoštov) a Zátoň (Chrtek, 2010). Nejvíce lokalit se nachází v okolí Strážného (Pavlíčko et Buřková, 1998; Procházka 1990; Ekrt et Lepší, 2013). Otázka původnosti zůstane zřejmě ještě dlouho otevřená. Šumavské lokality mohou souviset s původním výskytem v Alpách, na druhou stranu je většina lokalit na loukách u současných nebo zaniklých obcí, kde se dá spíše předpokládat záměrná výsadba. Na druhou stranu nelze vyloučit, že sem byl druh vytlačen z původních lokalit, kde vlivem nepříznivých podmínek následně vyhynul (Pilous, 1975; Pavlíčko et Buřková, 1998; Chrtek, 2010).

Šafrán bělokvětý na české straně Krkonoš poprvé sbíral K. Krčan v roce 1915, nález byl ale zveřejněn až o mnoho let později (Šourek 1970); lokalita se zřejmě shoduje s recentní lokalitou v Anenském údolí. Teprve po druhé světové válce je uváděn z povodí Alberického a Lysečinského potoka ve východní části pohoří (Šourek 1970). Pilous (1975) v rámci podrobného průzkumu lokalit šafránů ve východních Krkonoších v letech 1972–1973 zjistil cca 18 větších i menších lokalit a potvrdil tak pravděpodobné šíření druhu v této oblasti (druhou méně pravděpodobnou možností je přehlížení druhu v minulosti). Poslední pravděpodobně již zaniklou lokalitou v Krkonoších byla lokalita V Rybníčkách v Horní Rokytnici. V současné době je na české straně Krkonoš známo přibližně 30 lokalit (Ludmila Harčariková, Josef Harčarik a Jindřich Chrtek, 2017, in verb.). Všechny lokality jsou pravděpodobně

nepůvodní a vznikly vysazením, neboť se nacházejí ve vesnicích poblíž bývalých nebo i současných stavení. (Pilous, 1975).

Valašská oblast zahrnuje šest lokalit s různě početnými populacemi, původnost je podobně jako jinde sporná (Kuča et al., 1991; Čeřovský et Jatiová, 1999).

Další jednotlivé lokality

Slunečná u České Lípy, rezervace Farská louka; Hrotovice na Třebíčsku; Nové Město na Moravě, rezervace U Bezděkova (Žďárské vrchy); Josefův Důl - Antonínov (Jizerské hory). Tyto lokality jsou také považovány za nepůvodní (Čeřovský et Jatiová, 1999; Chrtek, 2010). Poslední nepůvodní lokalita leží na Broumovsku u Police nad Metují (Chrtek, 2010). Původnost není naopak zcela vyloučená v Pohoří na Šumavě (Novohradské hory) a v rezervaci Za lesem na Uherskohradištsku (Bílé Karpaty). Mapu rozšíření *C. vernus* (pod jménem *C. albiflorus*) v ČR na základě databáze NDOP můžete vidět v příloze 2.

Počet chromozomů

Doposud byl zjištěn pouze somatický počet chromozomů $2n=8$ (IPCN, 2017). Na našem území u rostlin ze Šumavy a Jizerský hor, metodou průtokové cytometrie, bylo zjištěno množství jaderné DNA, které odpovídá diploidnímu počtu $2n=8$ u několika dalších rostlin z ČR (Chrtek, 2010; Harpke et al., 2015).

Ekologie a ohrožení

Stanovištěm šafránu bělokvětého jsou mírně vlhké až vlhké horské louky, pastviny a vzácně i křoviny. Roste na půdách hlinitých až jílovitohlinitých, hlubokých, vlhkých, humózních, čerstvých, živinami bohatších, slabě kyselých až neutrálních (Čeřovský et Jatiová, 1999; Chrtek, 2010). Roste ve společenstvech řádu *Arrhenatheretalia* (Čeřovský et Jatiová, 1999), kde je charakteristickým druhem svazu *Polygono-Trisetion* – horské trojštětové louky a *Arrhenatherion* – mezofilní ovsíkové a kostřavové louky (Čeřovský et Jatiová, 1999; Chrtek, 2010). Známa je také jedna lokalita (u Nového Města na Moravě) na louce asociace *Trifolio-Festucetum rubrae* – ovsíkové a kostřavové louky s dominancí jetele a kostřavy červené. V České

republiky roste v nadmořských výškách od 300 do 800 m n. m., v Alpách je jeho těžiště výskytu od 1000 do 1850 m n. m. (Čeřovský et Jatiová, 1999).

Hodně lokalit s výskytem šafránu bělokvětého již zaniklo a mnoho nynějších populací slábne. Důvodem je přímá destrukce stanovišť, jako je zástavba, zakládání skládek a smetišť, odvodňování, hnojení, rozorávání luk, zalesňování, a bohužel také sběr vyrýpáváním i s hlízy. Pěstuje se na ozdobu. Hlízy jsou také často požírány zvěří (hlavně přemnoženými prasaty), jak jsem se sama přesvědčila na lokalitě Strážný - Pod obecním lesem (obr. 1). Takto blokovaná sukcese může však šafránu i prospívat. Nepřímou destrukcí těchto stanovišť je ponechávání luk bez jejich tradičního dřívějšího obhospodařování, jako byly pastva a kosení. To umožňuje rozvoj konkurenčně silnějším bylinám (Čeřovský et Jatiová, 1999).

V České republice je šafrán bělokvětý na seznamu zvláště chráněných druhů rostlin silně ohrožený dle Přílohy č. II vyhlášky ministerstva životního prostředí ČR č. 395/1992 Sb. Dle Červeného seznamu cévnatých rostlin ČR tento druh spadá do kategorie kriticky ohrožených druhů (C1) (Procházka, 2001). Lokality jsou většinou chráněny maloplošnou kategorií přírodní památka, nebo se nacházejí na území národních parků (Čeřovský et Jatiová, 1999).



Obr. 1) Lokalita Strážný - Pod Obecním lesem (18) rozrytá divokými prasaty; foto Adéla Kulichová (16. 4. 2016).

3.1.2.2 *Crocus heuffelianus* – šafrán Heuffelův, š. karpatský

Morfologie

Crocus heuffelianus je větší než *C. vernus*. Je vysoký 10–20 cm s hlízou 12–15 mm v průměru. Listy vyrůstající současně s květem jsou čtyři, tři nebo dva, v době květu je jejich délka 2–8 cm a šířka 2–4 mm, většinou nepřesahují vrchol květu, po odkvětu se prodlužují až na 32 cm. Květy vyrůstají jednotlivě, vzácně po dvou až třech. Barva okvětní trubky je v dolní části bílá, avšak v horní části je vždy světle fialová. Okvětní lístky vnitřní i vnější jsou tvarem a velikostí přibližně stejné a jsou obkopinaté až obvejčitě eliptické, lžícovitě vyduté, na vrcholu zaokrouhlené, někdy vykrojené, 3,5–4,5 cm dlouhé a 0,6–1,5 cm široké, fialové – v horní části s tmavší, v okrajích s rozpitou kresbou, vzácně bílé. Měkké chloupky v ústí okvětní trubky jsou fialové, vzácně bílé. Nitky tyčinek jsou přibližně 12 mm dlouhé. Tyčinky s prašníky na výšku měří 1,2–1,5 cm, nikdy nedosahují k vrcholu oranžových blizen. Semeník je elipsoidní, 7–9 mm v průměru, bělavá čnělka je 9–13 mm dlouhá. Tobolky jsou elipsoidní, okrové, 10–15 mm dlouhé a 4–6 mm široké. Semena jsou kulatá. Doba květu je od března do dubna (Harpke et al., 2015). Tento druh je proměnlivý jak v barvě květů, tak ve velikosti listů (Chrtek, 2010).

Celkové rozšíření *C. heuffelianus*

Za primární areál je považován oblouk Karpat od východu České republiky, přes Slovensko, Polsko, Ukrajinu až po jižní Rumunsko (Chrtek, 2010). Tento druh je rozšířen i v Rakousku, na celém Balkánském poloostrově, v jižním Maďarsku, východně se pak rozšířil do Řecka a severovýchodní Itálie (Leneček, 1934; Peruzzi, 2016).

Rozšíření *C. heuffelianus* v ČR

Těžiště výskytu šafránu Heuffelova v ČR je na severovýchodní Moravě v Moravskoslezských Beskydech, kde je v současnosti znám z okolí Nového Hrozenkova, Horní Lomné, Velkých Karlovic a z více lokalit v obci Zubří a jejím nejbližším okolí. Izolovaná lokalita je pak v Opavské pahorkatině v údolí říčky Hořina

mezi obcemi Velké Heraltice a Brumovice (Chrtek 2010, Popelářová et al. 2011). Nejasný zůstává výskyt u Spálova v Moravskoslezském kraji a z Velkých Losin v podhůří Hrubého Jeseníku. Za nepůvodní se považují lokality v Orlických horách (Chrtek, 2010). Další lokality se nacházejí na severu a západu východních Čech. Nejstarší známá lokalita v Krkonoších je na polské straně a nachází se v Sklářské Porubě (Pilous, 1975). Jde o nejzápadnější lokalitu *C. heuffelianus* vůbec (Leneček, 1934). Krkonošské lokality ale nejsou doposud dobře prozkoumány (Chrtek, 2010). Dle Hendrycha (1987) však není žádná lokalita v České republice původní. Odůvodňuje to tím, že značná část lokalit se nachází přímo v sousedství obcí, nebo přímo v nich a velkým zájmem o jeho pěstování. Rozšíření pěstování tohoto druhu do dalších regionů však nenastalo, a tak se tento druh vyskytuje jen v severních Čechách a na severní Moravě. Jako karpatský element v sudetské flóře označují tuto rostlinu Kavina (1914), Schustler (1918) a Hendrych (1987). Podrobný seznam a popis všech prozatím známých karpatských lokalit uvádí Popelářová et al. (2011). Monitoring dle NDOP tohoto šafránu v ČR je v příloze 2.

Počet chromozomů

U druhu *C. heuffelianus* ve zde přijatém pojetí bylo zjištěno více počtů chromozomů: $2n=10$, 16 a 18, ale vzácně i další počty ($2n=19$, 20, 22, 23; Harpke et al., 2013; 2015). Dle Brightona (1976) může být počet chromozomů i $2n=12$, $2n=14$ zjistili Pashuk (1987), Krichphalushi (1989) a Hindáková et Májovský (1977).

C. heuffelianus je tedy velmi proměnlivý v počtu chromozomů a na základě toho ho někteří autoři rozdělují na 2 druhy (Májovský et al., 1991; Mihaly et Kricsfalusy, 1997; Marhold et al., 2007). Západokarpatské populace jsou považovány za hypotetraploidy (předpokládané $x=5$) s chromozomovým počtem $2n=18$. Jsou označovány jako *C. discolor* (syn.: *C. scepusiensis*, *C. babiogorensis*), česky šafrán špišský. Východokarpatské (od východního Slovenska) a jihokarpatské rostliny patří k *C. heuffelianus* Herbert s str., počet chromozomů je $2n=10$. Tyto dva druhy se dají odlišit také drobnými morfologickými rozdíly. Západokarpatské rostliny by měly mít užší a kratší listy, které v době květů nedosahují ani báze okvětních lístků, méně výrazné skvrny na okvětních lístcích a jemně chlupaté báze okvětních lístků. Východo- a jihokarpatské rostliny by měly mít naopak dlouhé (často převyšující

vrchol květu) a poměrně široké listy již v době květu. Na vrcholu okvětních lístků by měla být výrazná tmavě filalová skvrna. Tyto morfologické znaky však nejsou spolehlivým určovacím znakem (Chrtek, 2010).

Ekologie a ohrožení

Šafrán karpatský se vyskytuje na loukách a vzácně i v potočních olšinách s hlinitými až jílovitohlinitými, hlubokými, čerstvě vlhkými, humózními, obvykle živinami bohatými půdami. Dle pH jsou tyto půdy slabě kyselé až neutrální, stejně jako u *C. vernus*. Roste ve společenstvech svazů *Polygono-Triseton* (horské trojštětové louky) a *Arrhenatherion* (mezofilní ovsíkové a kostřavové louky), vzácně i podsvazu *Alnion glutinoso-incanae* (Chrtek, 2010) ze svazu *Alnion incanae* (horské olšiny s dominancí olše šedé a lepkavé) (Neuhäuslová et Chytrý, 2010).

Tento druh také spadá do kategorie kriticky ohrožených druhů (C1) dle Červeného seznamu cévnatých rostlin ČR (Procházka, 2001) a je na seznamu zvláště chráněných druhů rostlin uveden jako silně ohrožený (Vyhláška 395/1992). Je ohrožen ze stejného důvodu jako *C. vernus* (viz výše) a chrání se taktéž obdobně. U tohoto šafránu je však větší problém s vegetativním rozmnožováním, rostliny vzniklé tímto způsobem jsou velmi malé (podobné semenáčkům) a nad povrchem země vytváří pouze drobné listy (Mihaly et Kricsfalusy, 1997; Klimešová et Klimeš, 2007). Z toho vyplývá, že rozmnožování semeny je klíčové. Důležitým managementem pro lokality s výskytem tohoto druhu je správné načasování seče – až na červen, tak aby semena stihla dozrát (Popelářová et al., 2011).

3.1.2.3 *Crocus tommasinianus* Herb. – šafrán Tommasiniho

Crocus tommasinianus má dlouhé trubkovité květy, objevují se na jaře současně s úzkými rovnými listy. Barva květů je lila až tmavě purpurová, někdy jsou okvětní lístky na vnější straně světlejší. Okvětní trubka je vždy bílá (Mathew, 1980). *C. tommasinianus* je původní v jihovýchodní Evropě od j. Maďarska po Černou Horu, Makedonii a Bulharsko, v Řecku a Albánii je výskyt zatím sporný (Mathew, 1980; Randelovic et al. 1990).

Tento druh je pouze zaznamenán na seznamu cévnatých rostlin České republiky (Danihelka et al., 2012), více o něm z našeho území nejsou zmínky. Uváděný počet chromozomů tohoto druhu je $2n=16$ (Harpke et al., 2013; 2015).

Kromě těchto druhů se u nás v přírodě vyskytují vysazené kulturní šafrány z této sekce (*Verni*), pro které je dále použito označení „*Crocus vernus* agg.“

3.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FCM = flow cytometry) je vysoce výkonná, rychlá a efektivní metoda, která zároveň měří a analyzuje více parametrů jednotlivých částí jedince. Mohou jimi být buňky, buněčná jádra, chromozomy atd. Je využitelná v oborech populační biologie rostlin, ekologie a systematická biologie (Kron et al., 2007). Používá se k určení ploidie, stanovení obsahu jaderné DNA, studiu genové exprese, analýze buněčného cyklu, počítání a určení typu krevních částic a k detekci a určení mikroorganismů (Suda, 2005). Pomocí této metody tedy získáváme poznatky o fenotypické rozmanitosti (Kron et al., 2007), vnitro- a mezipopulační ploidní diferenciaci a frekvenci neredukovaných gamet. Tato technika je dále ideální pro detekci a kvantifikaci vzácných evolučních procesů, například mezidruhového křížení. Velké využití má průtoková cytometrie také v taxonomii, kde ploidie, ale zejména velikost genomu může být jedním ze znaků podporujících oprávněnost zvoleného taxonomického konceptu. (Suda et Pyšek, 2010). Tato technologie byla vyvinuta na konci 50. let minulého století pro rychlé počítání a analýzu krevních buněk (Shapiro, 2007). První článek na téma průtoková cytometrie byl zveřejněn již před více než 40 lety (Heller, 1973), ale využití této metody výrazně vzrostlo až v posledních dvou desetiletích (Kron et al., 2007). Česká republika je již mnoho let vůdčí zemí v rozvoji a využití této metody (Suda et Pyšek, 2010).

Průtoková cytometrie analyzuje částice fluorescencí a rozptylem světla (Suda et Pyšek, 2010). Částice, které jsou v suspenzi, se pohybují rovným tokem skrz silný paprsek světla (Shapiro, 2004). Nejprve se na dvoušroubovici DNA naváže fluorescenční barvivo – fluorochrom, a to specificky i kvantitativně, což znamená, že množství barviva se rovná množství DNA. Pokud toto barvivo ozáříme světlem vhodné vlnové délky, dojde k excitaci, k přechodu elektronů na vyšší energetickou

hodnotu. Tento stav je však nestabilní a elektrony se tak hned vrací zpět do původního stavu. Tento přechod je doprovázen uvolněním tepelné a světelné (fluorescenční) energie. A protože část energie se ztrácí ve formě tepla, má tedy vyzařené světlo delší vlnovou délku než původní záření. Pomocí filtrů lze pak obě záření oddělit, a tak změřit fluorescenci průtokovým cytometrem (Suda, 2005).

Průtoková cytometrie má množství výhod. Analyzovatelným materiálem může být téměř jakákoli tkáň nebo pletivo a stačí jen velmi malé množství. Je možné zkoumat i tkáně nebo pletiva raných stadií ontogenetického vývoje nebo druhy ohrožené, s nízkým fitness, nebo nízkou populační hustotou, u kterých by použití jiných metod znamenalo ohrožení populací. U rostlin se obvykle používají listy, mohou se však použít i stonky, kořeny, kališní, korunní nebo okvětní lístky, semena atd. Může být zaznamenáno více parametrů najednou pro každou částici. Vysoký počet částic je analyzován rychle a s velkou statistickou přesností. Příprava vzorku je snadná a pohodlná, analýza netrvá déle než několik minut, což umožňuje zanalyzovat desítky vzorků v jeden den. To umožňuje zpracování populačních vzorků i zjišťování ploidní diversity na větší geografické škále. Výhodné také je, že tkáň nebo pletivo nemusí být mitoticky aktivní – buňky se nemusí dělit (Loureiro et al., 2010).

Kvalitu analýz ovlivňuje barvitelnost částic a zvolené fluorescenční barvivo. Barvitelnost ovlivňují ne zcela identické podmínky a přístrojové chyby. Chybu popisuje variační koeficient CV (podíl směrodatné odchylky a průměrné pozice píku). Chyba se pohybuje v rozmezí 1–10 %. My bychom však měli dodržovat maximální chybu do 3%, aby se analýza dala považovat za přesnou (Suda, 2005).

Přístroj (cytometr) se skládá z průtokové komůrky, zdroje excitačního světla, optické soustavy, souboru fotonásobičů a zesilovačů a počítačové části. Průtoková komůrka vyrovnává a řadí analyzované částice, tak aby se pohybovaly za sebou v úzkém středovém svazku přes ohnisko záření a mohly tak být měřeny. Zdroj excitačního světla může být buď laserový, nebo vysokotlakový se rtuťovými výbojkami. Může mít i oboje najednou. Výsledná fluorescence částic je snímána optickou soustavou, která je tvořena filtry a zrcadly. Poté je fotonásobiči převedena na pulzy elektrického proudu. Po zesílení signálu a další úpravě dochází k jeho digitalizaci a zobrazení v počítači ve formě histogramu. Histogram tedy zobrazuje relativní intenzitu fluorescence jednotlivých izolovaných částic (Suda, 2005).

3.3 Geometrická morfometrika

V posledních desetiletích se v biologii znovu rozvíjí morfologie a její tvarové přístupy. Převratný rozvoj nastal zejména využíváním tzv. geometrické morfometricky (Neustupa, 2006).

Landmarková geometrická morfometrika umožňuje na základě matematického popisu a modelování pochopit tvarovou rozmanitost. Prostor je vnímán jako geometrie Kendallova tvaroprostoru, který bere v úvahu Prokrustovskou vzdálenost (Klingenberg et Monteiro, 2005).

Geometrická morfometrika, kterou jsem použila, je založena na analýze landmarků. To jsou strukturně shodné (geometricky si odpovídající) body na souboru zkoumaných objektů (Macleod, 2001; Stegmann et Gomez, 2002). Najdeme je tedy na všech našich zkoumaných objektech a počítačově můžeme digitalizovat jejich polohu ve dvou nebo třech rozměrech (Neustupa, 2006). Můžeme je dělit na landmarky a semilandmarky. Landmarky jsou umístěny vždy na výrazně vymezených strukturách, jako jsou například hrany nebo styk symetrie objektu. Semilandmarky jsou také strukturně shodné a odpovídající si body, nemají však striktně danou pozici. Nachází se na křivce mezi landmarky (Macleod, 2001; Rosenberg, 2002).

Analyzované objekty s landmarky se poté přiloží na sebe (= Prokrustovská analýza), tak aby mezi odpovídajícími si landmarky byly co nejmenší rozdíly v poloze. Poloha homologních landmarků se nemění, jsou pevně dány. Objekt se však může přizpůsobovat posuny, rotováním, zvětšováním či zmenšováním (Neustupa, 2006). Oproti tomu semilandmarky mohou klouzat po obrysu objektu. Nakonec dojde k tomu, že se rovnoměrně rozmístí po křivce mezi landmarky (Macleod, 2001) Touto analýzou získáme „zbytkové vzdálenosti“ u každého objektu a každého landmarku. Dostaneme tak i průměrnou zbytkovou vzdálenost všech objektů. Zbytkové vzdálenosti obsahují informace o tvaru každého zkoumaného objektu. Tato analýza tedy modeluje komplexní tvarovou změnu mezi všemi dvojicemi zkoumaných objektů. Poté lze již definovat tvaroprostor, ten lze definovat pomocí os – hlavních trendů. (Neustupa, 2006).

Geometrická morfometrika má uplatnění v evoluční biologii, botanice, ekologii, zoologii, medicíně a v dalších biologických oborech. V taxonomii můžeme srovnávat podobnost a odlišnost různých druhů, což se mi bude hodit v této práci. V ekologii můžeme zkoumat a hledat faktory životního prostředí, které morfologickou rozmanitost ovlivňují. V biogeografii se jedná o využití v hledání tvarových trendů spojených s geografickým rozšířením různých populací druhů. (Neustupa, 2006).

4 Metodika

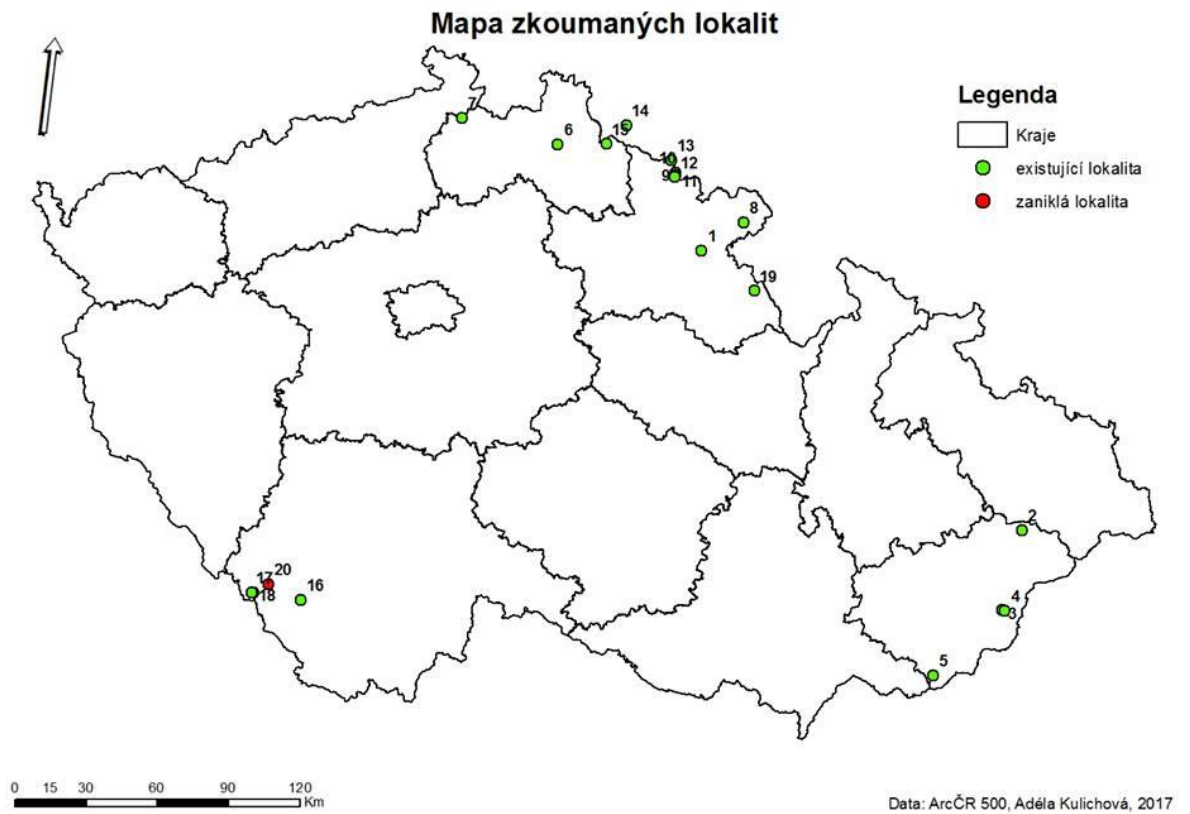
4.1 Sběr dat

Rostliny byly nasbírány na 19 lokalitách v Krkonoších, na Šumavě, u Liberce, v Jizerských horách, v Bílých Karpatech, na Broumovsku, na Náchodsku a v Orlických horách. Lokality byly vybrány tak, aby reprezentativně pokryly rozšíření druhů *C. vernus*, *C. heuffelianus* a *C. tommasinianus* v České republice. Zařadili jsme také jednu lokalitu na polské straně Krkonoš. Mapu zkoumaných lokalit vidíme na obrázku 2 a seznam a popis lokalit je uveden v tabulce 1.

Plánovali jsme, že z každé lokality odebereme 15 rostlin, to se však všude nepodařilo. Pokud na lokalitě byla populace malá, odebrali jsme méně vzorků, abychom zachovali populaci. Na některých lokalitách nebyl odběr 15 rostlin umožněn z důvodů pozdního příjezdu. Je komplikované zastihnout všechny lokality v době květu, protože všechny jarní šafrány kvetou od konce března do poloviny dubna. Záleží také na počasí a expozici lokality ke světovým stranám (Pilous, 1975).

Rostliny byly odebrány v plném květu, kdy byly tyčinky ještě rovné, nezkroutené. Nejprve byla změřena výška nadzemní části, poté byly rostliny vyryty i s hlízou a kořeny, abych mohla být poté změřeny všechny potřebné morfologické znaky. Rostliny byly vybírány náhodně napříč celou populací (lokalitou). Pokud se na lokalitě vyskytovalo více barev květů, vybírali jsme rostliny zároveň tak, abychom měli podobné zastoupení rostlin všech barev. Nebo alespoň tak, aby každá barva byla ve vzorcích zastoupena, pokud se nějaké barvy vyskytovalo málo.

Nakonec byl odhadnut přibližný počet jedinců a rozloha lokality, zaznamenaný GPS souřadnice pomocí GPS Etrex 30 a vše nafoceno. Odhadnutá rozloha lokality byla poté porovnána na internetu (mapy.cz, 2016; plány péče) a upřesněna.



Obrázek 2) Mapa dvaceti zkoumaných lokalit; autor: Adéla Kulichová.

Tabulka 1) Podrobný popis všech lokalit.

Číslo	Název	Popis lokality	Souřadnice	Nadmořská výška (m n. m.)	Rozloha lokality (ha)	Druh	Počet sebraných rostlin	Celkový počet rostlin na lokalitě (cca)	Sběratelé	Datum návštěvy
1	Babiččino údolí	ČR, Česká Skalice (distr. Náchod), NPR Babiččino údolí, 12 m západně za Státním zámkem Ratibořice	50,415116 s. š.; 16,053192 v. d.	280	0,15	<i>C. tommasinianus</i>	15	2300 kvetoucích	Kulichová A., Chrtěk J., Hájek A.	18. 3. 2016
2	PP Zubří	ČR, Zubří (distr. Vsetín), cca 200 m jižně od soutoku Zuberského (Hodorfského) potoka s Čertoryjským potokem, na zahradě Horní č. p. 173	49,484032 s. š.; 18,088977 v. d.	395	0,03	<i>C. heuffelianus</i>	15	cca 550 celkem, 350 kvetoucích	Kulichová A., Kulich M.	25. 3. 2016
3	PP Lačnov	ČR, Vizovická vrchovina, Lačnov (distr. Vsetín), jihozápadně za základní školou (č. p. 22)	49,1786314 s. š.; 18,0138136 v. d.	505 – 515	0,2068	<i>C. vernus</i>	15	v místě 20 000 - 30 000 kvetoucích + další desetitisíce okolo	Kulichová A., Kulich M.	25. 3. 2016
4	PP Sucháčkovy paseky	ČR, Vizovická vrchovina, Lačnov (distr. Vsetín), na pravém údolním svahu Lačnovského potoka, u osady Sucháčkovy paseky, asi 1 km jihovýchodně od obce Lačnov, východně vedle domu s č. p. 192.	49,1753103 s. š.; 18,0321708 v. d.	490 - 505	1,122	<i>C. vernus</i>	15	20 - 30 000 kvetoucích	Kulichová A., Kulich M.	25. 3. 2016
5	PP Za lesem	ČR, CHKO Bílé Karpaty, Javořínská hornatina, Horní Němčí (distr. Vsetín), 850 m severně od kóty Lesná a asi 3,5 km jihovýchodně od obce Horní Němčí, také asi 2,8 km západně od obce Strání	48,9054197 s. š.; 17,6533717 v. d.	600 - 610	1,0726	<i>C. vernus</i>	15	600 kvetoucích	Kulichová A., Kulich M.	25. 3. 2016
6	PP Lukášov	ČR, Lukášov (distr. Jablonec nad Nisou), leží mezi kótami 652 a 570; 1,2 km jihozápadně od první kóty a 820 m severovýchodně od druhé, 300 m napravo od silnice ve směru Lukášov- Kunratice, naproti domu s č. p. 18	50,7519744 s. š.; 15,1276203 v. d.	450 – 500	2,85	<i>C. vernus agg.</i>	15	1500 - 2500 kvetoucích	Kulichová A., Kulich M.	3. 4. 2016
7	PP Kytlice	ČR, CHKO Lužické hory, Falknov (distr. Děčín), jižní kraj obce Kytlice po obou stranách silnice, která vede údolím podél toku Kamenice z Kytlice do Polevska, také cca 4,8 km severovýchodně od Kamenického Šenova	50,8014975 s. š.; 14,5407311 v. d.	520	1,09	<i>C. vernus agg.</i>	12	1500 kvetoucích	Kulichová A., Kulich M.	3. 4. 2016

Číslo	Název	Popis lokality	Souřadnice	Nadmořská výška (m n. m.)	Rozloha lokality (ha)	Druh	Počet sebraných rostlin	Celkový počet rostlin na lokalitě (cca)	Sběratelé	Datum návštěvy
8	PP Šafránová stráž	ČR, CHKO Broumovsko, Suchý Důl (distr. Náchod), 400 m severozápadně od osady Slavný, vlevo u silnice směr Slavný – Suchý Důl.	50,541295 s. š.; 16,279215 v. d	556 - 560	0,2298	<i>C. vernus</i>	1 + 14 květů	přesně 383 kvetoucích	Kulichová A., Hájek A.	7. 4. 2016
9	Hrochova louka	ČR, Krkonošský NP, Horní Albeřice - Homí Maršov (distr. Trutnov), před domem č. p. 38, přes silnici a Albeřický potok naproti vápence .	50,6959039 s. š.; 15,8449136 v. d.	770 - 775	0,064	<i>C. vernus</i>	11	4500 kvetoucích	Kulichová A., Chrtek J.	8. 4. 2016
10	U Dána	ČR, Krkonošský NP, Horní Albeřice - Homí Maršov (distr. Trutnov), předpenzionem U Dána s č. p. 35. přímo u cesty a Albeřického potoka.	50,6991875 s. š.; 15,8450400 v. d.	780	0,005	<i>C. vernus</i>	12	25 kvetoucích	Kulichová A., Chrtek J.	8. 4. 2016
11	U Čerta	ČR, Krkonošský NP, Horní Albeřice - Homí Maršov (distr. Trutnov), naproti přes cestu penzionu Čert s č. p. 58 a vedle chalupy č. p. 60.	50,6892153 s. š.; 15,8482775 v. d	745	0,01	<i>C. vernus</i>	12	1200 kvetoucích	Kulichová A., Chrtek J.	8. 4. 2016
12	Dolní Albeřice	ČR, Krkonošský NP, Dolní Albeřice - Homí Maršov (distr. Trutnov), na stráni jihovýchodně za domem s č. p. 36, 110 m východně od silnice - přes Albeřický potok.	50,6813097 s. š.; 15,8456650 v. d.	790 - 700	0,7	<i>C. vernus</i>	10	5300 kvetoucích	Kulichová A., Chrtek J.	8. 4. 2016
13	Malá Úpa	ČR, Krkonošský NP, Horní Malá Úpa (distr. Trutnov), 40m severozápadně nad chalupou s č. p. 49, 1 km jihovýchodně od státní hranice s Polskem.	50,7437056 s. š.; 15,8114383 v. d.	1035	0,008	<i>C. vernus</i> + <i>C. heuffelianus</i>	2	200 -300 kvetoucích	Kulichová A., Chrtek J.	8. 4. 2016
14	Polsko	POL, Sklářská Poruba (distr. Jelení Hora, 3 km severně od středu zmiňovaného města a 4 km západně od středu obce Piechovice, 160 m západně od ČOV.	50.8551878 s. š.; 15.5270386 v. d.	650	0,009	<i>C. heuffelianus</i>	13	500 kvetoucích	Kulichová A., Chrtek J.	17. 4. 2016

Číslo	Název	Popis lokality	Souřadnice	Nadmořská výška (m n. m.)	Rozloha lokality (ha)	Druh	Počet sebraných rostlin	Celkový počet rostlin na lokalitě (cca)	Sběratelé	Datum návštěvy
15	Anenské údolí	ČR, Krkonošský NP, Harrachov (distr. Semily), vedle dolní stanice sedačkové lanovky Harrachov – Čertova hora, v nivě mezi říčkou Mumlavou a silnicí.	50,7745144 s. š.; 15,4154275 v. d.	635	1	<i>C. heuffelianus</i>	11	1200 kvetoucích	Kulichová A., Chrtek J.	17. 4. 2016
16	PP Vyšný - Křišťanov	ČR, Křišťanov (distr. Prachatice), 8 km východně od Volar, nad údolím Blanice a Puchěřského potoka, 1 km jihozápadně od obce Křišťanov, druhá část lokality je 1,5–2 km jihozápadně od této obce.	48,9099058 s. š.; 13,9981942 v. d.	887	4, 5	<i>C. vernus</i>	6	1200 kvetoucích	Kulichová A., Kulich M.	16. 4. 2016
17	Strážný - Pod hájovnou	ČR, NP Šumava, Strážný (distr. Prachatice), pod hájovnou 1 km západně od středu obce.	48,9101150 s. š.; 13,7109375 v. d.	880	0, 6	<i>C. heuffelianus</i>	1	5000 kvetoucích	Kulichová A., Kulich M.	16. 4. 2016
18	PP Strážný - Pod Obecním lesem	ČR, NP Šumava, Strážný (distr. Prachatice), 1,5 km západně od středu obce pod lesem.	48,9088222 s. š.; 13,7202825 v. d.	840 – 860	2, 5	<i>C. vernus</i>	10	30 - 40 0000 kvetoucích	Kulichová A., Kulich M.	16. 4. 2016
19	Luisino údolí	ČR, Deštné v Orlických horách (distr. Rychnov nad Kněžnou), na louce u meteorologické stanice, 1200 m na sever od vrcholu Lubný a cca 2 km na jihojihozápad od vrcholu Velké Deštné.	50,2871411 s. š.; 16,3884711 v. d.	870	0, 1	<i>C. heuffelianus</i>	12	240 kvetoucích	Kulichová A., Kulich M., Hejnyš V.	19. 4. 2016
20	Zátoň	ČR, NP Šumava, Zátoň (distr. Prachatice), mezi železniční tratí a cestou asi 1 km severovýchodně od obce a jihozápadně od Zátoně zastávky.	48,9485411 s. š.; 13,8001425 v. d.	835	0, 15	<i>C. vernus</i>	0	0	Kulichová A., Kulich M.	16. 4. 2016

4.2 Zpracování vzorků

Nejprve byl z každé rostliny odebrán list, který byl označen číslem lokality a rostliny a umístěn do lednice (1–5 dní podle potřeby) pro následnou cytometrickou analýzu. Dvě rostliny z každé lokality byly přesazeny do květináčů a umístěny do skleníku pro možnost spočítat chromozomy. Na tuto analýzu je třeba mít rostoucí rostliny s dělicím se pletivem v koříncích. U všech ostatních rostlin byly změřeny tyto morfologické znaky: výška nadzemní části (ještě v terénu), celková výška rostlin, výška hlízy, výška stonku, výška a šířka okvětních lístků (zvláště vnějších a vnitřních), délka tyčinek, rozdíl mezi výškou tyčinek a vrcholem blizen, délka a šířka listů. Dále byl zaznamenán počet listů a květů (pokud byl jiný než 1) a popsána barva květu. Specifická barva u druhu *C. tommasinianus* byla popsána pomocí hexadecimálního kódu odstínů fialové barvy. Ze všech rostlin byl ještě odebrán jeden vnitřní a jeden vnější okvětní lístek, tyto lístky byly vloženy do zkumavek se 70 % etanolem pro morfometrickou analýzu okvětních lístků. Všechny rostliny byly u měření morfologických znaků nafoceny. Nakonec byl ze všech vzorků vytvořen herbář, který je uložený v současné době u autorky této práce.

4.2.1 Průtoková cytometrie

Rostlinný materiál pro analýzu byl odebrán z listů všech nasbíraných rostlin. Vzorek, o velikosti zhruba 1 cm², byl umístěn na Petriho misku společně se standardem – sedmikráskou chudobkou (*Bellis perennis*). Ta má velikost genomu 2C=3,38 pg (Schönswetter et al., 2007). Poté bylo přidáno 510 µl pufru Otto I (kyselina citronová + detergent; Otto 1990), což způsobí, že výsledný roztok je hypotonický. Následně byl vzorek i standard nasekán žiletkou, tak aby se z rostlinné tkáně uvolnila jádra s jadernou DNA. Tato suspenze byla přefiltrována přes nylonový filtr (42 µm) do zkumavky. Po inkubaci při pokojové teplotě (cca 10 minut) bylo ke každému takto připravenému vzorku přidán 1 ml pufru Otto II – 0,4 M hydrogen fosforečnan disodný + fluorescenční barva propidium jodid, RNAza IIA (50 µg/ml) a β-mercaptoethanol (2 µl/ml). Zhruba po pěti minutách byl vzorek analyzován průtokovým cytometrem a byly vytvořeny histogramy. Variační koeficient nepřesáhl nikdy 5 %.

4.2.2 Morfometrika okvětních lístků

Okvětní lístky byly uchovány v 70 % etanolu do doby zpracování (2 měsíce). Poté byly ve zkumavce obarveny potravinářským barvivem a opatrně vyndány na papír, osušeny a následně přilepeny. Vznikly tak papírové čtvrtky s nalepenými vnitřními a vnějšími okvětními lístky pro každou lokalitu, ty byly poté oskenovány. Nakonec byly v programu PhotoFiltre (Gambier, 2007) rozřezány tak, aby na každém obrázku byl vždy jen jeden okvětní lístek.

4.3 Analýza dat

4.3.1 Morfologie

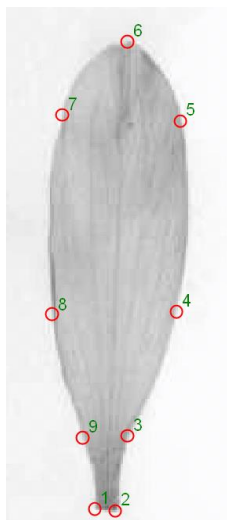
Ze všech 13 kvantitavních proměnných (výška nadzemní části, celková výška rostliny, výška hlízy, výška stonku, výška a šířka vnitřních a vnějších okvětních lístků, délka tyčinek, rozdíl mezi výškou tyčinek a vrcholem blizen, délka a šířka listů a počet listů) byly v programu „R“ (R Development Core, 2011) vytvořeny boxploty pro znázornění popisných statistik. Dále byla za pomoci Shapiro-Wilkova testu testována normalita dat. Jako další program byl použit program PAST (Hammer et al., 2001) pro mnohorozměrnou statistickou analýzu. Z ordinačních metod byla použita PCA (principal component analysis, analýza hlavních komponent) analýza pro zobrazení podobnosti a rozdílnosti jednotlivých rostlin a lokalit, dále DA (diskriminant analysis, diskriminační analýza) analýza pro rozlišení rostlin dle druhu. PCA i DA byla provedena dvakrát. První analýza byla provedena vždy se všemi naměřeným znaky, ne však se všemi rostlinami na lokalitách (u některých rostlin nebylo možné naměřit všechny znaky). Druhá analýza byla provedena pro všechny rostliny na všech lokalitách, ale jen se znaky, které charakterizují květ (výška a šířka vnitřních a vnějších okvětních lístků, rozdíl mezi výškou blizny a prašníků a délka prašníků).

4.3.2 Velikost genomu

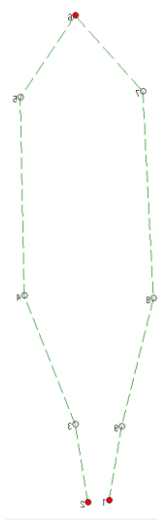
Z histogramů z cytometrické analýzy byla následně vypočítána velikost genomu pro jednotlivé rostliny. V programu „R“ (R Development Core, 2011) byly vytvořeny boxploty, které ukazují variabilitu ve velikosti genomu u různých druhů na všech lokalitách. Dále byla testována, Kruskal-Wallis testem, závislost velikosti genomu jednotlivých rostlin na druhu a lokalitě. Tento test byl zvolen, protože data neměla normální rozdělení.

4.3.3 Morfometrika okvětních lístků

K morfometrické analýze okvětních lístků byl použit TPS software (dostupný na adrese: <http://life.bio.sunysb.edu/morph>). Pomocí tpsDig 2.16 byly označeny všechny landmarky u všech obrázků okvětních lístků – těch bylo vždy 9 (obr. 3). Dále za použití tpsUtil 32 byly rozděleny na landmarky a semilandmarky (obr. 4). Prokrustovská analýza, neboli přiložení všech lístků na sebe dle pevně daných landmarků jsem provedla pomocí tpsRelw 1.49. Vzniklý dataset byl analyzován v programu PAST a byla provedena PCA ordinační analýza a zobrazen XY plot.



Obrázek 3) Označení všech landmarků za pomoci programu tpsDig. 2. 16.



Obrázek 4) Rozdělení všech landmarků na semilandmarky (prázdná kolečka) a landmarky (červená plná kolečka) za pomoci programu tpsUtil 32.

5 Výsledky

Na jaře 2016 bylo navštíveno celkem 20 lokalit druhu *C. vernus*, *C. heuffelianus* a *C. tommasinianus*. Pro morfologické a morfometrické analýzy bylo změřeno 217 rostlin, a pomocí průtokové cytometrie bylo celkem zanalyzováno 227 rostlin.

5.1 Morfologie

Na morfologickou analýzu bylo použito celkem 133 rostlin druhu *C. vernus*, 42 rostlin druhu *C. heuffelianus*, 15 rostlin druhu *C. tommasinianus* a 27 blíže neurčitelných rostlin označovaných zde jako *C. vernus* agg., u kterých bylo měřeno/zjišťováno celkem 13 znaků. Tato data neměla normální rozdělení a nejvíce korelované znaky byly: celková výška rostliny, délka listu, výška stonku a výška nadzemní části rostliny; pouze ze znaků květu to byly pak výška okvětního lístku vnějšího i vnitřního a rozdíl mezi výškou blizny a prašníků.

Popisné statistiky jsou uvedeny v tabulce 2, graficky znázorněny jsou pomocí boxplotů v příloze 3. Průměrné naměřené hodnoty morfologických znaků na všech lokalitách jsou uvedeny v příloze 4.

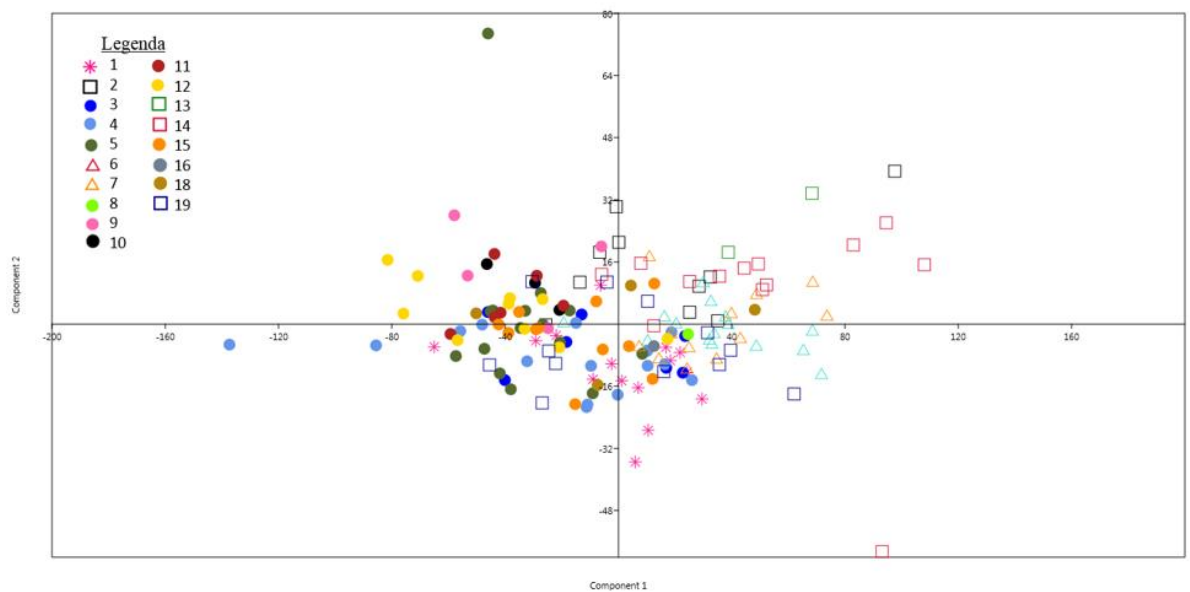
Tabulka 2) Průměrné hodnoty všech měřených morfologických znaků v milimetrech u jednotlivých druhů na všech lokalitách dohromady.

Morfologické znaky (mm)	<i>C. vernus</i>	<i>C. heuffelianus</i>	<i>C. vernus</i> agg.	<i>C. tommasinianus</i>
výška nadzemní části	65, 0504 ± 10, 9117	87, 125 ± 19, 6079	83, 8889 ± 13, 18	76 ± 7, 3679
celková výška rostliny	125, 519 ± 20, 311	152, 794 ± 24, 2543	160, 12 ± 14, 2896	130, 8 ± 13, 8935
výška cibule	8, 2857 ± 1, 6372	9, 1176 ± 2, 0709	10, 68 ± 1, 0693	10, 7333 ± 1, 9074
výška stonku	87, 236 ± 21, 436	103, 7647 ± 26, 599	108, 96 ± 11, 9842	91, 0667 ± 14, 053
výška okvětních lístků vnějších	29, 243 ± 3, 2779	38, 3314 ± 4, 7438	38, 716 ± 9, 1924	29, 1462 ± 2, 2228
výška okvětních lístků vnitřních	25, 643 ± 3, 1508	34, 3941 ± 3, 8243	33, 408 ± 5, 4845	27, 2154 ± 1, 1437
šířka okvětních lístků vnějších	8, 8423 ± 1, 7549	11, 2114 ± 1, 696	14, 44 ± 4, 1981	10, 0692 ± 1, 6002
šířka okvětních lístků vnitřních	7, 5818 ± 1, 3148	10, 8412 ± 2, 0074	12, 948 ± 4, 7058	10, 6231 ± 1, 2084
rozdíl mezi výškou blizny a prašníků	(-7, 5289) ± 3, 0986	4, 3611 ± 4, 1414	(-2) ± 3, 1091	(-0, 4667) ± 1, 126
délka prašníků	9, 5882 ± 2, 5359	11, 5135 ± 2, 3993	13, 24 ± 2, 9195	11, 0667 ± 1, 3870
počet listů	2, 717 ± 0, 7400	2, 8684 ± 0, 4140	2, 8 ± 0, 4082	27, 375 ± 0, 6172
délka listů	91, 3333 ± 23, 6156	111 ± 24, 5033	120, 68 ± 14, 2762	112, 8 ± 18, 253
šířka listů	2, 25 ± 0, 7079	2, 8649 ± 0, 8135	2, 5 ± 0, 7071	2, 2 ± 0, 4140

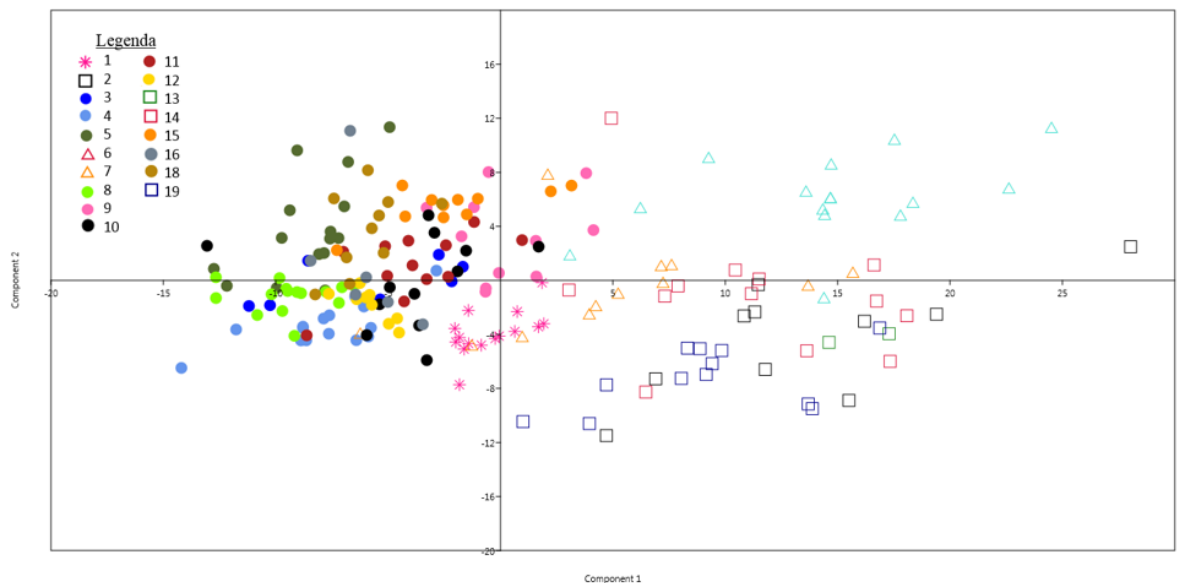
Výsledky analýzy hlavních komponent (PCA) celkového souboru dat ukazují určitou strukturu, zejména částečné oddělení *C. vernus* a *C. heuffelianus* podle první

osy (obr. 5). Celkově první tři komponentní osy vysvětlily 94,12 % variability (1. osa vysvětlila 77,87%, 2. osa 9,52 % a 3. osa 6,76 %). Lepší oddělení jednotlivých druhů pak ukazují výsledky PCA na základě omezeného souboru znaků (pouze znaky květu; obr. 6). Podle 1. osy je jasně oddělen *C. vernus* od dvojice *C. heuffelianus* a *C. vernus* agg., podle 2. osy se pak dělí *C. heuffelianus* a *C. vernus* agg. První tři osy v tomto případě vysvětlily 92,61 % variability (1. osa vysvětlila 67,5 %, 2. osa 18,24 % a 3. osa 6,87%). Nejdůležitější znaky oddělující druhy podle první osy jsou výška a šířka vnitřních a vnějších okvětních lístků a také délka prašníků; s druhou osou nejvíce souvisí rozdíl výšky prašníků a blizen. Rozdíly mezi populacemi nejsou znatelné. Na obrázku 7 a 8 vidíme nepřímé ordinační analýzy DA (discriminant analysis), které jsou klasifikovány dle nezávislého kritéria velikost genomu. Z těchto analýz je zřetelně vidět druhová odlišnost. Obrázek 7 zobrazuje analýzu dle všech morfologických znaků a jsou zde zřetelné rozdíly mezi druhy, ne však rozdíly mezi jednotlivými populacemi. Analýza pod obrázkem 8 zahrnuje jen morfologické znaky květu, a zde jsou slabě viditelné i rozdíly mezi populacemi druhu *C. vernus* a *C. vernus* agg. V tabulkách 3 a 4 jsou vyznačeny vždy tři nejvíce korelované znaky pro tyto analýzy. Další zásadní věcí, kterou v těchto grafem pozorujeme (lépe viditelnější v DA analýzách) je, že populace druhu *C. tommasinianus* se liší od ostatních. Potvrzuje to tedy výskyt druhu pro Českou republiku, a to v Babiččině údolí.

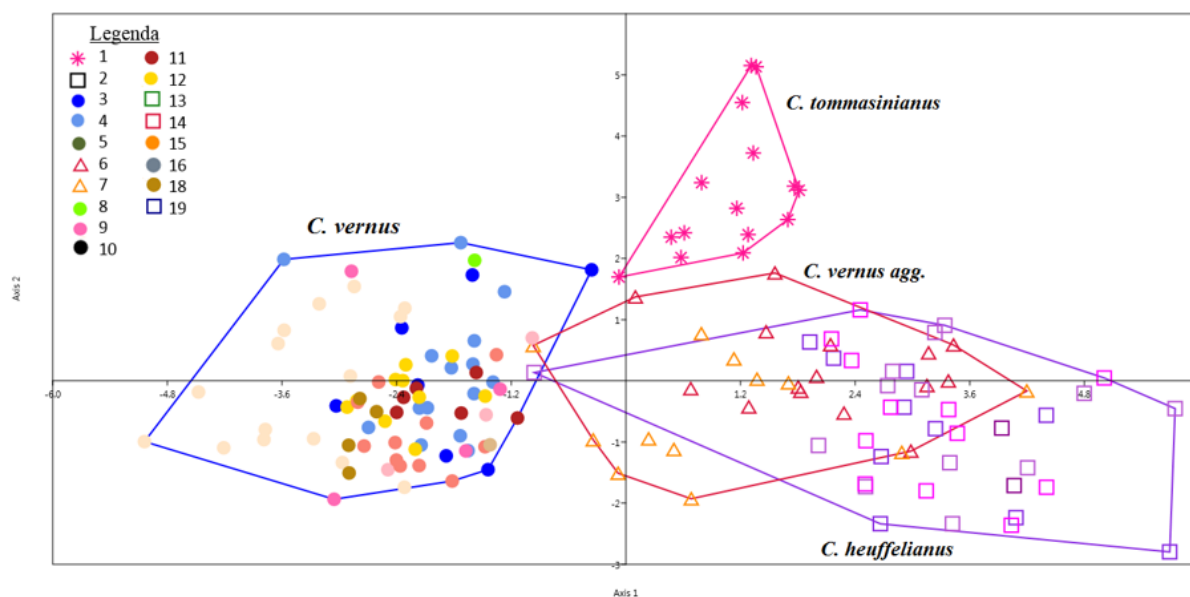
Hlavními znaky odlišujícími jednotlivé taxony jsou tedy výška rostliny (jak celková, tak pouze nadzemní nebo výška stonku – koreluje spolu), délka listu a hlavně morfologické znaky květu: rozdíl mezi výškou blizny a prašníků, rozměry okvětních lístků (výška ale i šířka vnitřních i vnějších) a také délka prašníků.



Obrázek 5) PCA 1 – podobnost rostlin na lokalitách dle všech 13 kvantitavních proměnných (výška nadzemní části, celková výška rostliny, výška hlízy, výška stonku, výška a šířka vnitřních a vnějších okvětních lístků, délka tyčinek, rozdíl mezi výškou tyčinek a vrcholem blizen, délka a šířka listů a počet listů). Kolečka znázorňují *C. vernus*, čtverečky *C. heuffelianus*, trojúhelníčky rostliny označované jako *C. vernus* agg. a hvězdičky *C. tommasinianus*. Různé barvy vyjadřují odlišné lokality – viz legenda.



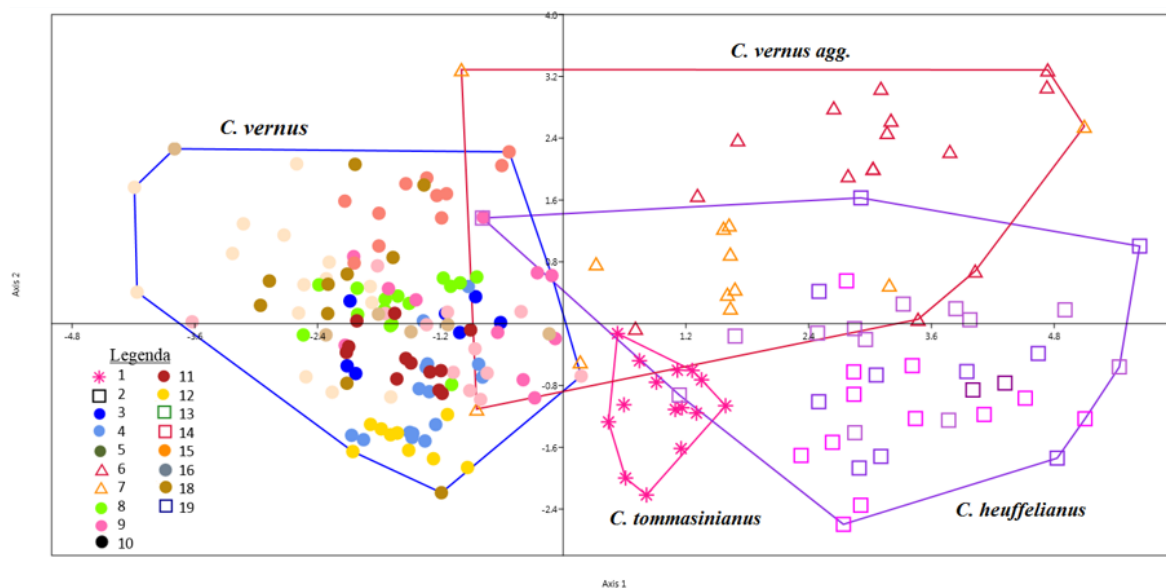
Obrázek 6) PCA 2 – podobnost rostlin a lokalit dle znaků charakterizujících pouze květ (výška a šířka vnitřních a vnějších okvětních lístků, rozdíl mezi výškou blizny a prašníků a délka prašníků). Kolečka znázorňují *C. vernus*, čtverečky *C. heuffelianus*, trojúhelníčky rostliny označované jako *C. vernus* agg. a hvězdičky *C. tommasinianus*. Různé barvy vyjadřují odlišné lokality – viz legenda.



Obrázek 7) DA 1 – podobnost rostlin a lokalit dle všech 13 kvantitavních proměnných (výška nadzemní části, celková výška rostliny, výška hlízy, výška stonku, výška a šířka vnitřních a vnějších okvětních lístků, délka tyčinek, rozdíl mezi výškou tyčinek a vrcholem blizen, délka a šířka listů a počet listů), klasifikováno dle nezávislého kritéria druh šafránu. Kolečka znázorňují *C. vernus*, čtverečky *C. heuffelianus*, trojúhelníčky rostliny označované jako *C. vernus agg.* a hvězdičky *C. tommasinianus*. Různé barvy vyjadřují odlišné lokality – viz legenda.

Tabulka 3) Kanonické korelační koeficienty s osou 1, 2 a 3 u DA analýzy podobnosti rostlin a lokalit dle všech 13 kvantitavních proměnných (výška nadzemní části, celková výška rostliny, výška cibule, výška stonku, výška a šířka vnitřních a vnějších okvětních lístků, délka tyčinek, rozdíl mezi výškou tyčinek a vrcholem blizen, délku a šířku listů a počet listů). Zvýrazněny jsou tři hodnoty s nejvyššími absolutními korelacemi.

Měřený znak	Osa 1	Osa 2	Osa 3
výška nadzemní části	3, 2271	-2, 8831	7, 6699
celková výška rostliny	5, 9558	-0, 5884	7, 6215
délka cibule	0, 2687	0, 7584	0, 3288
výška stonku	4, 4284	0, 3253	4, 6608
výška vnějšího okvětního lístku	1, 7478	-0, 8279	2, 2376
výška vnitřního okvětního lístku	1, 6283	-0, 5646	1, 3135
šířka vnějšího okvětního lístku	0, 7781	0, 6287	1, 6919
šířka vnitřního okvětního lístku	0, 8756	0, 7963	1, 0349
rozdíl mezi výškou blizny a prašníků	2, 0461	-0, 3313	-1, 5806
délka prašníku	0, 5671	0, 4551	0, 8349
počet listů	0, 0539	0, 1487	-0, 1199
délka listu	5, 3121	4, 8844	3, 569
šířka listu	0, 1286	-0, 0707	0, 1201



Obrázek 8) DA 2 – podobnost rostlin a lokalit dle znaků charakterizujících okvěti (výška a šířka vnitřních a vnějších okvětních lístků, rozdíl mezi výškou blizny a prašníků a délka prašníků). Klasifikováno dle nezávislého kritéria druh šafránu. Kolečka znázorňují *C. vernus*, čtverečky *C. heuffelianus*, trojúhelníčky rostliny označované jako *C. vernus agg.* a hvězdičky *C. tommasinianus*. Různé barvy vyjadřují odlišné lokality – viz legenda.

Tabulka 4) Kanonické korelační koeficienty s osou 1, 2 a 3 u DA analýzy podobnosti rostlin a lokalit dle znaků charakterizujících okvěti (výška a šířka vnitřních a vnějších okvětních lístků, rozdíl mezi výškou blizny a prašníků a délka prašníků). Zvýrazněny jsou tři hodnoty s nejvyššími absolutními korelacemi.

Měřený znak	Osa 1	Osa 2	Osa 3
výška vnějšího okvětního lístku	1, 9099	1, 8994	-1, 822
výška vnitřního okvětního lístku	1, 7743	1, 0368	-1, 1878
šířka vnějšího okvětního lístku	0, 7991	1, 7349	0, 6793
šířka vnitřního okvětního lístku	0, 9283	1, 1043	1, 1314
rozdíl mezi výškou blizny a prašníků	2, 1364	-1, 8647	-0, 2661
délka prašníku	0, 561	0, 86398	0, 5506


Tabulka 5 je věnována charakteristice květů (barva, tvar, počet) na všech lokalitách. Obecně platí, že *C. heuffelianus* byl vždy tmavě fialový s květní trubkou buď také fialovou, nebo bílou. Barva byla buď jednolitá v jednom odstínu, nebo v sebe přecházelo více odstínů fialové. Někdy barva z okvětní trubky vybíhala vzhůru do květu a tvořila mezi barvami plynulý přechod, ne ostrou hranici. Ani na jedné dvojici lokalit však *C. heuffelianus* nebyl barevně totožný, nejpodobnější si byly rostliny z Malé Úpy (13) a z Luisina údolí (19). Ani *C. vernus* se nenacházel na dvou lokalitách barevně totožný. Vyskytoval se v barvách bílé až fialové, spíše světlejší (ne tak tmavá jako u *C. heuffelianus*). Někdy byly okvětní lístky (cípy) fialově žilkované nebo s bílými okraji. Stejných barev nabývala i okvětní trubka. Barvené

přechody byly ostře ohraničené, barvy mezi sebou nesplyvaly. Rostliny označované jako *C. vernus* agg. měly nejrůznější kombinace barev od bílé, přes žilkování až po fialovou. Na lokalitě Kytlice (7) byly i rostliny ve výrazně fialové barvě. Těchto pár jedinců vypadalo barevně spíš jako *C. tommasinianus*. Ten se však vyskytuje jen na jedné lokalitě (1 – Babiččino údolí). Jeho barva je velmi specifická. Popsala bych ji jako světle fialovo-fuchsiovou. Tuto barvu neměly všechny rostliny, některé byly pouze světle fialové. Okvětní cípy druhu *C. tommasinianus* byly na vrcholu jak špičaté, tak zaokrouhlené. Obecně se ale tato proměnlivost ve tvaru vrcholu cípů projevila u všech rostlin bez ohledu na druh. Výjimkou je lokalita Šafránová stráž (8), kde měly cípy specifický tvar, proto jsem tvar do tabulky raději načrtl. Dále bylo zjištěno, že jak *C. vernus*, *C. heuffelianus*, tak i *C. tommasinianus* může mít jeden až dva květy. Na lokalitě PP Strážný Pod obecním lesem (18) měl *C. vernus* květy dokonce tři.

Fotografie všech typů květů rostlin, ze všech lokalit, jsou uvedeny v příloze 5.

Tabulka 5) Charakteristika květů (barva, tvar, počet) na všech lokalitách.

Číslo	Název	Druh	Popis barvy	Tvar cípů	Poč. květ.na 1 rostl.	Jedinečnost populace
1	Babiččino údolí	<i>C. tommasinianus</i>	2 typy barev: 1) fialová barva, ta je sytější u vrcholů okvětních lístků a směrem dolů se zesvětluje, až přechází v bílou, 2) tmavě fialová-fuchsiová, z rubu výrazně tmavá a uvnitř květu světlejší.	2 typy: zaokrouhlené a špičaté.	1 nebo 2	Fuchsiová barva.
2	PP Zubří	<i>C. heuffelianus</i>	Světle fialová s výraznou tmavě fialovou kresbou v horní části okvětních lístků, ve tvaru „V“; někdy kresba pokračuje tenkou linií od vrcholu „V“ kresby směrem dolů ke květní stopce, která je také tmavě fialově zbarvena.	Cípy jsou zaokrouhlené a před odkvětem bývají rozštěpené.	1	Kresba ve tvaru "V".
3	PP Lačnov	<i>C. vernus</i>	Světlá až tmavě fialová s bílými vršky květních cípů. Fialová v bílou nepřechází plynule, ale jakýmsi „zoubky“.	Zaokrouhlené s nepatrnou špičkou ve vrcholu.	1	Zoubkovaný přechod mezi fialovou a bílou barvou.
4	PP Sucháckovy paseky	<i>C. vernus</i>	Stejně jako v PP Lačnov. Rozdílem může být více bílé barvy u některých jedinců - často bílá lemuje celý květní cíp. Na přechodu fialové a bílé jsou také „zoubky“, které tedy vytváří zubovitou podélnou linii téměř po celém lístku.	Mírně do špičky.	1	Zoubkovaný přechod mezi fialovou a bílou barvou podél celého okraje lístku.
5	PP Za lesem	<i>C. vernus</i>	Bílá barva - čistě bílá i stopka.	Zaokrouhlené.	1 nebo 2	Pouze bílá.
6	PP Lukášov	<i>C. vernus</i> agg.	3 typy: 1) bílá s tmavou fialovou (zubatě žíhlé) u květní stopky a květní stopkou, 2) jen fialová - světle fialový květ a tmavou květní stopku, 3) žíhaná různou sytostí fialové na bílém podkladu; žíhaný jsou podélně, většinou s větvením, mohou mít buď jen 1–3 proužky na bílém podkladu, nebo celou fialovou "síť"; květní stopku mají také tmavě fialovou, i ústí okvětních lístků (zubatě žíhlé); tmavá květní stopka je společná pro úplně všechny jedince.	Jejich květy jsou bez špičky a jsou zaokrouhlené.	1	Zřetelně pruhované žíhání v mnoha typech.

Číslo	Název	Druh	Popis barvy	Tvar cípů	Poč. květ.na 1 rostl.	Jedinečnost populace
7	PP Kytlice	<i>C. vernus</i> agg.	Barva stejná jako v PP Lukášov – rostliny fialově proužkované s bílým podkladem, chybí však rostliny zcela bílé a zcela světle fialové. Místo nich se nám tu objevilo pár jedinců ve výrazné fialové barvě a s ostře špičatými cípy. Žihání jedinci mohou mít také špičaté cípy. Tmavě fialová báze květu vyběhá většinou výš než u rostlin z PP Lukášov.	Všechny rostliny špičaté, výrazně fialové rostliny ostře špičaté.	1	Byly nalezeny také rostliny, které měly rozdílné vnitřní a vnější okvětní lístky. Ty se buď lišily jen barvou, nebo i velikostí. Pokud byly rozlišené i velikostí, tak vnitřní lístky byly menší. Vnitřní lístky byly světlejší, což znamená méně fialových žilek na bílém podkladu. Vnější byly více fialové, někdy skoro úplně, jen s bílým lemem kolem okraje. Někdy se barvou lišily i z rubu, ale jen málo - spíše světlostí nebo počtem žilek.
8	PP Šafránová stráž	<i>C. vernus</i>	Světle fialová – občas až lehce do modra. Při bázi kalichu je tmavší fialová, která plynule směrem nahoru přechází ve světle fialovou. Zevnitř květu jsou ještě světlejší, občas skoro bílé. Cípy okvětních lístků jsou zvláště zašpičatělé a prohnuté.		1	Specifický tvar cípů, které jsou lžícovitě prohnuté. Barva může být i lehce do modra.
9	Hrochova louka	<i>C. vernus</i>	3 typy: 1) světle fialová, 2) bílá, 3); větle fialové rostliny – téměř bílé, nebo rostliny jemně žíhané světle fialovou, ne však v proužcích; všechny rostliny byly s tmavě fialovou až lehce fuchsiovou bází květních lístků.	Špičaté i zaokrouhlené.	1	Fialová báze okvětních lístků vyběhá nejvýrazněji nahoru směrem k vrcholu a na konci se třepí.
10	U Dána	<i>C. vernus</i>	3 typy dle barvy: 1) tmavá fialová; 2) bílá, 3) světle fialové žíhaná, kde žíhání plynule přechází do bílé (není ostré); více žíhané byly vnitřní okvětní lístky; tmavě fialová barva u báze květu, která vyběhá po okvětních lístcích vzhůru. U tmavě fialových jedinců je přechod plynulý a není moc zřetelný.	Špičaté i zaokrouhlené.	1	Plynulý přechod bílé a fialové barvy žíhání.
11	U Čerta	<i>C. vernus</i>	2 typy barev: 1) středně tmavě fialová, 2) bílá; oba typy mají tmavě fialovou až lehce fuchsiovou barvu v bázi květu, také u tmavě fialových rostlin je jiná barva v bázi dobře viditelná, neboť je to zcela odlišná barva – nesplyvá tedy; mezi vyběhajícími pruhy je lístek téměř bílý, což barvu ještě zvýrazňuje.	Úzké, dlouhé a špičaté se zřetelnou mezerou mezi nimi až k bázi	1 nebo 2	2 typy fialové barvy na jedné rostlině. Zřetelná mezera mezi okvětními lístky.
12	Dolní Albeřice	<i>C. vernus</i>	Bílé rostliny dvou typů: 1) čistě bílá - i květní stopka, 2) květní stopka je tmavě fialová s výběžky této barvy do květních lístků.	Zakončeny tupě, mohou mít ale i špičku nebo zaokrouhlení	1	2 typy bílých rostlin.

Číslo	Název	Druh	Popis barvy	Tvar cípů	Poč. květ.na 1 rostl.	Jedinečnost populace
13	Malá Úpa	<i>C. vernus</i> <i>C. heuffelianus</i>	<i>C. vernus</i> ve 2 formách: 1) bílá, 2) světle fialová; obě formy mají tmavě fialovou až fuchsiovou květní stopku s výběžky této barvy do okvětních lístků; <i>C. heuffelianus</i> je tmavě fialový, má tmavě fialovou až fuchsiovou květní stopku s výběžky do okvětních lístků.	Špičaté	1	2 druhy (<i>C. vernus</i> , <i>C. heuffelianus</i>) a 3 typy barev.
14	Polsko	<i>C. heuffelianus</i>	Odstíny fialové, květní stopka tmavě fialová v horní části a bílá ve 2 spodních třetinách; fialové vyběhá vzhůru do okvětních lístků.	Špičaté i zaokrouhlené.	1	Květní stopka fialovo – bílá.
15	Anenské údolí	<i>C. vernus</i>	Bílá. Někteří jedinci mají světle fialové proužky na rozhraní mezi květní trubkou a bází okvětních lístků.	Špičaté.	1	
16	PP Vyšný - Křišťanov	<i>C. vernus</i>	Bílá. Některé rostliny zcela bílé a některé s nafialovělou (nebo je pár světlých proužků) květní stopku s bází okvětních lístků.	Zaokrouhlené.	1	
17	Strážný - Pod hájovnou	<i>C. heuffelianus</i>	Tmavě fialová se světlejší květní stopkou, tento přechod v barvách je plynulý.	Zaokrouhlené.	1	
18	PP Strážný - Pod Obecním lesem	<i>C. vernus</i>	3 typy barev: 1) bílá, 2) bílá s pouze nafialovělou květní stopkou (buď celá vybarvená, nebo jen s proužky), 3) světle fialově žíhané okvětní lístky, ne však v oddělených proužcích, ale jakoby byl střed lístku po celé délce natřen rozřepeným štětcem; květní stopka je žíhaná stejně; lemy jsou bílé.	Cípy jsou téměř na většině rostlin výrazně zaokrouhlené.	1, 2 nebo 3	Květy jsou na některých rostlinách téměř průsvitné, okvětní lístky jsou slabé.
19	Luisino údolí	<i>C. heuffelianus</i>	Odstíny tmavší fialové s bílými až světle fialovými květními stopkami. Barvy v sebe plynule přecházejí	Cípy jsou zakončeny mírnou špičkou.	1 nebo 2	

5.2 Velikost genomu

a) Velikost genomu byla zjištěna u 139 rostlin z 12 populací (lokalit) druhu *C. vernus* (tab. 6). Velikost genomu *C. vernus* se pohybuje od 4, 7286 do 5, 0328 pg (průměr ± SD: 4, 864 ± 0, 0953). Rozdíly mezi populacemi nebyly zjištěny, variabilita v rámci populací je velmi malá. Tato velikost genomu odpovídá chromozomovému číslu 2n=8 (Chrtek, 2010).

Tabulka 6) Průměrná velikost genomu v pikogramech na všech zkoumaných lokalitách *C. vernus*. Uvedena je také směrodatná odchylka a rozpětí pomocí minima a maxima.

<i>C. vernus</i>		
Lokalita (její číslo)	2C (pg) (průměr ± SD)	Rozpětí (min. - max.) (pg)
PP Lačnov (3)	4, 7599 ± 0, 0340	4, 7286 – 4, 8063
PP Sucháčkovy paseky (4)	4, 7293 ± 0, 0212	4, 7016 – 4, 7557
PP Za lesem (5)	4, 7810 ± 0, 0339	4, 7252 – 4, 8300
PP Šafránová stráň (8)	4, 8892 ± 0, 0483	4, 8469 – 4, 9584
Hrochova louka (9)	4, 9706 ± 0, 0350	4, 9179 – 5, 0024
U Dána (10)	4, 9469 ± 0, 0350	4, 9010 – 4, 9990
U Čerta (11)	4, 9111 ± 0, 0366	4, 8706 – 4, 9618
Dolní Albeřice (12)	4, 8726 ± 0, 0292	4, 8402 – 4, 9078
Malá Úpa (13)	5, 0091 ± 0, 0335	4, 9855 – 5, 0328
Anenské údolí (15)	4, 8429 ± 0, 0207	4, 8165 – 4, 8638
PP Vyšný - Křišťanov (16)	4, 8596 ± 0, 0578	4, 7996 – 4, 9381
PP Strážný - Pod Obecním lesem (18)	5, 0016 ± 0, 0347	4, 9550 – 5, 0328

b) Velikost genomu byla zjištěna u 45 rostlin z 5 populací (lokalit) druhu *C. heuffelianus*. V rámci tohoto druhu byly zjištěny rozdíly ve velikosti genomu mezi rostlinami z karpatské části Moravy (2), z Orlických hor (19) a ze Strážného na Šumavě (17) na jedné straně a rostlinami z polské i české strany Krkonoš (pop. 13, 14) na druhé straně. První skupina má průměrnou velikost genomu 11, 52 ± 0, 111 pg (bílá pole), druhá má průměr 10, 785 ± 0, 329 pg (šedá pole). Velikosti genomu rostlin *C. heuffelianus* vidíme v tabulce 7.

Tabulka 7) Průměrná velikost genomu v pikogramech na všech lokalitách s výskytem *C. heuffelianus*. Uvedena je také směrodatná odchylka a rozpětí pomocí minima a maxima.

<i>C. heuffelianus</i>		
Lokalita (její číslo)	2C (pg) (průměr ± SD)	Rozpětí (min.-max.) (pg)
PP Zubří (2)	11, 4453 ± 0, 0659	11, 4109 - 11, 5630
Malá Úpa (13)	10, 9275 ± 0, 3304	10, 5591 - 11, 3534
Polsko (14)	10, 6420 ± 0, 2988	10, 2046 - 10, 8802
Strážný - Pod hájovnou (17)	11, 5873 ± 0, 1760	11, 4311 - 11, 8030
Luisino údolí (19)	11, 5460 ± 0, 0333	11, 5089 - 11, 5832

c) Na lokalitě 13 byly tedy dle tabulek výše (6 a 7), jak jedinci *C. vernus*, tak *C. heuffelianus*. V tabulce 8 je uvedena variabilita ve velikosti genomu na této lokalitě. První dvě rostliny odpovídají morfologicky druhu *C. vernus*, ostatní druhu *C. heuffelianus*.







Tabulka 8) Variabilita velikosti genomu v pikogramech na lokalitě v Malé Úpě (13).

<i>C. heuffelianus</i> (H) + <i>C. vernus</i> (V)	
Malá Úpa (13)	
Rostlina a její barva	2C (pg)
bílá (V)	4, 9855
bílý směsný vzorek (V)	5, 0328
fialovorůžová 13,14 (F)	10, 5591
fialovorůžová 13 (F)	10, 9647
světlefialově žíhaná (F)	10, 8329
světlefialově žíhaná – směsný vzorek (F)	11, 3534

d) Velikost genomu byla zjištěna u 15 rostlin z jedné populace druhu *C. tommasinianus*. V tabulce 9 vidíme velikosti genomu jednotlivých rostlin s jejich kódem barvy květu (obr. 9). Velikost genomu je značně proměnlivá a pohybuje se v rozmezí 4, 732–9, 0651 pg (průměr ± SD: 7, 1425 ± 1, 6719). Je to první objevená lokalita *C. tommasinianus* v České republice.

Tabulka 9) Velikost genomu v pikogramech na lokalitě s výskytem *C. tommasinianus*.

<i>C. tommasinianus</i> - Babiččino údolí (1)	
Číslo rostliny + hexa kód barvy květu	2C (pg)
1 - BA55D3	6, 5301
2 - BA55D3	4, 7320
3 - EE82EE	8, 1526
1 - 5 (BA55D3, EE82EE, DDA0DD, DA70D6)	8, 4263
6 - 10 (9966CC, 8A2BE2, DDA0DD)	9, 0651
11 - 15 (BA55D3, DA70D6)	5, 9488

	8A2BE2
	9966CC
	BA55D3
	DA70D6
	DDA0DD
	EE82EE

Obrázek 9) Vzorník barev s hexa kódy (klikzone.cz, 2017).

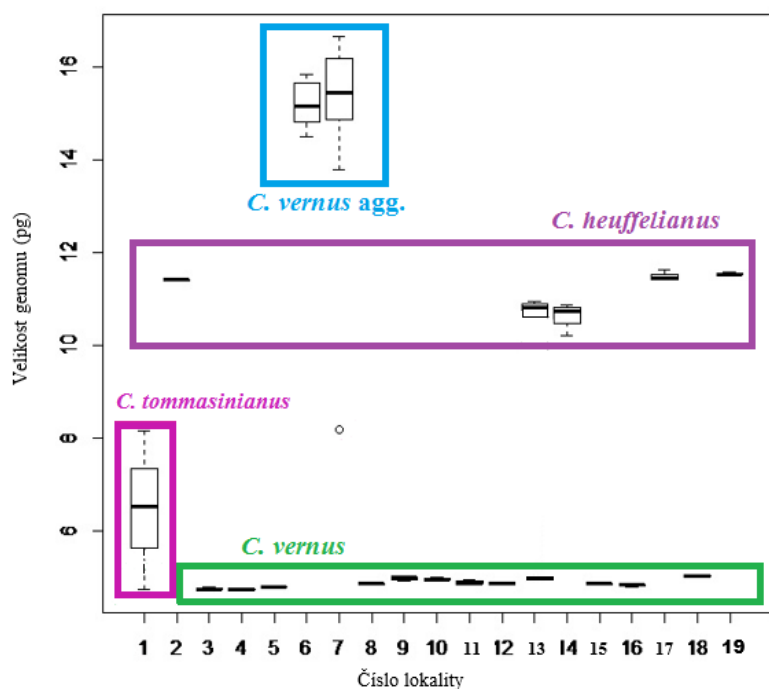
e) Velikost genomu byla zjištěna u 27 rostlin ze dvou populací do přírody vysazených zřejmě zahradních vyšlechtěných rostlin z okruhu *C. vernus*. V tabulce 10 vidíme značné rozdíly ve velikosti genomu mezi jednotlivými rostlinami. Velikost genomu na lokalitě 6 se pohybuje v rozmezí 14, 517–15, 683 pg (průměr ± SD: 15, 23 ± 0, 42), na lokalitě 7 je to 8, 190–16, 660 pg (průměr ± SD: 14,987 ± 1,964).

Tabulka 10) Velikost genomu v pikogramech na lokalitách s výskytem *C. vernus* agg.

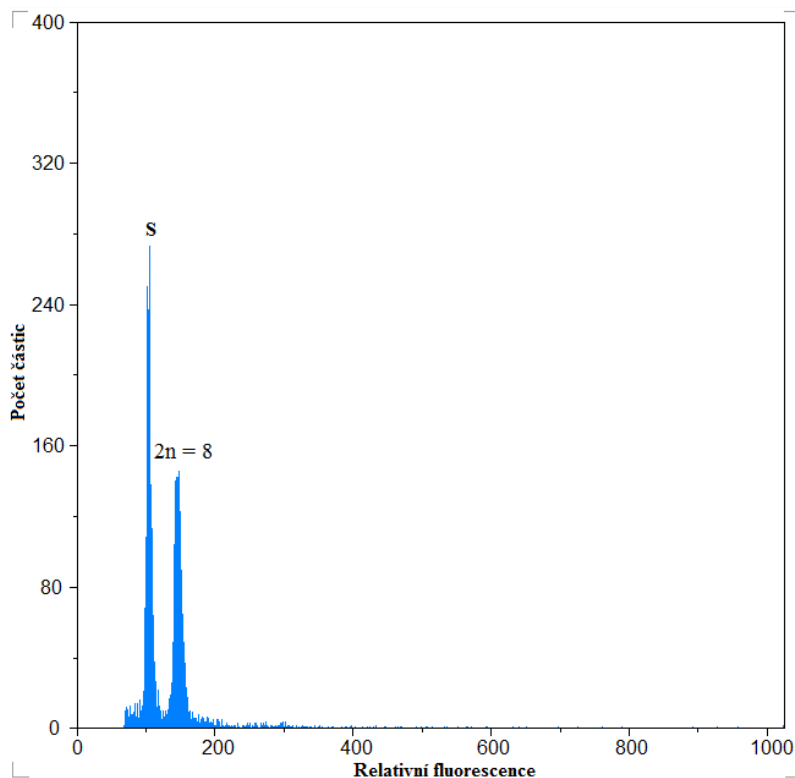
<i>C. vernus</i> agg.			
PP Lukášov (6)		PP Kytlice (7)	
číslo rostliny	Velikost genomu	číslo rostliny	Velikost genomu
1	14, 9531	1	16, 6566
1 - 6	15, 0613	2	16, 2037
2	14, 8314	3	16, 6195
3	15, 2911	4	16, 6600
7	14, 8416	5	14, 9024
7 - 13	15, 4432	6	15, 7204
8	15, 6460	7	15, 5210
9	15, 6832	8	15, 4973
10	15, 0309	9	15 4331
11	15, 6798	10	14, 8720
12	14, 5171	11	13, 8073
13	15, 8623	12	14, 8585
14	15, 6528	13	8, 1897
15	14, 7943	14	15, 1492
		1 - 6	15, 6494
		7-12	13, 4727
			15, 5649

Testování závislosti velikosti genomu na druhu a lokalitě vyšlo statisticky průkazně. Znamená to tedy, že velikost genomu šafránů je závislá na druhu ($p=2, 047^{-12}$) i na lokalitě ($p=7,837^{-8}$), kde se nachází. Obrázek 10 zobrazuje boxploty velikostí genomů na jednotlivých lokalitách. V tomto grafu můžeme vidět závislost velikosti genomu na druhu, protože jsou zde zřetelně oddělené 4 horizontální linie – druhy (barevně). Nejníž v grafu leží *C. vernus* (zelený rámeček) s nejmenší velikostí genomu ($4, 881 \pm 0, 092$ pg). Velmi dobře to odpovídá morfologii, *C. vernus* se nachází na lokalitách PP Lačnov (3), PP Sucháčkovy paseky (4), PP Za lesem (5), PP Šafránová stráž (8), Hrochova louka (9), U Dána (10), U Čerta (11), Dolní Albeřice (12), Anenské údolí (15), PP Vyšný - Křišťanov (16) a PP Strážný - Pod Obecním lesem (18). Podobnou velikost genomu má i jedna rostlina z lokality Babiččino údolí (1), morfologicky odpovídající druhu *C. tommasinianus*, a dvě rostliny *C. vernus* ze smíšené populace s *C. heuffelianus* z lokality Malá Úpa (13) o velikosti genomu 4,986 a 5,033 pg. Na obrázku 11 vidíme histogram relativní velikosti genomu pro *C. vernus* na těchto lokalitách. S větším genomem ($7,142 \pm 1,672$) v „růžové linii“

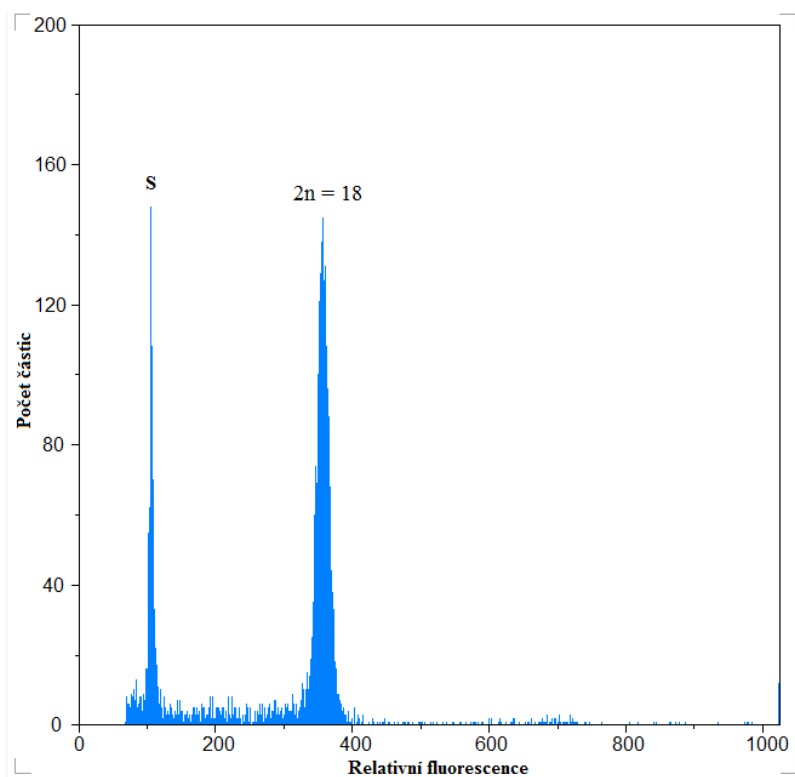
(obr. 10) leží *C. tommasinianus* na lokalitě Babiččino údolí. Jeho genom má velké rozpětí. Histogram relativní velikosti genomu *C. tommasinianus* vidíme na obrázku 15. Lokality s druhem *C. heuffelianus*, kterými jsou lokality PP Zubří (2), Malá Úpa (13), Strážný - Pod Hájovnou (17) a Luisino údolí (19) leží ve fialové linii a mají vyšší velikost genomu než *C. vernus* i než *C. tommasinianus*. Tento druh se ještě dělí na rostliny z PP Zubří (2), ze Strážného - Pod Hájovnou (17) a z Luisina údolí (19) mající velikost genomu průměrně 11,431–11,803 pg (průměr ± SD: 11,556 ± 0,09; histogram relativní velikosti genomu je na obrázku 12) a na rostliny v Polsku (14) mající velikost genomu průměrně 10,642 ± 0,299 pg (histogram relativní velikosti genomu je na obrázku 13). Rostliny druhu *C. heuffelianus* v Malé Úpě (13) mají velikost genomu průměrně 10,928 pg. Na této lokalitě jsou tedy dva druhy šafránů. Histogram relativní velikosti *C. vernus* a *C. heuffelianus* pro tuto lokalitu zobrazuje obrázek 14 a je to jediná lokalita, na které se vykytují 2 druhy zároveň. Nejvýše na obrázku 10 vidíme boxploty *C. vernus* agg. (v modrém rámečku) na lokalitách PP Lukášov (6) a PP Kytlice (7). Tyto zahradní kultivary šafránů mají velké rozpětí ve velikosti genomu. Na lokalitě Kytlice se nachází také jedna rostlina s velikostí genomu 8,1897 pg, což odpovídá druhu *C. tommasinianus*. Variabilitu relativní velikosti genomu lokality Lukášov vidíme na obrázku 16 a lokality Kytlice na obrázku 17 a 18.



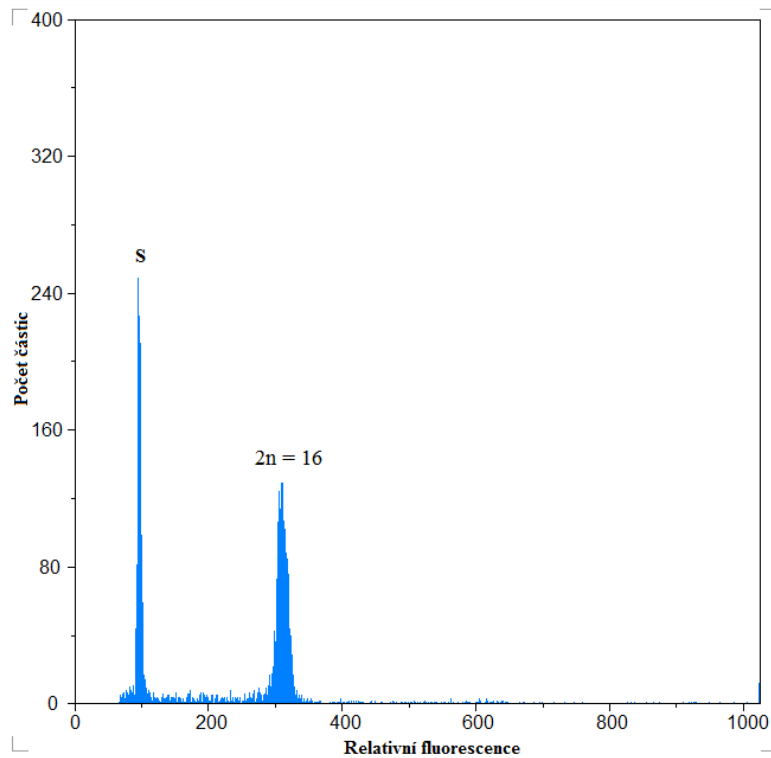
Obrázek 10) Boxplot popisující vztah velikosti genomu (druhu šafránu), v pikogramech, a lokalit. Zeleně je vyznačen *C. vernus*, fialově *C. heuffelianus*, modře *C. vernus* agg. a růžově *C. tommasinianus*. Krabice znázorňují kvartily, tlustá čárka značí medián, vousy s úsečkami jsou extrémní hodnoty (minima a maxima) a prázdný jednotlivý bod značí odlehlou hodnotu.



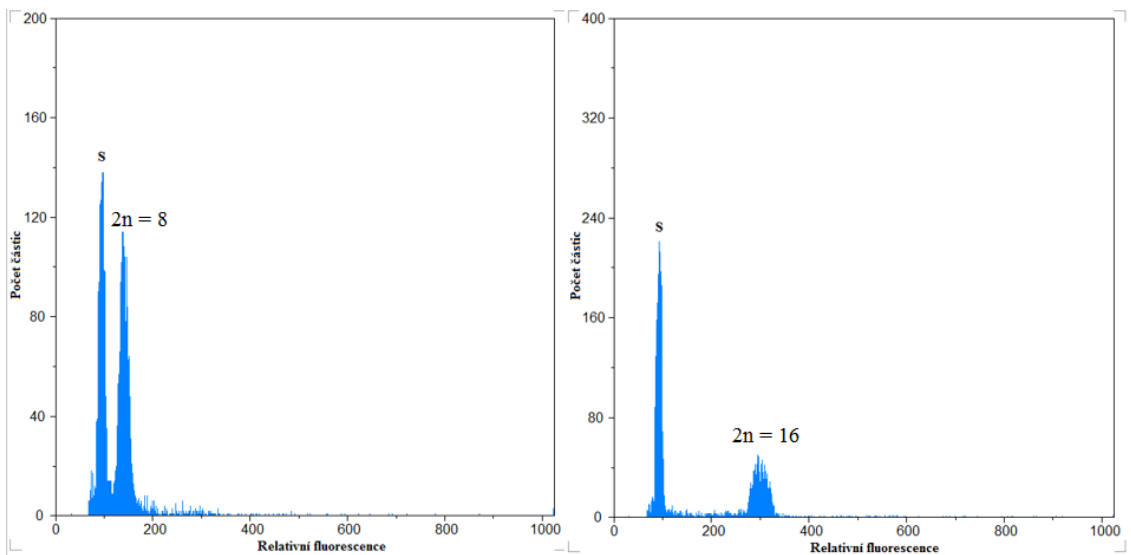
Obrázek 11) Histogram relativní velikosti genomu, zjišťované pomocí průtokové cytometrie, diploidního ($2n=8$) *C. vernus* a standardu *Bellis perennis* (S) na lokalitě Lačnov (3). Stejně vychází i na lokalitách 4, 5, 9, 10, 11, 12, 15, 16 a 18.



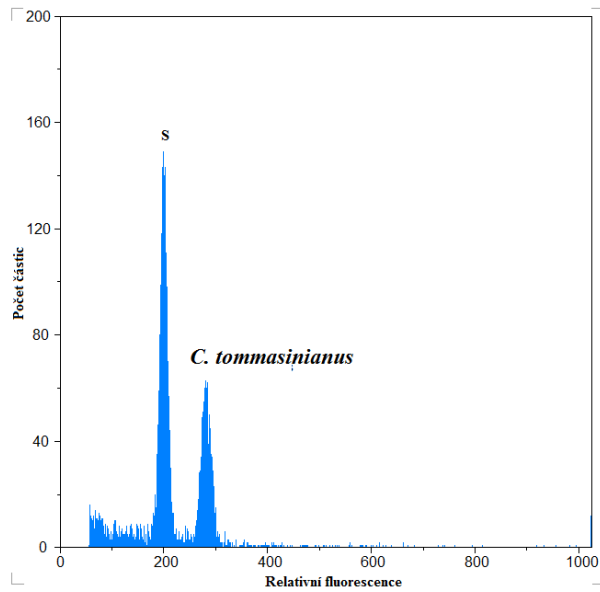
Obrázek 12) Histogram relativní velikosti genomu, zjišťované pomocí průtokové cytometrie, tetraploidního ($2n=18$) *C. heuffelianus* a standardu *Bellis perennis* (S) na lokalitě Zubří (2), stejně vychází i lokalita 17 a 19.



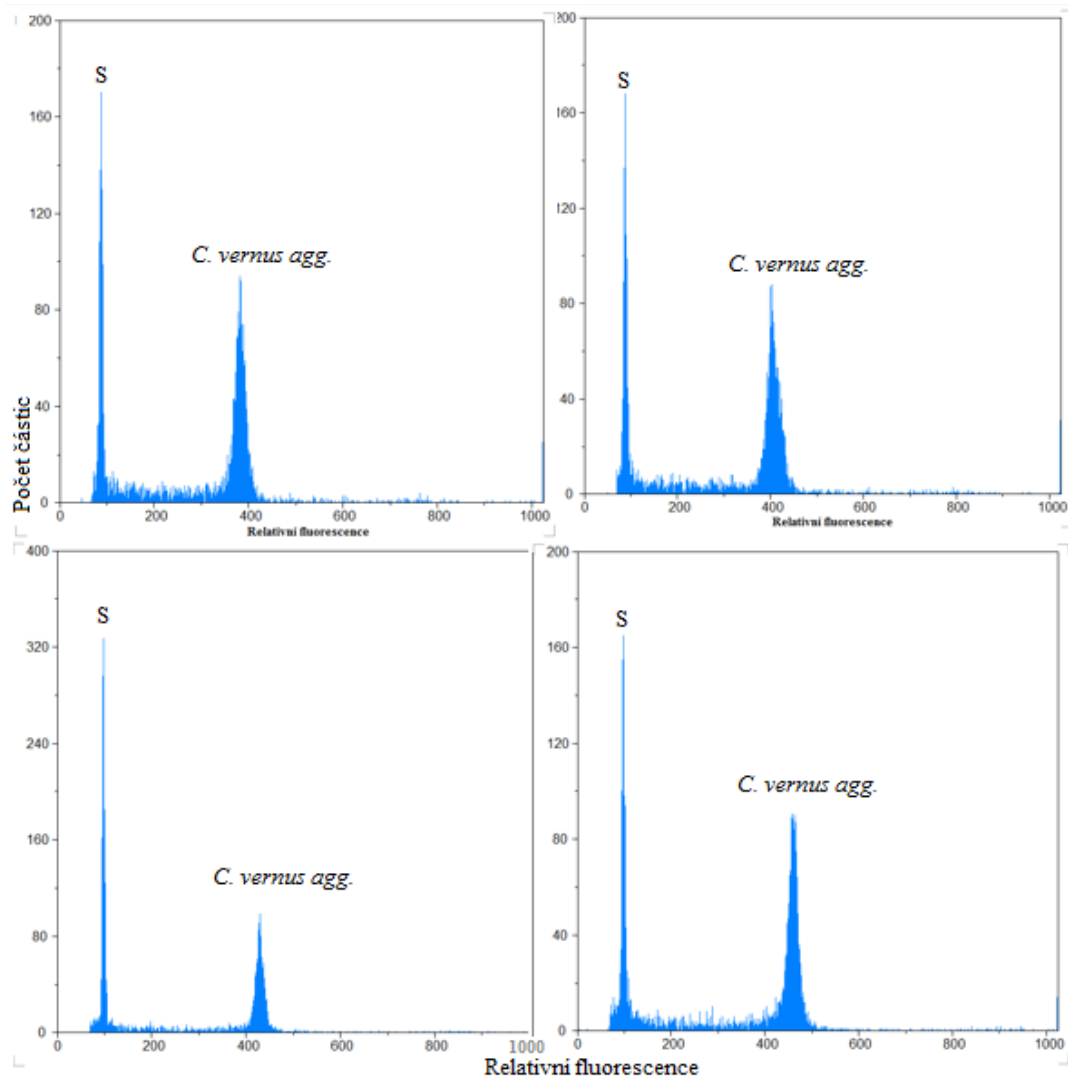
Obrázek 13) Histogram relativní velikosti genomu, zjišťované pomocí průtokové cytometrie, *C. heuffelianus* 2n=16 a standardu *Bellis perennis* (S) na lokalitě Polsko (14).



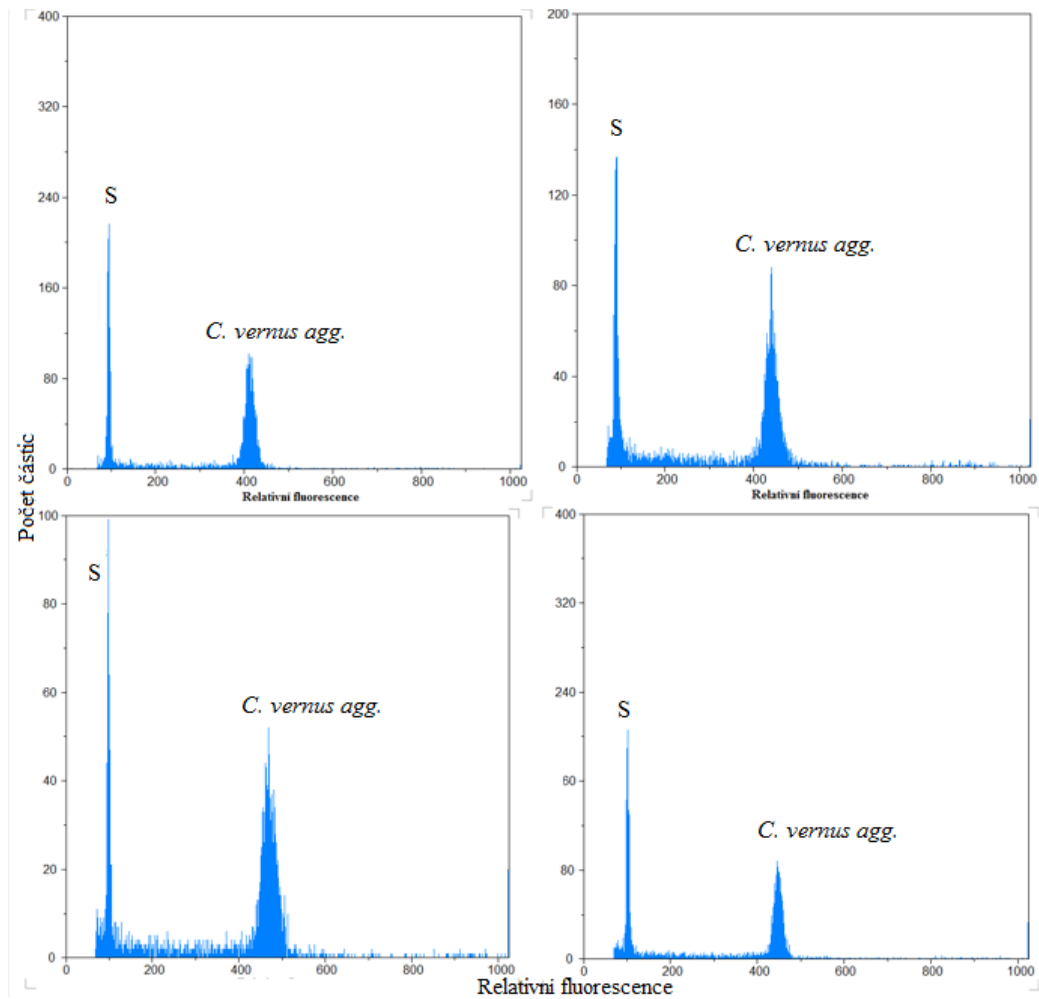
Obrázek 14) Histogram relativní velikosti genomu zjišťované pomocí průtokové cytometrie na lokalitě Malá Úpa (13); *C. vernus* (vlevo) a *C. heuffelianus* (vpravo), standard *Bellis perennis* (S).



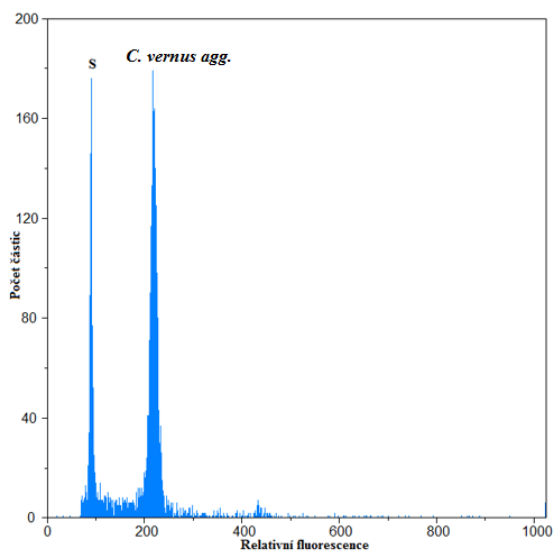
Obrázek 15) Histogram relativní velikosti genomu, zjišťované pomocí průtokové cytometrie *C. tommasinianus* a standard *Bellis perennis* (S) na lokalitě Babiččino údolí (1).



Obrázek 16) Histogramy relativní velikosti genomu, zjišťované pomocí průtokové cytometrie. Rostliny *C. vernus agg.* a standard *Bellis perennis* (S) na lokalitě PP Lukášov.



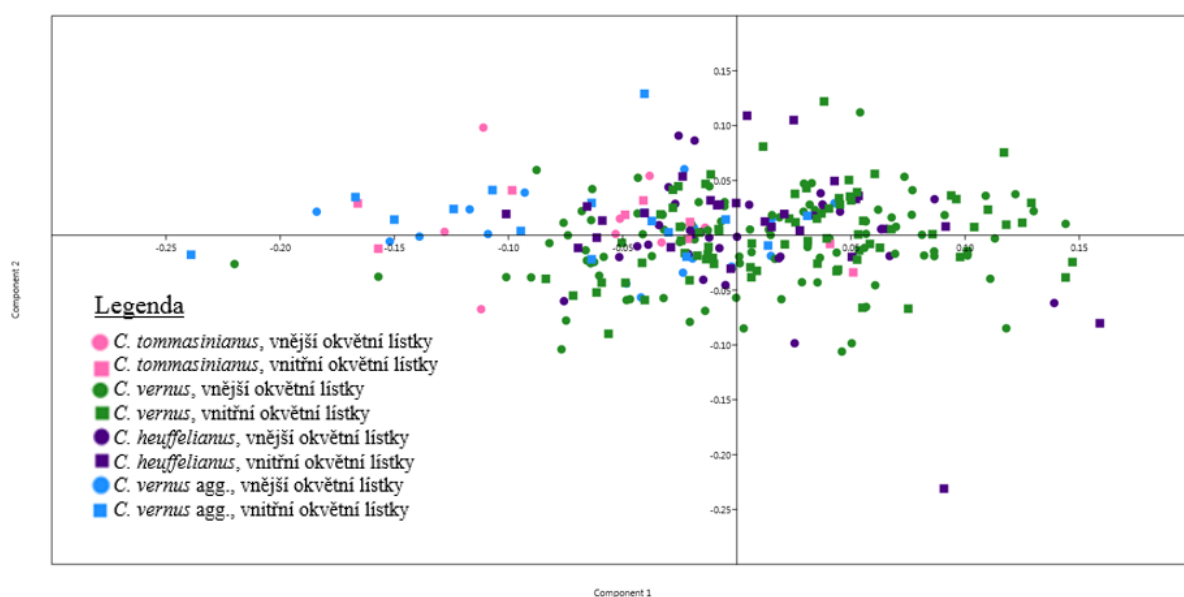
Obrázek 17) Histogramy relativní velikosti genomu, zjišťované pomocí průtokové cytometrie. Rostliny *C. vernus agg.* a standard *Bellis perennis* (S) na lokalitě PP Kytlice (7).



Obrázek 18) Histogram relativní velikosti genomu, zjišťované pomocí průtokové cytometrie, *C. vernus agg.*, který však odpovídá spíše druhu *C. tommasinianus*, a standardu *Bellis perennis* (S) na lokalitě PP Kytlice.

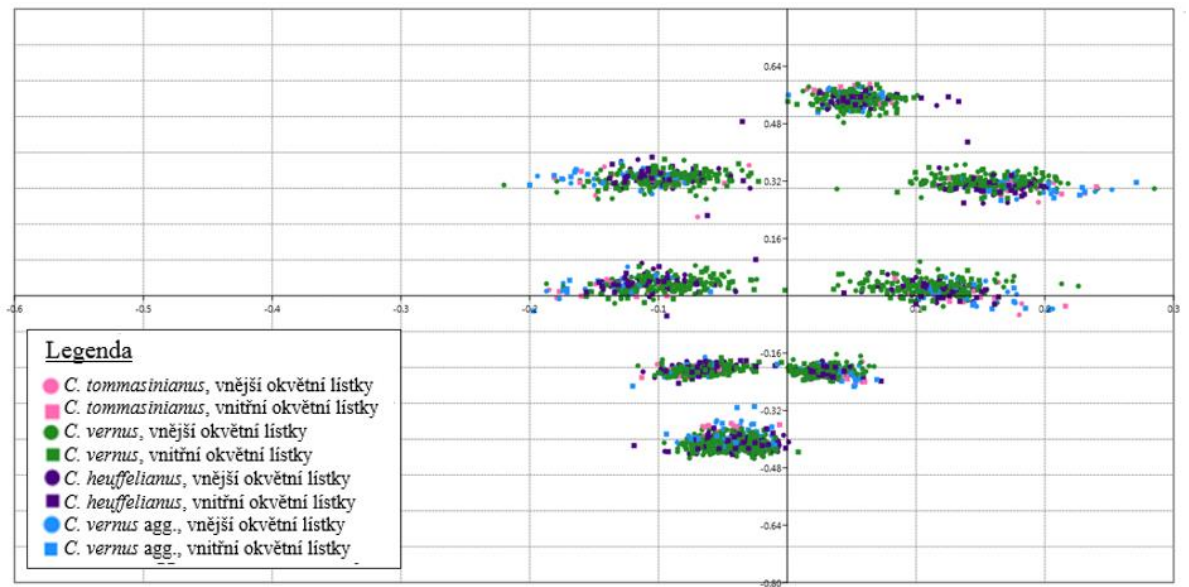
5.3 Morfometrika okvětních lístků

Výsledky analýzy hlavních komponent (PCA) tvarové podobnosti okvětních lístků zobrazují určitou strukturu, zejména částečné oddělení *C. vernus* a *C. heuffelianus* od kulturních rostlin *C. vernus* agg. podle první osy (obr. 19). Celkově první tři komponentní osy vysvětlily 82,46 % variability (1. osa vysvětlila 49,22 %, 2. osa 18,43 % a 3. osa 14,81 %). Podobnost vnitřních a vnějších okvětních lístků není znatelná.



Obrázek 19) PCA analýza – tvarová podobnost vnitřních a vnějších okvětních lístků čtyř druhů šafránů (*C. vernus*, *C. heuffelianus*, *C. tommasinianus* a *C. vernus* agg.).

Okvětní lístky šafránů jsou obkopynaté (podlouhle obkopynaté) nebo eliptické (méně), jak je zřejmé z obrázku 20. Zde je také dobře vidět, že okvětní lístky u druhu *C. vernus* jsou nejužší, o něco málo širší jsou okvětní lístky druhu *C. heuffelianus* a nejširší je má *C. vernus* agg. Jaké jsou tvarově okvětní lístky druhu *C. tommasinianus* nemůžeme přesně z této analýzy určit, neboť je v analýze zastoupen pouze 30 okvětními lístky (15 vnějšími a 15 vnitřními), a tak ho ostatní druhy svými body zastihují. Pravděpodobně však tvarem budou odpovídat druhu *C. heuffelianus* až druhu *C. vernus* agg, nějaké body však také odpovídají druhu *C. vernus*.



Obrázek 10) XY plot – prostorové rozmístění všech devíti landmarků u vnitřních a vnějších okvětních lístků čtyř druhů šafránů (*C. vernus*, *C. heuffelianus*, *C. tommasinianus* a *C. vernus* agg.).

6 Diskuze

6.1 Morfologie a morfometrika

Výsledky morfologických analýz ukazují odlišnost malokvětého druhu *C. vernus* od skupiny zahrnující *C. heuffelianus*, *C. tommasinianus* a kultivary označované zde jako *C. vernus* agg. Na základě délky okvětních cípů je možné odlišit i *C. tommasinianus* od dvojice *C. heuffelianus* a *C. vernus* agg. Naopak se nepodařilo nalézt znaky spolehlivě odlišující karpatské a krkonošské populace *C. heuffelianus*. Někdy je zmiňováno odění v ústí okvětní trubky, Rafiński (1976) však píše, že se tento znak k určování příliš nehodí, neboť tento znak vykazuje velkou proměnlivost. Morfometrickými analýzami se podařilo částečně oddělit *C. vernus* spolu s *C. heuffelianus* od *C. vernus* agg ve tvaru okvětních lístků, což má značný význam pro odlišování kulturních vysazovaných šafránů

Crocus vernus může být jak čistě bílý, tak čistě fialový, tak žíhaný s různým poměrem fialové barvy. Květní trubka může být také buď fialová nebo bílá, nebo žíhaná. Okvětní lístky se mohou lišit i tvarem (široké x úzké; špičaté x zaokrouhlené). *Crocus heuffelianus* může mít také různé barvy od tmavě fialové (nejtypičtější), přes žíhané až po bílou. Fialová může nabývat i různých odstínů, typická pro druh je tmavší kresba ve tvaru písmene „V“ v horní části okvětních lístků (Pilous, 1975). Někteří autoři vysvětlují variabilitu barev okvětní křížením (např. Pilous, 1975) s argumentem, že *C. vernus* roste na lokalitách sám, zatímco *C. heuffelianus* většinou dohromady s druhem *C. vernus* (Pilous, 1975). Na lokalitách, kterými se zabývá tato práce, byl však téměř vždy jen jeden z druhů, výjimkou je pouze lokalita Malá Úpa (13), kde byly nalezeny oba druhy. Křížení mezi těmito druhy nebylo nikdy spolehlivě prokázáno, a křížení navíc s jinými druhy se nezdá se být příliš pravděpodobné.

Barevná proměnlivost u v této práci zkoumaných rostlin *Crocus heuffelianus* příliš neodpovídá údajům Pilouse (1975). *C. heuffelianus* nebyl nijak výrazně variabilní v morfologii, ani v barvě květu a nenašli jsme žádné bílé a žíhané jedince, o kterých se zmiňuje Pilous (1975). Na lokalitách se vyskytovaly rostliny pouze tmavě fialové barvy. Variabilita spočívala hlavně v barvě květní trubky, která byla buď fialová, nebo bílá. Její přechod s tmavě fialovým květem byl plynulý (ne ostrá hranice). Rostliny ani na jedné dvojici lokalit však nebyly barevně zcela totožné.

Nejzajímavější byly rostliny druhu *C. heuffelianus* byly na lokalitě v PP Zubří (2), které měly, jako jediné, výrazně tmavě fialovou kresbu ve tvaru „V“. Z dvaceti zkoumaných lokalit se *C. heuffelianus* vyskytoval pouze na pěti lokalitách, a to na Valašsku, v Polsku, v Orlických horách, na Šumavě a v Krkonoších.

6.2 Vývoj lokalit

Rozšířením šafránů na Šumavě se poprvé zabýval Procházka (1990, 1992). Všechny jím uváděné velké, ale i další lokality šafránů na Šumavě podrobněji popisují Pavlíčko a Buřková (1998). Popisují lokality, které byly mapovány už na přelomu 80. a 90. let a publikují zde data z roku 1996. Zatím posledním shrnutím známých lokalit je zpracování *C. vernus* v Červené knize jižních Čech (Ekrt et Lepší 2013). První vůbec objevená šumavská lokalita je u Zátoně (20). Zde se ale již šafrány nevyskytují, potvrdil nám to i místní chatař. V roce 1996 jich tam však bylo ještě 250 kvetoucích (90 % bílých, zbytek žlhaných) (Pavlíčko et Buřková, 1998). Další dvě lokality, které jsme mapovali, se nachází u Strážného. Na lokalitě Strážný – Pod Hájovnou (17) jsme přijeli bohužel pozdě a téměř všechny rostliny již byly odkvetlé. Kvetoucí rostliny jsme viděli jen přímo pod hájovnou na soukromém pozemku za plotem, a tak jsme si je nemohli prohlédnout a odebrat vzorky. Potkali jsme ale fotografa, který nám ukázal jeho fotky z doby kvetení a odhadl počet rostlin. Květy byly tmavě fialové a celkový počet rostlin se pohyboval okolo 5 000 kvetoucích rostlin. Zdejší rostliny odpovídají druhu *C. heuffelianus*, což uvádí i Ekrt et Lepší (2013). Pavlíčko et Buřková (1998) z výzkumu v roce 1996 uvádí 20 000 rostlin, z toho 2 000 kvetoucích, avšak druhu *C. vernus*. Barvu uvádí stejnou jako já v této práci, ale navíc ještě jedno procento rostlin kvetoucích bíle. Vzdušnou čarou asi 1 km se nachází druhá lokalita u Strážného – PP Strážný - Pod Obecním (18). Šafrány zde kvetou bíle a nepochybně se tu jedná o *C. vernus*. Okvětní lístky jsou buď zcela bílé (90 %), nebo mají světle fialové žhání (10 %). Dle práce Pavlíčko et Buřková (1998) v roce 1996 byla procenta barvy květů jiná: 75 % bílá, 24 % žlhaná a 1 % fialová. Uvádí také jen 15 000 kvetoucích rostlin a my jich spočetli zhruba 30 000 – 40 000. Zdá se tedy, že početnost populace stoupá, může jít ale jen o meziroční fluktuaci. Poslední šumavskou lokalitou, kterou jsme mapovali je PP Vyšný - Křišťanov (16), která je brána jako 2 oddělené lokality. Zde je popsána jen jedna, protože na druhé

lokalitě žádné šafrány nebyly – pravděpodobně tedy už zanikla. Nachází se zde pouze bílá forma *C. vernus*. Pavlíčko et Bufková (1998) uvádí, že v roce 1996 bylo bílých jen zhruba 60 %, dále bylo 36 % žhaných a 4 % fialových. Výskyt na této lokalitě fluktuuje, nyní znovu stoupá. V roce 1986 zde bylo zaznamenáno 4 000 kvetoucích jedinců, v roce 1996 už jich bylo jen 580 (Pavlíčko et Bufková, 1998) a my jsme (r. 2016) odhadli 1200 kvetoucích rostlin. Důvodem poklesu populace byl nesprávný způsob hospodaření – nekosení luk a docházelo tak k rozšiřování konkurenčně silnějších a nepůvodních druhů a také k sukcesi dřevin (Pavlíčko et Bufková, 1998). Na Šumavě se tedy nachází jak *C. vernus*, tak i *C. heuffelianus* (pouze na jedné lokalitě).

Podobně významnou oblastí s výskytem šafránů jsou Krkonoše, kde leží co do počtu nejvíce lokalit v rámci České republiky. Krkonošské lokality nejpodrobněji zmapoval Pilous (1975). Hojněji se zde vyskytuje *C. vernus*, *C. heuffelianus* je spíše vzácný. V Krkonoších je uváděno celkově přibližně 15 000 kvetoucích jedinců (2–5x více i s nekvetoucími jedinci), a z toho je 1 500 jedinců druhu *C. heuffelianus* (Pilous (1975). Nejstarší krkonošskou lokalitou je lokalita nacházející se v Polsku (14) poblíž Sklářské Poruby. Lokalita byla objevena snad již v roce 1811 místním učitelem (Šourek, 1969), ale v literatuře byla poprvé uvedena až Fiekem (1881), který tamější výskyt označil za původní. Rafiński (1976) však o původnosti pochybuje. Fiek (1881) označuje rostliny jako *Crocus banaticus*. Podle Fieka (1881) je tento druh typický v celých Krkonoších a v Sudetech dosáhl své severozápadní hranice výskytu. Na lokalitě jsem viděla jen rostliny v odstínech světle fialové. Rafiński (1976) však šafrány popisuje s neobvyklou proměnlivostí barevnosti květů a často s formami v neobvyklém typu zbarvení, které se nikde jinde nevyskytuje. Vnější okvětní lístky popisuje hodně zesvětlené až v šedivo-bíle barvě a vnitřní okvětní lístky znatelně tmavší v liliové barvě s tmavě fialovou květní stopkou. Tuto podobu šafránu *C. heuffelianus* uvádí i Šourek (1969) po celé české straně Krkonoš, my jsme však na české straně Krkonoš zaznamenali pouze druh *C. vernus* (s výjimkou lok. 13 - Malá Úpa). Vzhledem k tomu, že jsme na polské lokalitě našli dostatek rostlin (500) je zřejmé, že je velikost populace dostačující pro přežívání, zmenšuje se však její rozloha. Lokalitu ohrožuje les, který ji obklopuje. Část z ní je již zarostlá stromy. Na české straně Krkonoš je nejstarší známá lokalita v Anenském údolí (15) v Harrachově. Vyskytuje se zde bílá forma *C. vernus*. J. Fanta v roce 1973 zaznamenal

1 500 kvetoucích rostlin v bílé i světle fialové barvě (Pilous, 1975). Dnes jsou na lokalitě jen bílí jedinci v počtu zhruba 1 200 kvetoucích rostlin. Tyto počty rostlin se přibližně shodují. Další krkonošskou lokalitou je Hrochova louka v Horních Albeřicích (9), kterou poprvé uveřejnil Šourek (1969). Nyní zde roste cca 4 500 jedinců. Pilous (1975) uvádí 3 000–5 000 kvetoucích rostlin, což odpovídá i našemu počtu. Populace je tedy stabilní a počty rostlin se od té doby nijak výrazně nezměnily. Podle Pilouse (1975) ze převažují bílé kvetoucí rostliny nad světle fialovými (Pilous, 1975). Tento popis pro tamější rostliny souhlasí a doplňuje, že se na lokalitě Hrochova louka již nachází i jedinci žhaní (pravděpodobní hybridi rostlin těchto dvou barev). Rostliny bílé barvy však stále převažují nad ostatními, a to devadesátí procenty. Následující dvě menší lokality se nacházejí také v Horních Albeřicích. První z nich je nejmenší ze všech lokalit (hlavně v počtu jedinců) – lokalita U Dána (10), kde jsme našli jedince zase pouze *C. vernus*, jak tmavší i světlejší fialové barvy, tak bílé i světle fialově žhané. Pilous (1975) uvádí 130 kvetoucích jedinců obou našich druhů (11 rostlin *C. heuffelianus*, zbytek *C. vernus*) na ploše 18 m², z toho *C. vernus* v převážně bílé barvě, občas s žilkováním. Nyní tedy přibýly rostliny *C. vernus* čistě fialové barvy. Je možné, že právě tyto jedince mohl Pilous (1975) označit za *C. heuffelianus*. Populace *C. heuffelianus* zde buď tedy zanikla, nebo došlo v minulosti ke špatnému určení. Celkově tedy početnost populace klesla, neboť my jsme odhadli jen 25 jedinců na zhruba 50 m² (rozloha se naopak zvětšila). Na lokalitě U Čerta (11) se nacházejí opět dva barevné typy, jeden středně tmavě fialový a druhý bílý. Našli jsme cca 1 200 kvetoucích jedinců, stejné číslo uvádí také Pilous (1975), ale on uvádí rozlohu pouze 60 m², zatímco my jsme rostliny viděli růst zhruba na 100 m² plochy. Populace se zdá stabilní. Okvětní lístky Pilous (1975) uvádí úzké, dlouhé a špičaté se zřetelnou mezerou mezi nimi až k bázi, což odpovídá i mým pozorováním. Dále uvádí, že je to největší lokalita *C. heuffelianus* s pouze vtroušeným (25 jedinců) *C. vernus*. Průtokovou cytometrií se však potvrdilo, že jde zřejmě, ve všech případech, o *C. vernus*. Na Horní Albeřice navazují Dolní Albeřice, ve kterých se nachází jen jedna, ale za to relativně velká, lokalita (Dolní Albeřice - 12). Na ní se nacházejí jen bílé rostliny *C. vernus*. Zhruba jsme spočetli 5 300 kvetoucích jedinců, 4 000 rostlin uvádí Pilous (1975) na zhruba stejné rozloze. On však zaznamenal i fialové jedince, kterých byla jedna čtvrtina. Poslední zkoumaná lokalita je v Malé Úpě (13), kde se vyskytuje, jak *C. vernus*, tak *C. heuffelianus*. K této lokalitě nemám bohužel žádné porovnání, neboť ji Pilous neuvádí.

Další tři navštívené lokality byly na Valašsku, dvě druhu *C. vernus* (PP Lačnov – 3, PP Sucháčkovy paseky – 4), jedna druhu *C. heuffelianus* (PP Zubří – 2). Nejznámější je v případě druhu *C. vernus* PP Lačnov (3). Tato lokalita je chráněná již od roku 1948, a jde zřejmě o nejbohatší populaci *C. vernus* v České republice. Sedláček (2014a) uvádí 50 000 rostlin (100 000 rostlin i s těmi mimo PP). My jsme odhadli 20 000–30 000 rostlin s okolím, šafrány totiž můžeme najít i mimo vytyčenou přírodní památku všude ve vesnici. Původnost je sporná, někdy se uvažuje o zavlečení z alpské oblasti během napoleonských válek se senem pro koně (Přírodní památka Lačnov, 2016), neboť se šafrány zřejmě snadno, kromě klonálního rozmnožování, rozšiřují i semeny (Caiola, 2004). Leneček (1934) píše o fialově zbarvené odrůdě. *C. vernus* - *C. albiflorus* Kitaibel. Rostliny, které jsme viděli, odpovídají tomuto popisu. Vzdušnou čarou 1,2 km od PP Lačnov se nachází PP Sucháčkovy paseky (4), vyhlášená ale až roku 1999. Předmětem ochrany je zde mezofilní ovsíková louka svazu *Arrhenatherion elatioris* a vlhká pcháčková louka svazu *Calthion palustris* s výskytem druhu *C. vernus* fialové barvy a prstnatce májového (Sedláček, 2014b). Barva květů rostlin je stejná jako v PP Lačnov. Drobným rozdílem je, že u některých jedinců často bílá barva lemuje celý květní cíp. Zoubky pak tvoří podélnou linii téměř po celém lístku. Počet kvetoucích jedinců je menší než v PP Lačnov (pokud by se u obou lokalit brali v potaz pouze vytyčené PP a ne okolí). Na této lokalitě jsou rostliny průměrně menší než v Lačnově, ne však nějak výrazně. Šafrány se do této oblasti pravděpodobně dostaly společně s šafrány v Lačnově, nebo mohla jedna populace vzniknout rozšířením té druhé (Sedláček, 2014b). Poslední navštívenou valašskou lokalitou je PP Zubří (2) s výskytem sytě fialového *C. heuffelianus*. Lokalita je také známa jako jedna z prvních (společně s PP Lačnov) již od začátku 19. století (Hendrych, 1987). Místní rostliny byly někdy označovány jako *C. heuffelianus* subsp. *scepusiensis*, případně *C. scepusiensis*. Šafrány se nacházely po celé vesnici a napočítala jsem kolem 500 kvetoucích jedinců (pouze v PP). M. Škrott zde v roce 1984 napočítal 1 730 kvetoucích rostlin, P. Chytil v roce 2005 zaznamenal 1 000 rostlin celkově a M. Popelářová zaznamenávala populaci v průběhu let 2008–2011. Početní stav se v průběhu těchto let postupně zmenšoval ze 420 kvetoucích jedinců na 200 jedinců (Popelářová, 2011). Početnost populace možná tedy znovu vzrůstá.

Další mapovaná lokalita je v blízkých Bílých Karpatech – PP Za lesem (5) a považuje se za původní (Pavličko et Bufková, 1998). Přírodní památka byla

vyhlášena roku 1982 a je to jediná lokalita šafránu v tomto CHKO. Předmětem ochrany je *C. vernus* (bílý) a mezofilní ovsíková louka svazu *Arrhenatherion elatioris*, na které roste. Prašníky rostlin na této lokalitě převyšují bliznu průměrně nejvíce (o 11 mm). Velikost populace byla dříve něco kolem 100 jedinců, v posledních letech se však zvýšila na cca 600 jedinců. My jsme na místě odhadli 600–800 kvetoucích jedinců. Populace tedy postupně roste (Přírodní památka Za lesem, 2016).

Poslední mapovanou lokalitou s *C. vernus* (světle fialově kvetoucím) je Šafránová stráž (8) v CHKO Broumovsku. Předmětem ochrany je i druhově bohatá svahová louka svazu *Arrhenatherion*. Šafrány nejsou velikostí nijak odlišné od ostatních, tvarem okvěti však ano. V roce 2008 zde napočítal Aleš Hájek 230 kvetoucích jedinců (Hájek, 2009). V roce 2016 jsem spolu s ním napočítala 383 kvetoucích jedinců a v roce 2017 (8. 4.) jsem napočítala kolem 600 kvetoucích rostlin. Populace je tedy stabilní. Rostliny zde pravděpodobně nejsou původní a dostali se sem možná s travní směsí z Krkonoš, morfologii mají však jinou než ty krkonošské, což může být dáno prostředím (Aleš Hájek, 2016, in verb). O této lokalitě je zmínka již z roku 1900, kdy tam šafrány pozoroval Prof. Čelakovský z Prahy. Jeho určení do druhu bylo sporné, šafrán určil jako *C. vernus* nebo *C. banaticus*, který je však původní na Balkánském poloostrově (Leneček, 1934).

Nejblíže lokalitě na Broumovsku je lokalita s *C. tommasinianus* v NPP Babiččino údolí na Náchodsku (Babiččino údolí – 1). Tento druh byl zaznamenán jen na této lokalitě, která nebyla doposud popsána. Na lokalitu nás upozornil Aleš Hájek z CHKO Broumovsko, který tuto lokalitu objevil. O jaký druh jde, až dosud nebylo jasné. Morfologickými znaky se více podobá druhu *C. vernus* než *C. heuffelianus*, ale barvu květů má jinou – více do růžova (fuchsiová), nápadná je i vždy bílá okvětní trubka. Vzhledem k tomu, že lokalita leží v bezprostřední blízkosti zámku Ratibořice, je zde s velkou pravděpodobností vysazen a původ těchto rostlin je obtížné zjistit.

V této části republiky je ještě jedna lokalita, ta je v Orlických horách v Luisině údolí (19), kde se nacházejí šafrány v odstínech tmavší fialové. Morfologicky jsou tyto rostliny nejmenší v rámci druhu *C. heuffelianus* v rámci zkoumaných lokalit. Lokalita byla objevena v roce 2003 a jedná se o nejpozději objevenou lokalitu u nás (Gerža, 2004).

Úplně posledními mapovanými lokalitami jsou dvě v severních Čechách. V těchto dvou přírodních památkách, jak v Lukášově (6), tak v Kytlici (7) roste zahradní kultivar, zde označovaný jako *C. vernus* agg. Přírodní památka Lukášov byla vyhlášena v roce 1948 (Višňák, 2016) a předmětem ochrany dle plánu péče je *C. heuffelianus* (Hošek, 2007). Avšak dle Faltyse a Faltysové (1995) se jedná o *C. vernus*, tento název uvádí i Chrtek (2010). Napočítala jsem 1 500–2 500 kvetoucích jedinců, se značnými rozdíly v barvě květů. Populace postupně slábne, hlavně v souvislosti s útlumem zemědělského hospodaření a kvůli okusu květů zvěří v posledních letech. Pro udržení populace je nezbytné pravidelné sečení (Višňák, 2016). V přírodní památce Kytlice (7), která je známa již od začátku 20. století je v prvních zmínkách uveden nejdříve *C. heuffelianus*, poté jej však přehodnotili na *C. vernus*. Určení druhu je tedy už od začátku výzkumu sporné (Leneček, 1934). Rostliny jsou zde barevně totožné, jako ty v Lukášově, chybí však jedinci s okvětim zcela bílým a se zcela světle fialovým. Místo nich jsme zaznamenali rostliny ve výrazné fialové barvě a s ostře špičatými cípy. Žlhaní jedinci mohou mít také špičaté cípy okvěti (v PP Lukášov jsou jen zaokrouhlené a o dost širší). Tmavě fialová barva báze květu vyběhá většinou výš než u rostlin z PP Lukášov. Našli jsme také mnoho jedinců, kteří měli rozdílné vnitřní a vnější okvětní lístky (v PP Lukášov ne). Ty se buď lišily jen barvou, nebo i velikostí. Barva květu byla zaznamenána světle fialová (lila) s intenzivním pruhováním v celkovém počtu zhruba 300 jedinců (Leneček, 1934). My jsme vloni (2016) zaznamenali 1 500 rostlin. Tyto šafrány se nepodobají jiným šafránům dnes pěstovaným v našich zahrádkách. Jedná se pravděpodobně o potomstvo starých evropských kulturních šafránů, kdysi pěstovaných na tomto území.

6.3 Velikost genomu

Velikost genomu zjištěná za pomoci průtokové cytometrie se ukázala jako mimořádně vhodný pomocný znak pro odlišení do přírody vysazovaných kultivarů od druhů *C. heuffelianus* a *C. vernus*. Rozdíly ve velikosti genomu mohou být ale velmi cenné i při určování fialově kvetoucích rostlin stojících některými morfologickými znaky na pomezí *C. vernus* a *C. heuffelianus*.

V rámci *Crocus heuffelianus* byly na základě velikosti genomu rozlišeny dvě skupiny populací: „západokarpatské“ ($11,52 \pm 0,1112$ pg) a „krkonošské“ ($10,7848 \pm 0,3291$ pg). Velmi dobře to odpovídá již dříve zjištěným počtům chromozomů. Zatímco pro rostliny z polské strany Krkonoš (i z mnou navštívené lokality) je uváděno $2n=16$ (Passakas et Rafiński in Rafiński, 1976; Rafiński et Passakas 1976b), u západokarpatských rostlin (často označovaných jako *C. scepusiensis* nebo *C. discolor*) byl opakovaně zjištěn pouze počet chromozomů $2n=18$. Počítány byly přitom rostliny z více lokalit a zdá se, že v Západních Karpatech se vyskytují pouze rostliny s tímto chromozomovým počtem. Poprvé tento počet zjistila Skalińska (1966) na dvou lokalitách v Krivánské Malé Fatře, dále pak Rafiński a Passakas (1976) u Muráně (Muránská planina), na Čertovici (Nízké Tatry) a v Habovce (Západní Tatry), Brighton (1976) v Harmanci (Velká Fatra) a ve Vysokých Tatrách, Murín et Hindáková (1984) u obce Hybe (Liptovská kotlina), ve Vernáru (Slovenský ráj) a ve Štrbě (Spišské kotliny), Májovský et al. (1990 a 1991) zaznamenal tento chromozomový počet v Lazech pod Makytou (Javorníky), v Poltáru a v Brezničce (Slovenské rudohoří), v Kružné (Slovenský kras) a v Oravské Lesné (Západní Beskydy).

Stejný počet chromozomů ($2n=18$) byl ale zjištěn i u rostlin ze Slovinska (Postojna, Celje – Maribor, Skocjanska jama) a Chorvatska (Vrhnika, Záhřeb), a rumunských Karpat (Brighton, 1976; Rafiński, 1976; Kujat et Rafiński, 1978).

Východokarpatské populace (*C. heuffelianus* s. str.) mají na rozdíl od západokarpatských $2n=10$. Toto chromozomové číslo zjistili i Murín et Hindáková (1984) v Nízkých Beskydách v Nižných Ladičkovcích a Šarišské Porubě, Májovský et al. (1991) v Koškovcích (Nízké Beskydy, Mihaly et Kricsfalusy (1997) na Ukrajině, Dietrich (2000) v Rakousku, Kujat et Rafiński (1978) v Maďarsku (Téb Erdő, blízko Tarpý) a Brighton (1976) v Rumunsku. Podle dosavadních údajů se tudíž zdá, že v jižních rumunských Karpatech rostou oba cytotypy.

S odlišným počtem chromozomů u západo- a výchokarpatských rostlin souvisí i někdy přijímané oddělování západokarpatských populací do samostatného druhu *C. discolor* (= *C. scepusiensis*), kde je při velmi malé morfologické vyhraněnosti právě počet chromozomů zásadní znak podporující tuto koncepci. Nejasné je ale stále postavení krkonošských rostlin ($2n=16$). Rafiński (1976) se na základě drobných

morfologických odlišností a rozdílu v počtu chromozomů přiklání k názoru, že nemůže jít ani o „západokarpatský“ (*C. discolor*, $2n=18$) ani o „východokarpatský“ (*C. heuffelianus*, $2n=10$) typ. Počet chromozomů $2n=16$ byl již v rámci okruhu *C. vernus* uváděn (Rafiński, 1976).

Nejasná ale zůstává evoluce karyotypu – za předpokladu základního chromozomového čísla $x=5$ jsou východokarpatské rostliny diploidní, západokarpatské jsou pak některými autory považovány za hypotetraploidní nebo tetraploidní (Harpke et al., 2013).

Dle Harpkeho et al. (2013) může však být počet chromozomů i $2n=19, 20, 22$, nebo 23 . Harpke et al. (2015) udává $2n=20$ nebo 22 . $2n=22$ uvádějí také Kujat et Rafiński (1978) z Tetova v Makedonii a Brighton (1976) v Kacaniku v Srbsku. $2n=14$ zjistil u druhu *C. heuffelianus* Pashuk (1987) v ukrajinských Karpatech, není ale vyloučeno že jde o omyl.

Velikost genomu u zkoumaných populací druhu *C. vernus* se neliší, pohybuje se v rozmezí od 4, 7286 do 5, 0328 pg, což odpovídá počtu chromozomů $2n=8$. Tento chromozomový počet zjistili i Kujat et Rafiński (1978), Wetschnig (1988), Dietrich (2000) a Teppner (2003) v rakouských Alpách, Lovka (1995) v Chorvatsku (Biokovo) a v Albeřicích a Frello et Heslop-Harrison (2000) na více lokalitách v Itálii, ve střední Francii a v Pyrenejích.

Oproti tomu velikost genomu u rostlin *C. tommasinianus* má velké rozpětí: 7, 14250 ± 1, 6719 pg (4, 732 – 9, 0651 pg). Harpke et al. (2013; 2015) uvádí pro tento druh $2n=16$, bohužel ale nemám referenční vzorky se stanoveným počtem chromozomů a současně velikostí genomu, a není proto možné rozhodnout, zda některá ze zjištěných velikostí genomu odpovídá tomuto počtu. Variabilita této populace v Babiččině údolí je velká. Dle velikosti genomu (4, 732 pg) jedna rostlina odpovídá *C. vernus*, další se *C. vernus* blíží (5, 949 pg). Jeden odebraný jedinec se naopak blíží druhu *C. heuffelianus* s velikostí genomu 9, 065 pg. V okolí není žádná populace *C. tommasinianus* a ani žádného jiného druhu. Rostliny zde byly zcela jistě vysazeny a jejich původ není možné určit. Příčina variability ve velikosti genomu je nejasná, roli mohou hrát nepravidelnosti v meioze a následný vznik aneuploidů. Nelze vyloučit ani introgresi ze strany nějakého druhu, který se tu již nevyskytuje; tomu by

snad mohla odpovídat vnitropopulační morfologická variabilita (zejména v barvě okvěť), na druhou stranu křížení u šafránů zřejmě není běžné.

Zajímavé jsou pak populace *C. vernus* agg. v PP Lukášově a PP Kytlici s největší velikostí genomu. Lukášov má variabilitu trochu nižší, a to $15,235 \pm 0,426$ pg (14,517–15,862 pg), Kytlice vyšší: $14,987 \pm 1,964$ pg (8.190–16.660 pg). Podobně jako u populace *C. tommasinianus* tu bohužel chybí referenční počet chromozomů, dá se ale předpokládat že jde o vyšší ploidii (polyploidie). A podobně jako u populace *C. tommasinianus* je i tady obtížné tuto proměnlivost vysvětlit. Mohlo by se jednat o výsledky narušené meiozy (aneuploidie). Vzhledem ke zřejmě vysokému počtu chromozomů, ale i o výsledek polyploidizace a nelze vyloučit ani to, že na lokality bylo nezávisle vysazeno více různých kultivarů. V každém případě je ale možné tyto populace na základě velikosti genomu spolehlivě odlišit od populací také velkokvětého *C. heuffelianus*.

7 Závěr

Tato práce je prvním komplexním zhodnocením morfologické proměnlivosti a variability ve velikosti genomu v sérii *Verni* rodu *Crocus* v České republice. Přispívá k řešení taxonomických otázek a otázek původnosti druhů na našem území.

Na našem území se vyskytují 3 druhy šafránů ze série *Verni*: *C. vernus* (= *C. albiflorus*), *C. heuffelianus* a *C. tommasinianus*. Druhy *C. vernus* a *C. heuffelianus* je možné odlišit zejména na základě velikosti okvěti a postavení prašníků a blizen. *C. vernus* má prašníky znatelně výš než blizny, u rostlin *C. heuffelianus* je to naopak. *C. heuffelianus* má sytější fialovou barvu a na rozdíl od *C. vernus* nemá bílé květy. Dalším naším druhem je *C. tommasinianus*, známý zatím pouze z jediné lokality v Babiččině údolí. Tento druh se podobá, dle rozměrů, spíš druhu *C. vernus*, tvarem okvětních cípů však více druhu *C. heuffelianus*. V terénu ho lze nejlépe určit dle jeho typické fuchsiové barvy, která se však vyskytuje jen u některých jedinců. Kromě toho jsou u nás občas vysazovány do přírody zahradní kultivary, zde označované jako *C. vernus* agg. Barevně jsou velmi proměnlivé, morfologií podobné druhu *C. heuffelianus* (jejich okvětní lístky jsou ještě o něco širší).

Vedle počtu chromozomů se jako velmi vhodný určovací znak ukázala velikost genomu. Nejmenší velikost genomu byla zjištěna u diploidního ($2n = 8$) *C. vernus* (4, 7286–5, 0328 pg). U druhu *C. heuffelianus* byly na základě velikosti genomu odděleny dvě skupiny populací: „západokarpatské“ (11, 4109–11, 8030 pg) a „krkonošské“ (10, 2046–10, 8802 pg). Západokarpatské populace mají chromozomový počet $2n=18$ a krkonošské rostliny $2n=16$. Velikost genomu u kulturních rostlin označovaných jako *C. vernus* agg. má vnitropopulační variabilitu a pohybuje se od 8, 190 pg do 16, 660 pg, liší se tak zřetelně od velikosti genomu u *C. heuffelianus* a rostliny mají pravděpodobně vyšší ploidii (polyploidie). Velikost genomu v populaci *C. tommasinianus* značně kolísá (4, 732–9, 0651 pg), není bohužel jasné, zda některá ze zjištěných velikostí odpovídá uváděnému počtu chromozomů pro tento druh ($2n=16$).

Zjištění variability v počtu chromozomů nebylo možné, neboť dělicí pletivo v koříncích nevytvářelo nové buňky. Bylo dobré navázat s dalším výzkumem a určit tyto chromozomové počty a komplexně je srovnat s původními zahraničními populacemi (Slovensko, Rumunsko, Maďarsko, Balkán).

8 Seznam použité literatury

Agentura ochrany přírody a krajiny - Nálezová databáze ochrany přírody (NDOP), online: <http://portal.nature.cz/>, 20. 11. 2016.

Brighton C. A., 1976: Cytological problems in the genus *Crocus* (Iridaceae). 1. *Crocus vernus* aggregate. *Kew Bulletin* 31: 33 – 46.

Caiola M. G., 2004: Saffron reproductive biology. *Acta Horticulturae* 650: 25 – 37.

Čeřovský J. et Jatiová M., 1999: *Crocus albiflorus* Kit. In Čeřovský J., Feráková V., Holub J., Maglocký Š. et Procházka F. (Eds.): Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů 5. Bratislava, Slovensko: 117.

Danihelka J., Chrtěk J. et Kaplan Z., 2012: Checklist of vascular plants of the Czech Republic. *Preslia* 84: 647 – 811.

Dietrich G., 2000: *Crocus heuffelianus* Herb. In Dobeš C. et Vitek E.: Documented chromosome number checklist of Austrian vascular plants. Verlag des Naturhistorischen Museums Wien, Vienna, Austria.

Ekrt L. et Lepší M., 2013: *Crocus albiflorus* Kit. ex Schult. – šafrán bělokvětý. In Lepší P., Lepší M., Boublík K., Štech M. et Hans V. (Eds): Červená kniha květeny jižní části Čech. Jihočeské muzeum v Českých Budějovicích, České Budějovice, Česká republika: 148.

Faltys, V. et Faltysová, H., 1995: Plán péče pro přírodní památku Lukášov na období 1996–2005. AOPK, Praha, Česká republika.

Fiek E., 1881: Flora von Schlesien preussischen und Österreichischen Antheils. J. U. Kern's Verlag, Vratislav, Polsko.

Frello, S. et Heslop-Harrison J. S., 2000: Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill. (Iridaceae) investigated by in situ hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence. *Annals of Botany* 86: 317–322.

Gambier A., 2007: PhotoFiltre 7 : Version (freeware) avec calques mais plus limitée que la version Studio X, ke stažení zde: <http://www.photofiltre-studio.com/pf7.htm>.

- Gerža M., 2004: Významné taxony rostlin, nově objevené nebo potvrzené v CHKO Orlické hory. *Acta Musei Reginaehradecensis, Series A, Scientiae naturales* 30: 17 – 19.
- Hájek A., 2009: Plán péče o přírodní památku Šafránová stráň na období 2009–2018. AOPK, Police nad Metují, Česká republika.
- Harpke D., Meng S., Kerndorff H., Rutten T., Blattner F. R., 2013: Phylogeny of *Crocus* (Iridaceae) based on one chloroplast and two nuclear loci: ancient hybridization and chromosome number evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 617 – 627.
- Harpke D., Carta A., Tomović G., Randelović V., Randelović N., Blattner F. R. et Peruzzi L., 2015: Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus* series Verni (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution* 301: 309 – 325.
- Heller F. O., 1973: DNA - Bestimmungen an Keimwurzellen von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulszytophotometrie. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86: 437 – 441.
- Hendrych R., 1987: Karpatische Migrationen und Florenbeziehungen in den tschechischen Ländern der Tschechoslowakei. *Acta Universitatis Carolinae, Biologica* 1985: 124 – 125.
- Hindakova, M. et Májovský J., 1977: In IOPB chromosome number reports LVI. *Taxon* 26: 257 – 274.
- Hošek J., 2007: Plán péče o přírodní památku Lukášov na období 2007 – 2016. Jablonec nad Nisou, Česká republika.
- Chrtek J., 2010: *Crocus* L. – šafrán. In Štěpánková J. (Eds.): *Květena ČR. Volume 8: Academia, Praha, Česká republika: 556 – 559.*
- IPCN Chromosome reports, online: <http://www.tropicos.org/Project/IPCN>, cit. 16. 3. 2017.
- Kavina K., 1914: Fytogeografický nástin Krkonoš. *Příroda* 12: 129–148.
- Klikzone. cz, online: <http://www.klikzone.cz/sekce-html/html-barvy.php/>, cit. 25. 2. 2017.

- Klimešová J. et Klimeš L., 2007: Bud banks and their role in vegetative regeneration – a literature review and proposal for simple classification and assessment. *Perspectives in Plant Ecology* 8: 115 – 129.
- Klingenberg C. P. et Monteiro L. S., 2005: Distances and directions in multidimensional shape space: implications for morphometric applications. *Systematic Biology* 54: 678 – 688.
- Krichphalushi V. V., 1989: Sravnitel'no-karyologicheskoe issledovanie prirodnykh populacij efemeroidov Karpat. *Plant Karyology*: 25 – 27.
- Kron P., Suda J. et Husband B. C., 2007: Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 847 – 876.
- Kuča P., Jongepierová I. et Trachtulec V., 1991: Chráněná krajinná oblast Bílé Karpaty. Český ústav ochrany přírody, Brno, Česká republika.
- Kučera T. et Šumberová K., 2001: Louky a pastviny. In Chytrý M., Kučera T. et Kočí M. (Eds.): Katalog biotopů České republiky. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, Česká republika: 109 – 111.
- Kujat, R. et Rafiňsky J. N., 1978: Seed coat structure of *Crocus vernus* agg. (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution* 129: 255 – 260.
- Leneček O., 1934: Unsere wilden Safran-Arten. *Natur und Heimat, Aussig* 5: 36 – 42, 83 – 85.
- Loureiro J., Trávníček P., Rauchová J., Urfus T., Vít P., Štech M., Castro S. et Suda J., 2010: The use of flow cytometry in biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia* 82: 3 – 21.
- Lovka M., 1995: IOPB chromosome data 9. *International Organization of Plant Biosystematists* 24: 21–23.
- Macleod M., 2001: Landmarks, localization and the use of morphometrics in phylogenetic analysis. Museum of Natural History - Department of Paleontology, London, Great Britain.

Májovský J., Murín A. et Hindáková M., 1991: Karyotaxonomic studies of Slovak populations of the genus *Crocus* L. Part 1. *Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Comenianae, Botanica* 38: 49–87.

Mapy.cz, online: <http://www.mapy.cz/>, cit. 26. 11. 2016.

Marhold K., Mártonfi P., Mered'a P., Mráz P., Hodálová I., Kolník M., Kučera J., Lihová J., Mrázová V., Perný M. et Valko I., 2007: Karyological database of the ferns and flowerig plants of Slovakia. Online: <www.chromosomes.sav.sk>.

Mathew B., 1980: *Crocus* L. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M. et Webb D. A. (Eds.), *Flora Europaea* 5: 92 – 99. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Mathew B., 1982: *The Crocus. A Revision of the Genus Crocus (Iridaceae)*. Timber Press, Portland, Oregon, United States of America.

Mihaly A. et Kricsfalusy V., 1997: Population biology and ecology of *Crocus heuffelianus* Herb. (Iridaceae) in Ukraine. *Linzer Biologische Beiträge* 29: 641 – 681.

Murín A. et Hindáková M., 1984: Karyotaxonómia druhu *Crocus heuffelianus* Herbert a *C. scepusiensis* (Rehm. et Wol.) Borb. na Slovensku. In: Zima M. et Kubová A. (Eds.): *Zborník referátov zo IV. zjazdu Slovenskej botanickej spoločnosti SAV*. VŠP Nitra, Nitra, Slovensko.

Murín A., 1993: Karyologické štúdium okrasných rastlín flóry Slovenska. *Biológia* 48/4: 441 – 445.

Neuhäuslová Z. et Chytrý M., 2010: Lužní lesy. In Chytrý M., Kučera T., Kočí M., Grulich V. et Lustyk P. (Eds): *Katalog biotopů České republiky, druhé vydání 2*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, Česká republika: 266 – 267..

Neustupa J., 2006: Co je to geometrická morfometrika aneb morfologie znovu na scéně. *Živa* 2/2006: 54 – 56.

Otto J., 1990: DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods in Cell Biology* 33: 105 – 110.

Pashuk K. T., 1987: Chromosome numbers in species of subalpine belt of Chernogora (Ukrainian Carpatians). *Botanicheskij Zhurnal* 72: 1069 – 1074.

Pavličko A. et Buřková I., 1998: Šařrn belokvety (*Crocus albiflorus*) na Šumave. Zpravy eskve Botanicke Spolenosti 32: 149 – 152.

Peruzzi L., 2016: *Crocus heuffelianus* (Iridaceae), a new record for the Italian flora. *Phytotaxa* 261/3: 291 – 294.

Petersen G., Seberg O., Thorse1 S., Jorgensen T. et Mathew B., 2008: Phylogeny of the genus *Crocus* (Iridaceae) based on sequence data from five plastid regions. *Taxon* 57: 487 – 499.

Pilous V., 1975: Prspevek k rozřieni šařrnu Heuffelova (*Crocus heuffelianus* Herb.) a belokveteho (*Crocus albiflorus* Kit) ve vychodnich Krkonoich. *Opera Corcontica* 12: 163 – 176.

Popelarova M., Koutecky P. et Krupa M., 2011: Šařrn karpatskvy (*Crocus heuffelianus* Herbert) na vychodni Morave. *Acta Carpatica Occidentalis* 2: 41 – 50.

Procházka F., 1990: Chráněné a ohrožené rostliny Prachatickveho okresu. Okresní muzeum Prachatice, Prachatice, eska republika.

Procházka F., 1992: Šumavský herbář. Tiskárny Vimperk, Vimperk, eska republika.

Procházka F., 2001: erny a erveny seznam cévnatých rostlin eskve republiky (stav v roce 2000). Příroda, Praha, eska republika.

Přírodní památka Lačnov, online: <https://nature.hyperlink.cz/vsetinsko/Lacnov.htm>, cit. 10. 1. 2016.

Přírodní památka Za lesem, online: https://nature.hyperlink.cz/uh/Za_lesem.htm, cit. 13. 2. 2016.

Rafinski J. N., 1976: O pozycji systematycznej krokusow rosnacych w Gorach Izerskich. *Fragmenta Floristica et Geobotanika* 22: 9 – 12.

Rafinski, J., N. et Passakas T., 1976a: Chromosomal differentiation within *Crocus vernus* agg. (Iridaceae) in the Carpathian Mts. *Plant Systematics and Evolution* 125: 1–8.

- Rafinski, J. H. et Passakas T., 1976b: A contribution to the karyology of *Crocus vernus* agg. (Iridaceae) from the Iserian Mts. (Sudety Mts., Poland). *Plant Systematics and Evolution* 125: 9–13.
- R Development Core Team, 2011: R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Rosenberg M. S., 2002: Fiddler crab claw shape variation: a geometric morphometric analysis across the genus *Uca* (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 75: 147 – 162.
- Saxena R. B., 2010: Botany, Taxonomy and Cytology of *Crocus sativus* series. *An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda* 31/3: 374 – 381.
- Sedláček V., 2014a: Plán péče o přírodní památku Lačnov na období 2016 – 2025. Ms., depon. in: Krajský úřad Zlínského kraje.
- Sedláček V., 2014b: Plán péče o přírodní památku Sucháčkovy paseky na období 2016 – 2025. Ms., depon. in: Krajský úřad Zlínského kraje.
- Shapiro H., 2004: Practical flow cytometry. Wiley-Liss academic journals 3.
- Shapiro H., 2007: Cytometry and cytometers: development and growth. In Doležel J., Greilhuber J. et Suda J. (Eds): *Flow cytometry with plant cells*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Schönswetter P., Suda J., Popp M., Weiss-Schneeweiss H. et Brochmann C., 2007: Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (Juncaceae) inferred from AFLP fingerprints, cp DNA sequences, nuclear DNA content and chromosomes numbers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 92-103.
- Schustler F., 1918: Krkonoše. Rostlinozeměpisná (fytogeografická) studie. Praha, Česká republika.
- Skalická, K., 2005: Polyploidie dokáže s rostlinnými genomy pěkně zatřást. *Živa* 2.
- Skalińska M., 1966: Badania cyto-taksonomiczne nad rodzajem *Crocus* L. Cytotaxonomical studies in the genus *Crocus* L. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 9: 137 – 154.

Správa Krkonošského národního parku, 2010: Plán péče pro Krkonošský národní park a jeho ochranné pásmo na roky 2010 – 2020, KRNAP, Vrchlabí, Česká republika.

Stegmann M. B., et Gomez D. D., 2002: A brief introduction to statistical shape analysis. Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.

Suda J. et Pyšek P., 2010: Flow cytometry in botanical research: introduction. *Preslia* 82: 1-2.

Suda J., 2005: Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa* 1: 46 – 48.

Šourek J., 1969: Květena Krkonoš, Český a polský Krkonošský národní park. Academia, Praha, Česká republika.

Teppner H., 2003: Erfahrungen mit Ex-situ-Erhaltung im Botanischen Garten des Institutes für Botanik der Universität Graz. *Fritschiana* 39: 1–22.

Višňák R., 2016: Botanický průzkum v PP Lukášov. AOPK, Liberec, Česká republika.

Vyhláška 395/1992 Sb. ministerstva životního prostředí České republiky, kterou se provádějí některá ustanovení zákona České národní rady č. 114/1992 Sb.

Wetschnig W., 1988: Chromosomenzahlen Kärntner Gefäßpflanzen (Teil 1). *Carinthia* II 178: 391 – 401.

9 Seznam příloh

- 1) Taxonomie rodu *Crocus* dle Mathewa (1984)
- 2) Monitoring druhů *C. vernus* a *C. heuffelianus* dle NDOP
- 3) Popisná statistika morfologických znaků vyjádřená pomocí boxplotů
- 4) Hodnoty morfologických znaků na všech lokalitách
- 5) Fotodokumentace lokalit

10 Přílohy

10.1 Taxonomie rodu *Crocus* dle Mathewa (1984)

Subgenus *Crocus*

Section *Crocus*

Series Verni (VERN)

C. vernus, *C. tommasinianus*, *C. etruscus*, *C. kosaninii*, *C. baytopiorum*

Series Scardici (SCAR)

C. scardicus, *C. pelistericus*

Series Versicolores (VERS)

C. versicolor, *C. malyi*, *C. imperati*, *C. minimus*, *C. corsicus*, *C. cambessedesii*

Series Longiflori (LONG)

C. longiflorus, *C. nudiflorus*, *C. serotinus*, *C. niveus*, *C. goulimyi*, *C. ligusticus* (syn. *C. medius* hort, non Balbis)

(Mariotti, 1988)

Series Kotschyani (KOTS)

C. kotschyanus, *C. scharojanii*, *C. vallicola*, *C. autranii*, *C. karduchorum*, *C. gilanicus*, *C. ochroleucus*

Series Crocus (CROC)

C. sativus, *C. pallasii*, *C. thomasi*, *C. cartwrightianus*, *C. moabiticus*, *C. oreoreticus*, *C. asumaniae*, *C. hadriaticus*,

C. mathewii (Kerndorff et

Pasche, 1994), *C. naqabensis** (Al-Eisawi, 2001)

Section *Nudiscapus*

Series Reticulati (RETI)

C. reticulatus, *C. veluchensis*, *C. cvijicii*, *C. dalmaticus*, *C. sieberi*, *C. robertianus*, *C. cancellatus*, *C. hermoneus*,

C. abantensis, *C. angustifolius*, *C. ancyrensis*, *C. gargaricus*, *C. sieheanus*, *C. rujanensis*

(Randjelović et al., 1990)

Series Biflori (BIFL)

C. biflorus, *C. chrysanthus*, *C. almehensis*, *C. danfordiae*, *C. pestalozzae*, *C. aeri*, *C. cyprius*, *C. hartmannianus*,

C. adanensis, *C. leichtlinii*, *C. caspius*, *C. kerndorffiorum** (Pasche, 1993), *C. wattiorum** (Mathew, 1995; 2000),

*C. nerimaniae** (Yüzbasioğlu et Varol, 2004)

Series Orientales (ORIE)

C. korolkowii, *C. michelsonii*, *C. alatavicus*

Series Flavi (FLAV)

C. flavus, *C. antalyensis*, *C. olivieri*, *C. candidus*, *C. vitellinus*, *C. graveolens*, *C. hyemalis*, *C.*

*paschei** (Kerndorff, 1993)

Series Aleppici (ALEP)

C. aleppicus, *C. veneris*, *C. boulosii*

Series Carpetani (CARP)

C. carpetanus, *C. nevadensis*

Series Intertexti (INTE)

C. fleischeri

Series Speciosi (SPEC)

C. speciosus, *C. pulchellus*

Series Laevigati (LAEV)

C. laevigatus, *C. boryi*, *C. tournefortii*

Subgenus *Crociris* (CROCI)

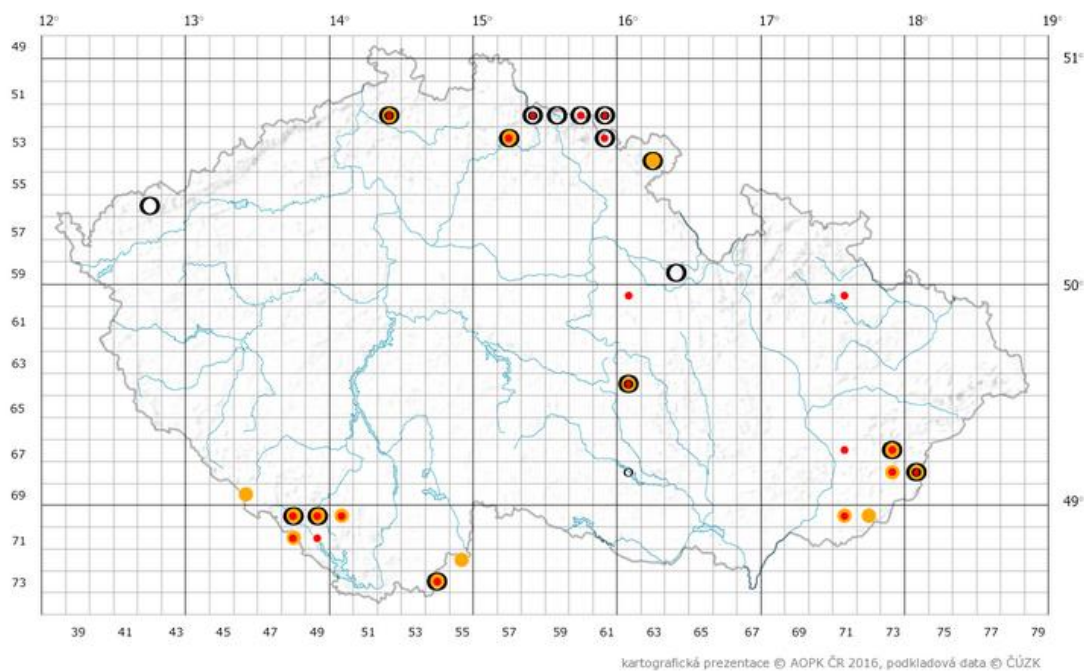
C. banaticus

Incertae cedis

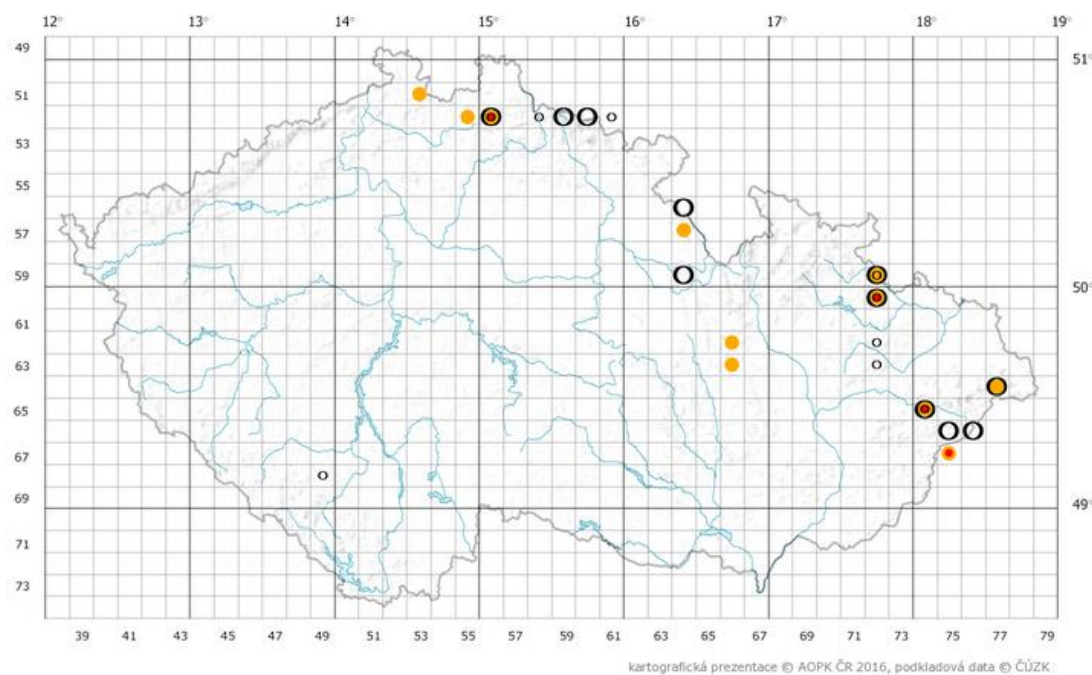
C. boissieri

(série *Crocus* = nynější série *Sativus*)

10.2 Monitoring druhů *C. vernus* a *C. heuffelianus* dle NDOP



Výskyt druhu *C. albiflorus* (*C. vernus*) podle záznamů v NDOP; AOPK, 2016.



Výskyt druhu *C. heuffelianus* podle záznamů v NDOP; AOPK, 2016.

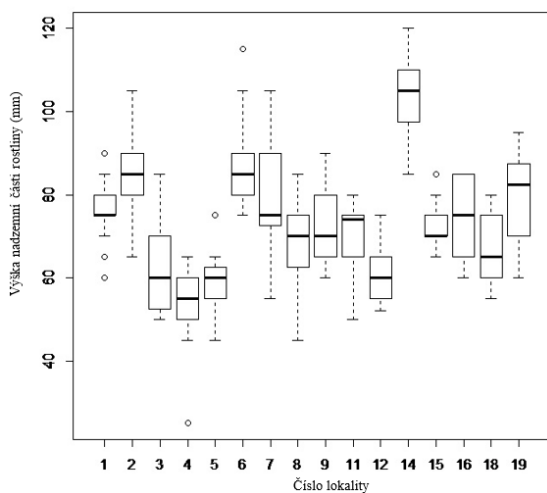
Legenda	
	Nálezy do roku 1949
	Nálezy v letech 1950 - 1989
	Nálezy v letech 1990 - 2009
	Nálezy od roku 2010

Legenda k mapám výskytu druhů *C. vernus* a *C. heuffelianus*.

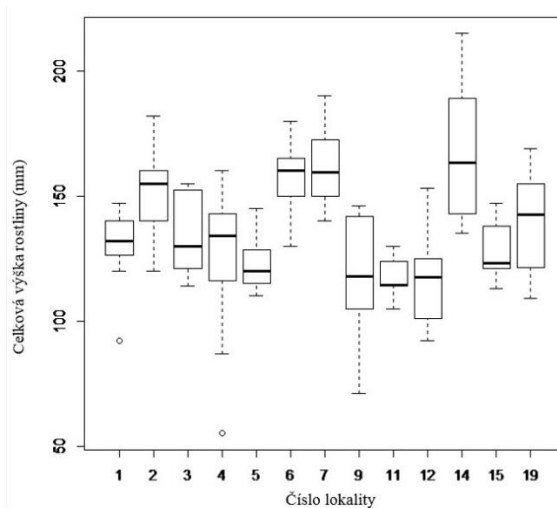
10.3 Popisná statistika morfologických znaků vyjádřená pomocí boxplotů

Krabičky znázorňují kvartily, tlustá čárka značí medián, vousy s úsečkami jsou extrémní hodnoty (minima a maxima) a prázdné jednotlivé body značí odlehle hodnoty. Veškeré hodnoty jsou uvedeny v milimetrech.

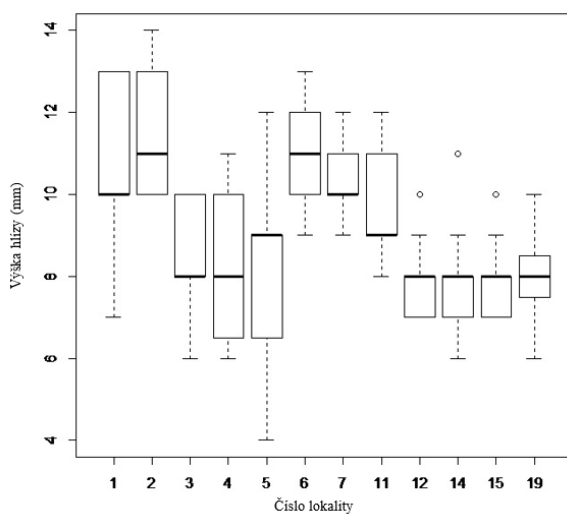
Výška nadzemní části rostliny



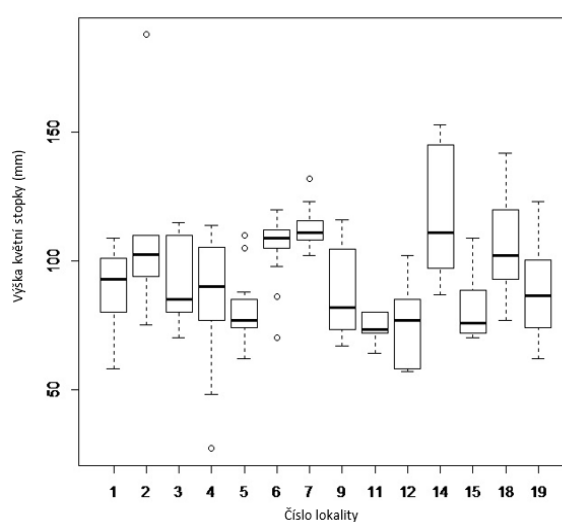
Celková výška rostliny



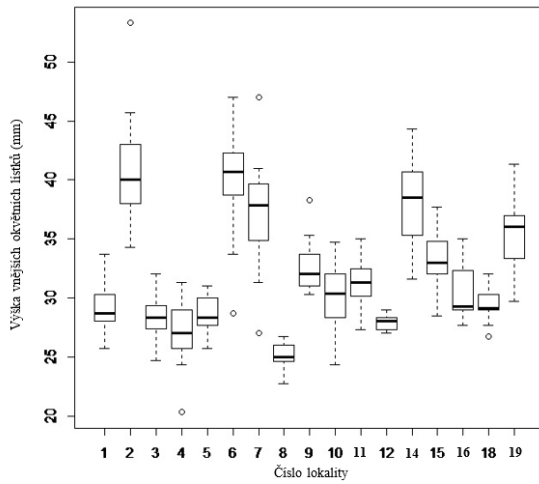
Výška hlízy



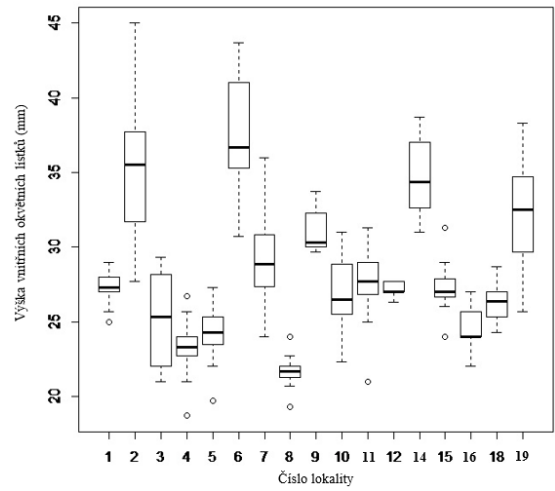
Výška květní stopky



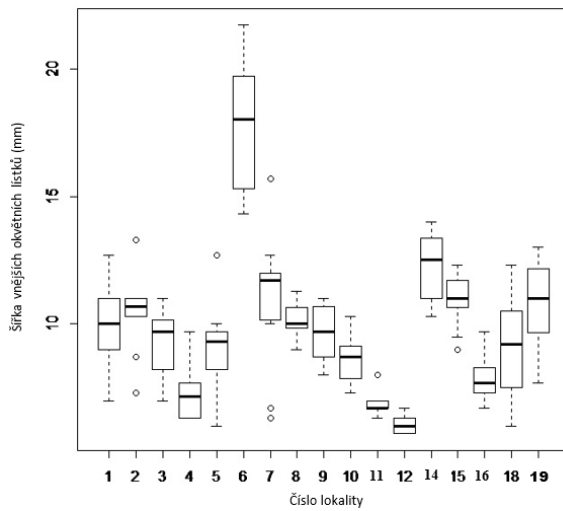
Výška vnějších okvětních lístků



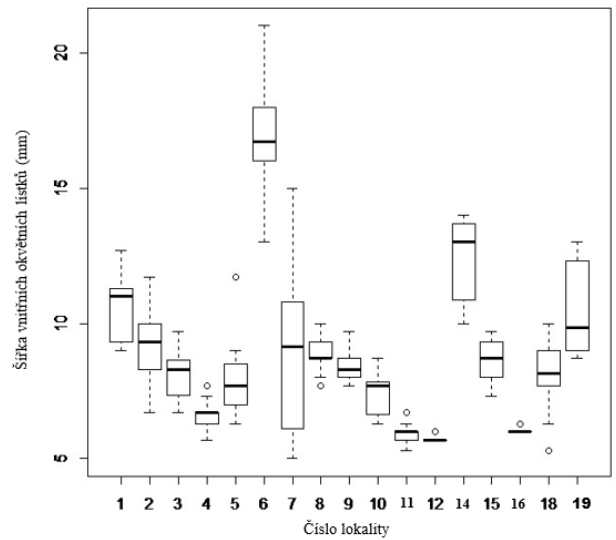
Výška vnitřních okvětních lístků



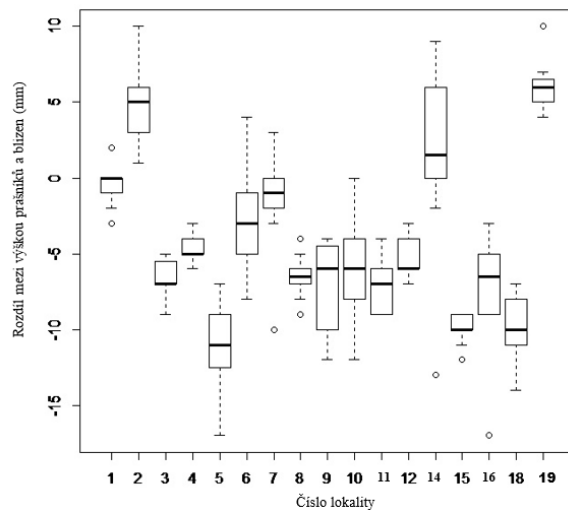
Šířka vnějších okvětních lístků



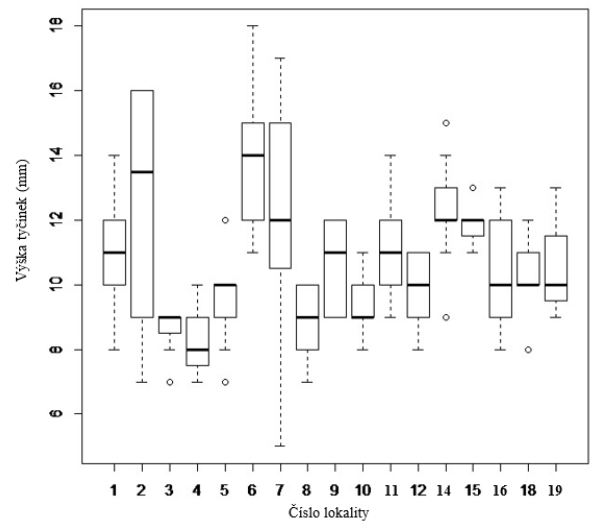
Šířka vnitřních okvětních lístků



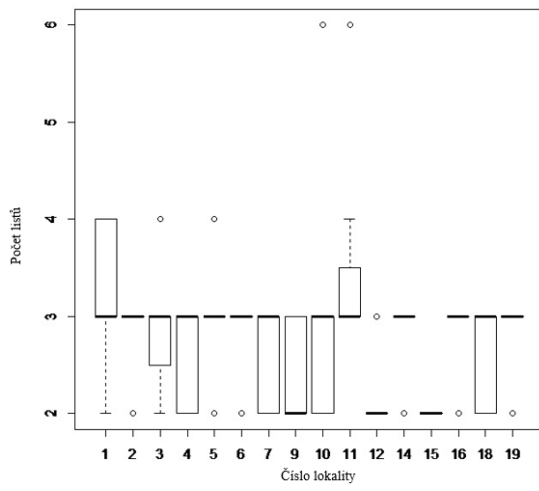
Rozdíl mezi výškou prašníků a blizen



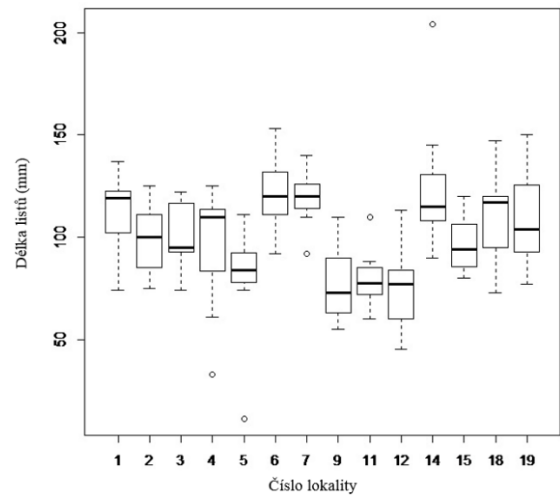
Výška tyčinek



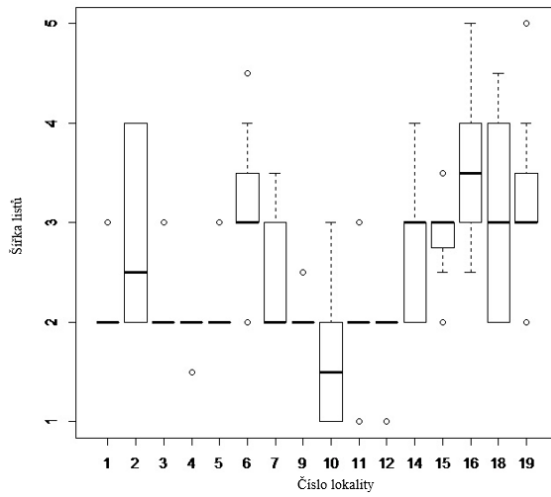
Počet listů



Délka listů



Šířka listů



10.4 Hodnoty morfologických znaků na všech lokalitách

Průměrné hodnoty na lokalitách														
		výška nadzemní části	celková výška	výška cibule	výška stonku	výška okv. l. vně	výška okv. l. vni	šířka okv. l. vně	šířka okv. l. vni	rozdíl mezi výškou blizny a prašníků	délka prašníků	počet listů	délka listů	šířka listů
1	Průměr	76,0000	130,8000	10,7333	91,0667	29,1467	27,2160	10,0693	10,6227	-0,4667	11,0667	3,3333	112,8000	2,2000
	± SD	7,3679	13,8935	1,9074	14,0533	2,0580	1,0589	1,4815	1,1188	1,1255	1,3870	0,6172	18,2530	0,4140
2	Průměr	85,3333	150,7000	11,5000	106,4000	41,1000	35,3500	10,4000	9,3000	5,2000	12,5000	2,9000	99,7000	2,8000
	± SD	10,7681	17,6197	1,4337	31,5778	5,5642	4,8351	1,5606	1,6746	2,5734	3,5040	0,3162	17,4104	0,9189
3	Průměr	61,6667	135,1429	8,5714	92,8571	28,3429	25,1286	9,2000	8,1000	-6,5714	8,5714	2,8571	101,4286	2,1429
	± SD	10,1183	17,8646	1,5119	18,4520	2,2999	3,4961	1,4537	1,0630	1,3973	0,7868	0,6901	17,4438	0,3780
4	Průměr	53,6667	127,3333	8,1333	86,2667	27,0860	23,2573	7,2573	6,5787	-4,6000	8,2000	2,6667	96,4000	1,9333
	± SD	10,0830	27,8534	1,8848	24,3735	2,6131	1,8508	0,9984	0,5267	0,9856	0,9411	0,4880	25,6259	0,1759
5	Průměr	59,6667	123,2667	8,2667	80,8000	28,6933	24,2267	9,0133	7,9133	-11,2667	7,9333	3,0667	82,6667	2,1333
	± SD	8,1211	10,5794	2,1202	13,2998	1,6096	1,9036	1,6190	1,3389	2,9391	5,6375	0,5936	22,8494	0,3519
6	Průměr	87,6667	158,9227	11,0000	105,3840	40,0920	37,4467	17,6533	16,6613	-2,6920	14,1533	2,9227	121,8467	3,0773
	± SD	11,1590	12,5895	1,0690	12,9589	4,5402	3,5064	2,2780	2,0711	2,7356	2,0649	0,2568	15,4866	0,7032

Průměrné hodnoty na lokalitách														
		výška nadzemní části	celková výška	výška cibule	výška stonku	výška okv. l. vně	výška okv. l. vni	šířka okv. l. vně	šířka okv. l. vni	rozdíl mezi výškou blizny a prašníků	délka prašníků	počet listů	délka listů	šířka listů
7	Průměr	79,1667	161,4167	10,3333	112,8333	37,2250	29,0333	10,9583	8,9250	-1,2500	12,2500	2,6667	119,4167	2,4583
	± SD	14,4338	15,5005	0,8876	8,2554	5,0600	3,1355	2,5332	2,9836	3,2228	3,3337	0,4924	11,6655	0,5823
8	Průměr	68,0000				25,0867	21,6713	10,1467	8,8000	-6,5733	8,9287			
	± SD	10,3164				1,2626	1,0347	0,7472	0,6514	1,2372	1,0996			
9	Průměr	72,0000	116,6667	8,2500	88,7143	33,0000	31,0436	9,6891	8,3782	-7,2727	10,5455	2,4545	77,3333	2,0455
	± SD	9,7980	27,5657	1,2583	19,9643	2,2878	1,3085	0,9311	0,5878	3,0361	1,3685	0,5222	20,6462	0,1508
10	Průměr	78,3333	118,3333	6,6667	79,2500	29,9167	26,9750	8,6092	7,3633	-6,0000	9,3000	2,7000	79,7500	1,6000
	± SD	2,8868	7,5056	0,5774	5,6199	2,9393	2,4121	0,9020	0,7667	3,2753	0,9582	1,3518	10,0457	0,6325
11	Průměr	69,3325	117,0000	9,6667	73,8333	31,1500	27,5275	7,0108	5,8892	-7,1817	11,0908	3,4542	79,2000	2,0000
	± SD	8,0453	8,7636	1,5055	6,0139	2,1308	2,6745	0,5089	0,3848	1,6959	1,3111	0,8907	12,4082	0,4264
12	Průměr	61,2000	115,3000	8,0000	74,2000	27,9333	27,1167	6,0800	5,7600	-5,4440	9,8890	2,1000	76,2220	1,8890
	± SD	6,6633	18,4334	0,9428	15,1203	0,7394	0,5269	0,4266	0,1342	1,3426	0,9938	0,3162	19,8090	0,3143

Průměrné hodnoty na lokalitách														
		výška nadzemní části	celková výška	výška cibule	výška stonku	výška okv. l. vně	výška okv. l. vni	šířka okv. l. vně	šířka okv. l. vni	rozdíl mezi výškou blizny a prašníků	délka prašníků	počet listů	délka listů	šířka listů
13	Průměr	107,5000	177,0000	10,0000	122,5000	41,8500	37,6000	11,5000	11,5000	6,0000	9,5000	2,5000	109,5000	2,0000
	± SD	3,5355	24,0416	0,0000	17,6777	2,6163	1,2728	0,2828	0,7071	0,0000	3,5355	0,7071	0,7071	0,0000
14	Průměr	103,6369	167,3000	7,8000	115,8000	38,2169	34,7000	12,2831	12,3500	1,5831	12,2500	2,7692	123,3631	2,7692
	± SD	10,0189	22,8912	1,2780	21,2321	3,6778	2,5106	1,2701	1,4964	5,4231	1,4216	0,4385	28,3233	0,6957
15	Průměr	72,2727	128,9091	7,8182	81,7273	33,3182	27,3273	10,9727	8,5727	-9,8182	11,9091	2,0000	96,2727	2,8636
	± SD	6,0678	11,8529	0,9816	12,5705	2,6091	1,8271	1,0219	0,7862	0,9816	0,7006	0,0000	13,6168	0,3931
16	Průměr	74,1667			128,5000	30,6600	24,5400	7,9400	6,0600	-7,8333	10,3333	2,8333	126,2500	3,5833
	± SD	10,6849			23,6178	2,6417	1,6989	1,0229	0,1200	4,9160	1,8619	0,4082	17,8480	0,9174
18	Průměr	66,5000	142,7500	8,5000	106,3330	29,4500	26,3100	9,2300	8,0500	-10,0000	10,1000	2,6000	110,3330	3,0000
	± SD	8,5147	31,5845	1,2910	19,4479	1,5981	1,3195	2,0500	1,3850	2,3570	1,3703	0,5164	21,8683	0,9129
19	Průměr	78,3333	138,4167	8,0833	88,4167	35,3000	32,4300	10,7275	10,4400	6,1667	10,4167	2,9167	109,3333	3,1667
	± SD	11,9342	19,7183	1,1645	18,1030	3,2286	3,3788	1,7405	1,5616	1,9924	1,3114	0,2887	21,4533	0,8348

10.5 Fotodokumentace lokalit

Fotografie byly pořízeny autorem práce, pokud není uvedeno jinak.

1) Babiččino údolí – *Crocus tommasinianus*



Celkový pohled na lokalitu.



Pohled na lokalitu zespodu. Můžeme vidět dva barevně různé typy rostlin *C. tommasinianus*.



C. tommasinianus světle fialové barvy.



C. tommasinianus fuchsiové barvy.



Detail květu rostliny s fuchsiovým květem.



Rostliny připravené k morfometrickému měření.

2) PP Zubří – *C. heuffelianus*



Celkový pohled na část lokality.



Celkový pohled na druhou část lokality.



Rostliny *C. tommasinianus*.



C. tommasinianus - detail květu z vrchu.



C. tommasinianus detailně z boku se zřetelně viditelnou kresbou ve tvaru „V“.



C. tommasinianus detailně z boku se zřetelně viditelnou kresbou ve tvaru „V“.

3) PP Lačnov – *C. vernus*



Celkový pohled na lokalitu.



Pohled na lokalitu vedle vyznačené PP.



Fialové rostliny *C. vernus* z boku s jasně viditelnými bílými okraji cípů, přechod mezi barvami je zoubkovaný.



Fialové rostliny *C. vernus* z boku s bílými okraji cípů.



Boční detail *C. vernus*. Jasně viditelná květní stopka v jiném odstínu fialové barvy.



Detail květu *C. vernus*. Zde jsou viditelné menší vnitřní okvětní lístky a větší vnější okvětní lístky.

4) PP Sucháčkovy paseky – *C. vernus*



Celkový pohled na lokalitu.



Pohled na lokalitu ze spodu.

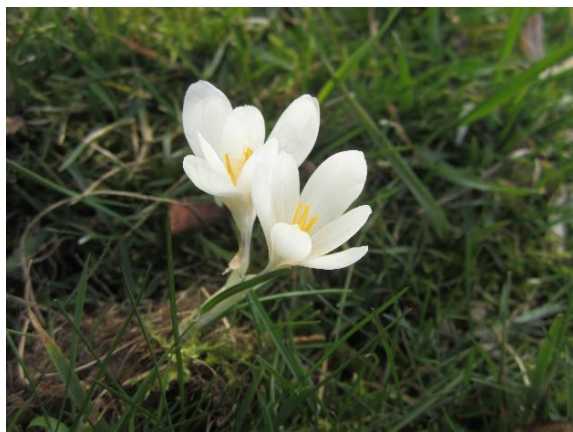


Rostliny *C. vernus* v detailu. Na rostlině uprostřed je dobře vidět bílý lem celého okvětního lístku.



Já při odběru vzorků, foto: Miroslav Kulich.

5) PP Za lesem – *C. vernus*



C. vernus se dvěma květy.



Detail květu s menšími vnitřními okvětními lístky a většími vnějšími okvětními lístky.

6) PP Lukášov - *C. vernus* agg.



Celkový pohled na lokalitu.



Detail světle fialového květu pouze s pěti okvětními lístky.



Bílý květ s tmavě fialovou květní trubkou.



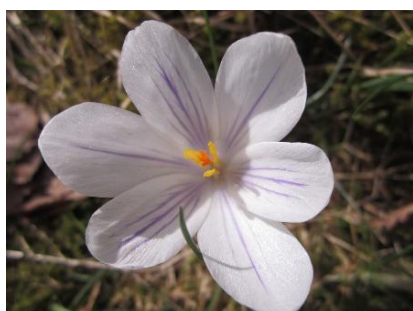
Světle fialový květ s tmavší květní trubkou.



Dvě různobarevné rostliny vedle sebe, jedna bílá a druhá s fialovými žilkami. Obě mají tmavě fialovou květní stopku.



Detail květů dvou různobarevných jedinců vedle sebe. Oba mají fialové žilkování, jeden však bohaté - větvené, a druhý jen tři proužky zevnitř okvětních lístků.



Detail světlého květu se slabým fialovým žilkováním (1 – 3 proužky).



Detail silně fialově žilkovaného květu. Žilkování je větvené.

7) PP Kytlice – *C. vernus* agg. 7



Celkový pohled na lokalitu.



Dva různě barevné typy *C. vernus* agg., jeden bílý se slabým žilkováním, druhý světle fialový také se slabým žilkováním. Květní stopka je tmavě fialová.



Dva různě barevné typy *C. vernus* agg., jeden bílý se slabým žilkováním, druhý téměř celý fialový s bílým lemem okvětních lístků. Květní stopka je tmavě fialová.



Atypický jedinec s výrazně tmavě fialovým květem se špičatými cípy.



Rostliny s bílými květy a světlým žilkováním z boku. Tmavě fialová barva květní stopky vybíhá poměrně vysoko do květu.



Detail květu se silným, fialovým, větveným žilkováním.



Detail květu rostliny se zcela odlišnými vnitřními a vnějšími okvětními lístky. Jak velikostně, tak barevně.



Detail květu nejsvětější rostliny na této lokalitě. Na okvětních lístcích má pouze jeden slabý fialový proužek.

8) PP Šafránová stráň – *C. vernus*



Celkový pohled na lokalitu.



Hustota populace zachycená fotografií z vrchu.



Dva jedinci *C. vernus* z boku. Zde je zřetelně viditelná modro – fialová barva a jejich lžícovitě vyduté okvětní lístky. U levého jedince vidíme typický tvar cípů jen pro tuto lokalitu.



Dvě rostliny *C. vernus* z boku z větší dálky. Vidíme, že květní trubky jsou v jiné, o něco tmavší fialové barvě. Je zde zřetelně viditelná modro – fialová barva květů a jejich lžícovitě vyduté okvětní lístky.



Detail květu *C. vernus* z vrchu se špičatým zakončením.



Detail květu z vrchu se zaokrouhleným zakončením.

9) Hrochova louka – *C. vernus*



Celkový pohled na lokalitu.



Fotografie z vrchu se zachycenou hustotou populace.



Rostliny s nejsvětleji fialovými květy a výraznými tmavě fialovými květními stopkami, jejichž barva vyběhá až do poloviny květu.



Rostliny s bílými a „přechodovými“ (bílá/světle fialová) květy a výraznými tmavě fialovými květními stopkami, jejichž barva vyběhá vysoko do květu.



Rostliny s čistě bílými květy a výraznými tmavě fialovými květními stopkami, jejichž barva vyběhá vysoko do květu.



Rostliny se světle fialovými květy a výraznými tmavě fialovými květními stopkami, jejichž barva vyběhá až do poloviny květu. Tato skupinka šafránů je jich před odkvětem.

10) U Dána – *C. vernus*



Tmavě fialová rostlina *C. vernus*. Květní trubka má jiný odstín tmavě fialové barvy.



Rostlina *C. vernus* s bílým květem. Květní trubka má tmavě fialovou barvu.



Rostlina *C. vernus* s žilkovaným květem. Květní trubka má tmavě fialovou barvu.



Fialový *C. vernus* při měření morfologických znaků.

11) U Čerta – *C. vernus*



Celkový pohled na lokalitu, v pozadí pension Čert s č. p. 58.



Fialové rostliny *C. vernus* se zachycenou hustotou populace.



Bíle a fialově kvetoucí rostliny *C. vernus*.



Fialové rostliny *C. vernus* před odkvětem. Zde jsou zřetelně viditelné fialovo – fuchsiové květní stopky, jejichž barva vyběhá do okvětních listků. Tyto dvě barvy pak v sebe plynule přechází.

12) Dolní Albeřice – *C. vernus*



Celkový pohled na lokalitu.



Boční detail jedince *C. vernus* s tmavě fialovou květní trubkou.



Dvě zcela bílé rostliny *C. vernus*.



Rostliny s tmavě fialovými květními stopkami, jejichž barva mírně vybíhá do květu.

13) Malá Úpa – *C. vernus* a *C. heuffelianus*



Celkový pohled na lokalitu.



Tmavě fialové rostliny *C. heuffelianus* s výrazně jinak tmavě fialovými květními trubkami.



Bíle kvetoucí rostlina *C. vernus* s fialovou květní stopkou.



Světle fialově kvetoucí rostliny *C. vernus* s výrazně tmavě fialovými květními trubkami, jejichž barva vybíhá vysoko do květu.

14) Polsko – *C. heuffelianus*



Jedinec s výrazně špičatými cípy okvětních lístků.



Rostlina se špičatými okvětními lístky během morfologického měření.

15) Anenské údolí – *C. vernus*



Bílá rostlina se zaokrouhlenými okvětními lístky a bílou květní stopkou.

Bílá rostlina se zaokrouhlenými okvětními lístky a bílou květní stopkou.

16) PP Vyšný – Křišťanov – *C. vernus*



Celkový pohled na lokalitu.



Bližší celkový pohled na lokalitu.



Pohled z boku na bílé rostliny *C. vernus*. U levého jednice si můžeme všimnout slabě viditelné proužky na květní stopce.



Detail květu rostliny z vrchu se zcela bílou květní stopkou.

17) Strážný - Pod hájovnou – *C. heuffelianus*



Celkový pohled na lokalitu.



Rostlina fialového jedince *C. heuffelianus* téměř před odkvětem. Listy už jsou dlouhé a převyšují květ.

18) PP Strážný - Pod Obecním lesem – *C. vernus*



Celkový pohled, na prasaty rozrytou, lokalitu z blízka.



Celkový pohled na lokalitu z dálky. V pozadí je můj taťka, který mi s mapováním pomáhal.



Bílo – fialové rostliny z boku.



Detail květů bílo – fialových rostlin. Zřetelně viditelná fialová kresba, jako kdyby byly okvětní lístky natřené uprostřed štětcem.



Dvě pouze bílé rostliny *C. vernus*.



Pouze bílé rostliny *C. vernus*. Zde je zřetelně vidět průhlednost okvětních lístků.

19) Luisino údolí – *C. heuffelianus*



Celkový pohled na lokalitu. Vzádu je umístěna meteorologická stanice. Foto: Miroslav Kulich.



Rostlina *C. heuffelianus* během morfologického měření.



Tmavě fialový *C. heuffelianus*, foto: Miroslav Kulich.