

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí

Studie taxonomického komplexu
***Pinguicula vulgaris* za použití AFLP markerů**
a průtokové cytometrie se zaměřením na
středoevropské taxony

Válová Lenka

Diplomová práce

předložená na Katedře ekologie a životního prostředí
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
jako součást požadavků na získání titulu Mgr.
v oboru Ochrana přírody

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Martin Dančák, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: RNDr. Ľuboš Majeský

Olomouc 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Martina Dančáka, Ph.D. a jen s použitím citovaných literárních zdrojů.

V Olomouci 5. května 2013

Poděkování

Ráda bych poděkovala doktoru Martinu Dančákovi, bez kterého by práce nikdy nemohla vzniknout, za jeho trpělivost, odborné rady a především za pomoc při korekci práce. Ale nejen díky němu jsem byla schopna práci dokončit. Proto bych ráda poděkovala také Mgr. Blance Brandové, Mgr. Michaele Jandové, RNDr. Ľuboši Majeskému, RNDr. Milanu Kitnerovi, Ph.D. a Mgr. Michalu Hronešovi za pomoc při řešení konkrétních problémů a nálad laboratoře. Na konec největší dík patří mým přátelům, především Romče, Peli, Lucce, Míše, Fíkovi, Václavovi, Radimovi.... Nerada bych zapomněla snad na ty nejdůležitější, na mé rodiče, bez jejich psychické a finanční podpory by jsem to nikdy nedotáhla tak daleko, děkuji :-).

Věnování

Práci bych chtěla věnovat všem akademickým pracovníkům, kteří přistupují ke tudentům jako ke kolegům a neberou je jako další pořadové číslo :o).

Válová L. (2013) Studie taxonomického komplexu *Pinguicula vulgaris* za použití AFLP markerů a průtokové cytometrie, se zaměřením na středoevropské taxony. Diplomová práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc, 40 stran, v češtině.

Abstrakt

Práce se zabývala problematikou taxonomie komplexu *Pinguicula vulgaris* se zaměřením na středoevropské taxony: i) *P. vulgaris* var. *vulgaris*, ii) *P. vulgaris* var. *bicolor* a iii) *P. bohemica*. Ve střední Evropě se nejčastěji vyskytuje *P. vulgaris* var. *vulgaris*, občas je nalézána také dvoubarevná varieta *bicolor*. *Pinguicula bohemica* se vyskytuje pouze v oblasti České křídové tabule a byla popsána jako endemit ČR. *Pinguicula vulgaris* var. *bicolor* a *P. bohemica* jsou si morfologicky velmi podobné, často je proto jejich taxonomická úroveň diskutována a zpochybňována. Vztahy v rámci tohoto komplexu ve střední Evropě nebyly dosud uspokojivě vysvětleny a nebyly studovány hlouběji pomocí moderních molekulárních metod. V práci byly využity dvě metody, metoda AFLP a průtoková cytometrie. Metodou AFLP jsme analyzovali celkem 64 rostlin z 14 populací z České a Slovenské republiky a ze Skandinávie (Norsko, Švédsko). Za použití 7 primerových kombinací bylo získáno 100 markerů, z nich 37 bylo polymorfních. U studovaných populací/taxonů byla zjištěna nízká klonalita a vysoká genotypová diverzita, přičemž byl polymorfismus velice nízký. Vysoká homogenita populací byla patrná i z nízkých hodnot genové diverzity (heterozygosity). Genetické markery charakteristické pro jednotlivé populace byly přítomny pouze u 5 z celkového počtu 14 populací. Největší podíl molekulární variability (64,53 %) jsme zjistili mezi jednotlivými populacemi. Na základě podobností docházelo k shlukování jedinců do skupin, což bylo patrné z klastrovacích analýz. Průtokovou cytometrií bylo provedeno měření relativního množství DNA u 116 jedinců všech 3 taxonů pocházejících z 9 lokalit. Získané výsledky neprokázaly výrazné rozdíly v obsahu jaderné DNA mezi zkoumanými taxony, a lze tedy předpokládat stejnou ploidní úroveň u všech 3 taxonů. Výsledky práce naznačují, že jak *P. bohemica* tak *P. vulgaris* var. *bicolor* spadají do variability *P. vulgaris*. *Pinguicula bohemica* by tedy mohla být hodnocena hodnotit spíše jako varieta *P. vulgaris* podobně jako *P. vulgaris* var. *bicolor*.

Klíčová slova: *Lentibulariaceae*, *Pinguicula*, AFLP, průtoková cytometrie, střední Evropa.

Válová L. (2013) Study of taxonomical group of *Pinguicula vulgaris* using AFLP and flow cytometry with focus on central European taxa, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, 40 pp., in Czech.

Abstract

The study dealt with the taxonomical complex of *Pinguicula vulgaris* and was focused on the central European taxa: i) *P. vulgaris* var. *vulgaris*, ii) *P. vulgaris* var. *bicolor* and iii) *P. bohemica*. In the central Europe *P. vulgaris* var. *vulgaris* is more common than its variety *P. vulgaris* var. *bicolor*. *Pinguicula bohemica* occurs only in the area of Česká křídová tabule and is considered an endemic species of the Czech Republic. *Pinguicula vulgaris* var. *bicolor* and *P. bohemica* are morphologically very similar and therefore their taxonomical status is very often discussed. To date the relations within this complex have not been adequately elucidated nor analyzed by using of modern molecular methods. Two methods were used in this study – AFLP and flow cytometry. First, in total 64 plants from 14 populations from the Czech and Slovak Republic and from Scandinavia (Norway, Sweden) were analyzed by the method AFLP. Using seven primer combinations we obtained 100 markers and out of them 37 were polymorphic. There was found very low clonality and high genotype diversity in the studied populations/taxa. However, at the same time the polymorphism remained very low. The homogeneity was obvious also from the low values for the gene diversity (heterozygosity). Genetic markers which are unique for the particular populations were found only in 5 out of total 14 populations. The highest proportion of molecular variability (64.53%) was revealed within the particular populations. According to similarities the individuals created groups which were distinguishable also in the cluster analysis. Secondly, the flow cytometry was employed for the evaluation of the relative amount of DNA in 116 individuals from three taxa which came from 9 localities. The results did not show any considerable differences in the amount of nuclear DNA among the given taxons and thus it might be assumed that the ploidy level is same in all three taxa. According to the results, it can be assumed that both *P. bohemica* and *P. vulgaris* var. *bicolor* belong to the variability of *P. vulgaris*. *Pinguicula bohemica* might be categorized rather as variety of *P. vulgaris* similarly as *P. vulgaris* var. *bicolor*.

Keywords: *Lentibulariaceae*, *Pinguicula*, AFLP, flow cytometry, central Europe

Obsah

Seznam obrázků	v
Seznam tabulek	vi
Seznam příloh.....	vii
1 Úvod.....	1
2 Materiál a metody	12
2.1 Průtoková cytometrie	12
2.2 Molekulární metoda AFLP	14
3 Výsledky	20
3.1 Průtoková cytometrie	20
3.2 AFLP	21
4 Diskuze.....	28
5 Souhrn	35
6 Literatura	36
7 Přílohy	41

Seznam obrázků

Obrázek 1.: Sken polyakrylamidového gelu	18
Obrázek 2.: Grafický výstup metody průtokové cytometrie	20
Obrázek 3.: Neighbour-joining Tree.....	25
Obrázek 4.: Neighbor Network	26
Obrázek 5.: Výstup Bayesiánské klastrovací analýzy STRUCTURE.....	27
Obrázek 6.: Izolace	45
Obrázek 7.: Ligace.....	45
Obrázek 8.: Preamplifikace	46
Obrázek 9.: Amplifikace.....	46

Seznam tabulek

Tabulka 1.: Seznam lokalit použitých v naší studii.....	13
Tabulka 2.: Výsledky analýzy průtokové cytometrie.....	21
Tabulka 3.: Primery a primerové kombinace.....	21
Tabulka 4.: Souhrn hodnot genetické variability u populací.....	22
Tabulka 5.: Souhrn hodnot variability zjištěné u tří taxonů.....	22
Tabulka 6.: Výsledky analýzy molekulární variance (AMOVA) mezi 3 taxony.....	23
Tabulka 7.: Výsledky analýzy molekulární variance (AMOVA) mezi a uvnitř 14.....	24
Tabulka 8.: Složení premixu pro restrikci.....	43
Tabulka 9.: Složení premixu pro ligaci.....	43
Tabulka 10.: Složení premixu pro preamplifikaci.....	43
Tabulka 11.: PCR protokol pro preamplifikaci.....	44
Tabulka 12.: Složení premixu pro amplifikaci.....	44
Tabulka 13.: PCR protokol pro amplifikaci.....	44

Seznam příloh

Příloha 1.: Použité roztoky.....	42
Příloha 2.: Složení premixů.	43
Příloha 3.: Dokumentace výstupů izolace a jednotlivých fází AFLP.....	45

1 Úvod

Diplomová práce se věnuje problematice taxonomických vztahů v rámci skupiny *Pinguicula vulgaris* agg. na území ČR. V České republice jsou známy pouze dva původní druhy tohoto rodu: *Pinguicula bohemica* Krajina a *P. vulgaris* L. (Bělohlávková 2000). *Pinguicula bohemica* je českým endemitem vyskytujícím se v současné době pouze v oblasti Českolipska na dvou mikrolokalitách (Shnilé louky, Baronský rybník) a na dnes již jediné společné lokalitě v NPR Polabská Černava u obce Mělnická Vrutice. V dřívější době byl její výskyt udáván i z dalších lokalit (Holandský rybník, Novozámecký rybník, Pod Konvalinkovým vrškem, Všetaty, Čečelice, Dřisy, Čelákovice, Dvorce), které však byly vlivem zemědělské činnosti, především odvodňování a zaorávání, nenávratně zničeny (Studnička 1986). Druhým zástupcem rodu na našem území je *Pinguicula vulgaris*, můžeme se s ní setkat především v horských a podhorských oblastech naší republiky. Tento druh není morfologicky uniformní jako *P. bohemica*, a vyskytuje se v několika formách či ekotypech a to nejen v rámci svého areálu, který je rozsáhlý, ale i v rámci České republiky (Casper 1966, Bělohlávková 2000, Bernátová 2010). V české i světové literatuře proto už od doby objevení *P. bohemica* debata zda tento druh nemůže být pouze formou, varietou či ekotypem *P. vulgaris*.

Rod *Pinguicula*

Tučnice jsou rodem masožravých rostlin patřících do čeledi *Lentibulariaceae* L.C.M. Richard – bublinatkovité. Tato čeleď má pouze masožravé zástupce, ke kterým krom tučnic – *Pinguicula* L. patří rod *Genlisea* St. Hil. a *Utricularia* L. (Bělohlávková 2000). Dříve byly do čeledi řazeny i dva další rody, a to *Polypomphylyx* a *Biobularia* (Jobson et al. 2003). Tyto dva, původně rody, jsou v současné době řazeny do rodu *Utricularia* (Jobson et al. 2003). Zástupci čeledi *Lentibulariaceae* jsou vytrvalé, zřídka jednoleté byliny, často vodní, bažinné nebo i epifytické. Kořeny (vyjma rodu *Pinguicula*) chybějí. *Lentibulariaceae* tvoří s cca 325 druhy více než polovinu všech známých masožravých rostlin (Müller et al. 2006). Zástupci této čeledi se vyskytují ve všech klimatických pásech severní i jižní polokoule. Centrum diverzity se nachází v tropech až subtropích jižní polokoule (Bělohlávková 2000).

Rod *Pinguicula* zahrnuje vytrvalé terestrické, vzácně epifytické byliny, u nichž hlavní kořen zaniká a je nahrazen adventivními kořeny. Listy vyrůstají v přízemní růžici, mohou být přisedlé nebo řapíkaté, celokrajné, okraj je nadvinutý, vzácně podvinutý. Jsou dužnaté, na svrchní straně porostlé žláznatými chlupy (vylučujícími sliz) a přisedlými žlázkami (vylučujícími trávící šťávy). Stvol nese jediný květ, který může být až 6 cm velký. Koruna může být zbarvena bělavě, růžově, červenofialově, modrofialově, vzácně žlutě. Kalich je pětičetný, dvoupyský, horní pysk je dvoulaločný, dolní trojlaločný. Nitky jsou zploštělé. Prašníky jsou kulovité, druhotně jednopouzdré, introrzní. Semeník je žláznatě chlupatý, čnělka je velmi krátká a tlustá, vytrvávající. Blizna je téměř přisedlá, nestejně dvoulaločná, ukrytá uvnitř korunní trubky. Tobolky jsou vejcovité obsahující velké množství semen (stovky). Semena jsou drobná a jejich tvar je vřetenovitá (Bělohávková 2000).

V současné době je uváděno okolo 100 zástupců rodu (Degtjareva et al. 2006, Rodondi et al. 2010, Yildirim et al. 2012). Tento počet pravděpodobně není konečný, neboť jsou stále popisovány nové druhy. Jako příklad si můžeme uvést *Pinguicula habilitii* Yildirim, Şenol & Pirhan popsanou v roce 2012 z jihozápadní Anatólie v Turecku (Yildirim et al. 2012) či *P. Christiane* Peruzzi & Gestri popsanou tento rok při revizi v severních Apeninách, Itálie (Peruzzi & Gestri 2013).

Zástupci rodu se vyskytují téměř na všech kontinentech, výjimkou je Austrálie a Antarktida. Výskyt v Africe je omezen pouze na severovýchod kontinentu. Nacházejí se ve všech klimatických pásích severní i jižní polokoule, od nížin do vysokých horských poloh. V rámci rodu můžeme vyčlenit tři hlavní vývojová centra. První centrum se nachází ve Střední Americe, druhé na jihovýchodě Severní Ameriky a na Velkých Antilách (Neotropis). Třetí centrum se nachází v Evropě (Holarktis) (Casper 1966, Bělohávková 2000).

Tučnice jsou děleny podle dvou hledisek. Jedním je hledisko taxonomické a druhým ekologické. Ekologické hledisko poměrně dobře koresponduje s vývojovými centry rodu. Casper (1966) z tohoto hlediska tučnice, rozdělil do 2 růstových typů a ty posléze do 2 typických variant. Tím vznikly 4 skupiny: 1a) Tropické homofylní – odpovídají vývojovému centru v oblasti stálého subtropického klimatu na Jihozápadě USA a na Velkých Antilách se zastoupením starobylých druhů. Zástupci jsou tzv. homofylní tučnice, jejich listová růžice zůstává během celého roku neměnná; 1b) Tropické heterofylní – odpovídají vývojovému centru nacházejícímu se v blízkosti prvního a to ve středním Mexiku. Zde jsou tučnice přizpůsobeny chladnějšímu

a suššímu počasí, což se projevuje tvorbou letních a zimních růžic. Zbývající dvě skupiny 2a) Mírného pásma homofylní a 2b) Mírného pásma heterofylní, zahrnují společně poslední vývojové centrum nacházející se v jižní Evropě. Tučnice, které zde nalézáme, jsou zvláštní a to především odlišnou strategií přežití. Na rozdíl od svých příbuzných z tropických a subtropických oblastí Ameriky se většina evropských tučnic musela přizpůsobit nepříznivým klimatickým podmínkám v zimním období (především mrazu). Toto období proto přečkávají ve formě takzvaného hibernakula. U některých autorů (např. Studnička 1988) se můžeme setkat s rozdělením pouze do 3 skupin, a to na 1) Tučnice s přezimovacími pupeny (dormantní), odpovídající skupinám 2a a 2b dle Caspera, 2) Tučnice s dvojtvarými růžicemi (sezónně heterofylní) odpovídají skupině 1b podle Caspera a 3) Tučnice s jednotvarými růžicemi (homofylní) odpovídající 1a podle Caspera.

Druhé hledisko, taxonomické, bylo poprvé formulováno De Candollem (De Candolle 1844). Jeho klasifikace, založená na morfologických znacích (symetrie květu, rozměr korunní trubky a barva korunních laloků aj.), obsahovala 32 v té době známých druhů a ty dělila do 3 částí/sekcí: *Orcheosanthus* (všechny středoamerické druhy), *Brandonia* (pouze žlutokvětý severoamerický druh *P. lutea*) a *Pionophyllum* (zbývající druhy). Nové vnitrorodové členění publikoval Barnhart (1916), který rozlišoval rovněž tři skupiny: *Pionophyllum*, *Isoloba*, *Temnoceras*. V průběhu času, díky zkoumání květní morfologie, docházelo k úpravám a nejrůznějším změnám (např. Ernst 1961 nebo Cieslak et al. 2005). K zásadní změně v pohledu na taxonomii tučnic došlo v monografii S.J. Caspera (Casper 1966). V díle byla provedena důkladná revize rodu, která nebyla dodnes překonána a tak tento systém až na malé změny platí dodnes. Casper (1966) v něm přiznává 48 taxonům úroveň druhu, rozdělených podle 7 hlavních znaků do 3 podrodů (*Isoloba*, *Temnoceras*, *Pinguicula*) a 12 sekcí: 1) podrod *Isoloba* Barnhart – koruna s válcovitou trubicí, v pohledu zepředu s cípy víceméně stejnými, takže rozčlenění koruny na dva pysky není nápadně patrné (tzv. izolobní a subizolobní typy). Zúžení korunní trubky v krátkou ostruhu je náhlé. Ve zbarvení koruny se alespoň částečně uplatňuje i žlutá barva. Podrod zahrnuje tučnice s jednotvarými růžicemi (homofylní) a s různotvarými růžicemi (heterofylní). Podrod *Isoloba* je rozdělen do 5 sekcí: *Isoloba* Casper, *Agnata* Casper, *Discoradix* Casper, *Heterophyllum* Casper a *Cardiophyllum* Casper. 2) podrod *Temnoceras* Barnhart – koruna nápadně dvoupyská, střední cíp dolního pysku výrazně větší než cípy postranní. Trubka nálevkovitá, plynule přecházející v krátkou ostruhu. V trubce 3 řady chlupů. Ve

zbarvení koruny se podobně jako u předešlého podrodu uplatňuje žlutá barva. Jsou zde zahrnuty horské až vysokohorské homofylní tučnice z Latinské Ameriky, ale i druhy z arktických a alpských území Asie a Evropy, tvořící hibernakula. Podrod *Temnoceras* je rozdělen na 3 sekce: *Temnoceras* Barnhart, *Ampullipalatum* Casper a *Micranthus* Casper. 3) podrod ***Pinguicula*** Casper – koruna výrazně dvouypyská, trubka nálevkovitá, často velmi krátká, ostruha alespoň z déli trubky, často velmi dlouhá. Chlupy v korunní trubce nejsou nikdy uspořádány ve 3 řadách. Na zbarvení koruny se nepodílí žlutá barva (výjimka je *P. villosa*). Podrod zahrnuje jednak druhy s různotvarými letními a zimními růžicemi, adaptované na suchou periodu, jednak druhy tvořící hibernakula, adaptované na studenou periodu (výjimkou je monotypická sekce *Homophyllum*). Podrod *Pinguicula* je rozdělen na 4 sekce: *Homophyllum* Casper, *Orcheosanthus* DC., *Crassifolia* Speta et Fuchs a *Pinguicula* Casper (Studnička 1988). Jak je vidět z popisu podrodů, taxonomické a ekologické dělení nekorespondují. Jednotlivé ekologické skupiny můžeme nalézt v různých podrodech/sekcích.

Hlavní taxonomické znaky

Jak bylo již zmíněno, v prvních pokusech o vytvoření taxonomického systému, byly spatřovány jako hlavní znaky, znaky morfologické – symetrie květu, rozměr korunní trubky a barva korunních laloků (De Candolle 1844). Postupem času byly přidávány další znaky, především díky podrobnějšímu zkoumání květní morfologie (Ernst 1961). V 60. letech minulého století Casper (1966) uvedl jako základní taxonomické znaky: 1) habitus a růstová/životní forma; 2) embryo a kořen; 3) list; 4) zimní pučení/pupeny, mladé cibulky, výhonky/odnože; 5) ochlupení; 6) květní poměry; 7) plod a semena. Ale ani tyto znaky dnes nestačí a do taxonomie jsou zařazovány znaky jako tvar a velikost pylu (př. Rodondi et al. 2010; Tsymbalyuk et al. 2008; Sohma 1975; Shuka et al. 2007), počty děloh embrya (př. Studnička 1986; Degtjareva et al. 2006) a také znaky molekulární. Rod byl molekulárně v posledních letech studován opakovaně, např. Zamora et al. (1996) popisuje nové druhy *Pinguicula submediterana* G. Blanca, M. Jamilena, M. Ruiz–Rejon, R. Zamora a *P. mundi* Blanca, Jamilena, Ruiz–Rejón & Zamora. Ve své studii krom jiného použil metodu Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), kterou byly porovnávány čtyři evropské druhy. V jiných studiích byly zkoumány také ribozomální sekvence ITS intronů (např. Degtjareva et al. 2006). Ve studii Degtjarevové (Degtjareva et al. 2006) je zahrnuto 29 taxonů, na kterých se

autorka snaží vysvětlit evoluci embrya právě pomocí nrITS sekvencí. Jobson et al. (2003) se pokusil pomocí sekvence plastidového intronu *rps16* a *trnL-F* regionu plastidové DNA vysvětlit fylogenetické vztahy mezi třemi rody čeledi *Lentibulariaceae*. Studie byla provedena na 75 druzích, z čehož 12 patřilo k rodu *Pinguicula*. Cieslak et al. (2005) vyvozuje fylogenetické závěry z nukleotidových sekvencí chloroplastového genu *matK* a *trnK* a sady 32 morfologických znaků. Analýza takového datasetu potvrdila existenci pěti hlavních fylogenetických linií v rodu.

V taxonomii tučnic hrají důležitou roli také počty chromozomů, které byly nejvíce diskutovány především v taxonomických a evolučních debatách během 30. až 60. let 20. století. V této době se předpokládalo, že rostliny s vyšším chromozomovým číslem mají větší šance na přežití v extrémních podmínkách (př. doby ledové). Z toho faktu se usuzovalo, že nestabilní podmínky prostředí podporují zvyšování počtu chromozomů a tím zvýšení frekvence polyploidie populací z jihu na sever. V dnešní době se k tomuto tvrzení přistupuje volněji (Casper et al. 2009). Přesto je stále počet chromozomů považován za velice užitečný odraz evolučních procesů (Peruzzi 2004; Casper et al. 2009). U tučnic se setkáváme se základními chromozomovými čísly $x = 6, 8, 9, 11$ a 14 . Ploidní úroveň je $2x$ (diploid), $4x$ (tetraploid), $8x$ (oktoploid) až $16x$ (hexadekaploid). Základní chromosomová čísla $x = 8$ a 11 jsou velice běžné, čísla $x = 6, 9$ a 14 jsou méně častá, přičemž číslo $x = 14$ naznačuje možné křížení v minulosti (Casper et al. 2009). Základní chromozomové číslo $x = 8$ se vyskytuje v celém areálu rodu a nalezneme ho i v různých sekcích rodu. Skupina s chromozomovým číslem $x = 8$ vykazuje především ve Starém světě tendenci k polyploidii, proto naprostá většina druhů je tetraploidních a vyskytují se i oktoploidní a hexadekaploidní, na rozdíl od Nového světa, kde převažují diploidi. Můžeme proto obecně říci, že čím mladší druh, tím vyšší ploidní úroveň. Uvedme si například *P. vulgaris* s počtem $2n = 64$, patřící mezi nejmladší druhy, z čehož vyplývá i její morfologická proměnlivost. U tohoto druhu je také známa cytotypová variabilita ($8x$ a $16x$).

Variabilita druhu *P. vulgaris*

Velké problémy v taxonomii sekce *Pinguicula* působí její relativní evoluční mládí a s tím související morfologická neustálenost u některých zástupců. Asi nejtypičtějším příkladem je *Pinguicula vulgaris*. Proměnlivost u tohoto druhu se projevuje především ve velikosti a tvaru korunních i kališních cípů, barvě koruny, listové růžici aj.

Bělohlávková (2000) uvádí příklady malokvětých rostlin popisovaných jako var. *gypsophila* (Wellr.) Domin, var. *minor* Koch či f. *micrantha* Ruthe. Rostliny s nápadně velkými květy z lokality Cibulka v Praze byly popsány jako var. *macrantha* Tausch. Rostliny se zakrňelou nebo i chybějící ostruhou byly popsány jako f. *ecalcarata* Domin. Mezi nejznámější formy *P. vulgaris* patří f. *bicolor* (Nordstend) Neumann (= *P. bicolor* Woloszczak), která se odlišuje bílými korunními laloky, modrou korunní trubkou a ostruhou. Jedinci se zcela bílou korunou nazývaní f. *albida* (Behm) Neumann jsou nalézáni ve Skandinávii, východním Pobaltí a ve Velké Británii (Yolande 2004, Bělohlávková 2000). Bělohlávková (2000) také uvádí, že „druh je významněji proměnlivý jen v barvě koruny“, jde podle ní převážně o stanovištní modifikace, pro taxonomii málo významné. Casper (1966) z mnoha morfologických forem považoval za významné pouze dvě a to: *Pinguicula vulgaris* f. *bicolor* a *P. vulgaris* f. *albida*, přičemž nadnesl otázku, zda by *P. vulgaris* f. *albida* neměla být zahrnuta do komplexu „*bicolor*“. Podle Bernátové (Bernátová 2010) má *Pinguicula vulgaris* velkou proměnlivost, a to daleko větší, než se uvádí v dřívějších pracích (např. Casper 1966). Ve své práci zmiňuje 5 relativně stálých forem: 1) jednobarevná, čistě bílá koruna; 2) dvoubarevná koruna s bílými laloky horního i dolního pysku koruny; 3) dvojbarevná koruna s dvojbarevným pyskem, laloky horního pysku modrofialové, dolního pysku bílé; 4) dvojbarevná koruna s modrofialovými laloky dolního i horního pysku, korunní trubka čistě bílá; 5) celá koruna modrofialová s bílou skvrnou v ústí hrdla trubky na spodním pysku koruny.

Jednotlivé odchylky *P. vulgaris* se často popisují na různých taxonomických úrovních. Jako příklad si ukažme soupis všech synonym *Pinguicula vulgaris* uváděných Casperem (Casper 1966): „*P. alpina* WEBER, Spicileg. fl. Goetting. (1778) 1 – PETER, Fl. Südhannover I (1901) 252 – *P. arctica* EASTWOOD in Coult. Bot. Gaz. 33 (1902) 293 – *P. bohémica* KRAJINA in Mem. Soc. sc. Bohéme 1926, nr. 15 (1927) 1 – *P. grandiflora* POLLINIUS, Fl. Veron. I (1822) 24/25 pr.p.1 – *P. vulgaris* var. *gaveana* BEAUVERD in Bull. Soc. Bor. Genève sér. 2, XI (1911) 324 – *P. vulgaris* var. *genuina* SCHINZ & KELLER, Fl. Schweiz II, ed. II (1905) 201 – *P. vulgaris* var. *grandiflora* COSSON & GERMAIN DE SAINT-PIERRE, Fl. Par. ed. I (1845) 304 – *P. vulgaris grandiflora* FRIES, Summa beget. Scand. (1846) 20 – *P. vulgaris* β) *grandiflora* HARTMANN, C.J. & C., Handb. Skand. Flora (1870) 70 – *P. vulgaris gypsophila* WAGNER, Ill. Dt. Fl. ed. III (1905) 639 – *P. vulgaris b*) *gypsophila* REICHENBECH fil., Icon. fl. Germ. Helv. 20 (1862) 145 – *P. vulgaris* β) *gypsophila* FUSS, Fl.

Transsilv. excurs. (1866) 529 – *P. vulgaris* var. *leptoceras* SAMPAIO, Fl. Portuguesa, ed. 2 (1946) 495 – *P. vulgaris* s.-v. *maior* COSSON & GERMAIN DE SAINT-PIERRE, Fl. Paris, ed. II (1861) 374 – *P. vulgaris* var. *macrantha* LAMOTTE, Prodr. fl. pl. centr. France (1881) 510 – *P. vulgaris micrantha* FRIES, Summa veget. Scand. (1846) 20 – *P. gypsophila* WALLROTH in Linnaea 4 (1840) 533 – *P. leptoceras* SCHUR, Enum plant. Trans. (1866) 547 – *P. norica* BECK in Österr. bot. Z. 62 (1912) 41 – *P. villosa* GUNNER, Fl. norveg. II (1772) 71 – *P. vulgaris* var. *alpestris* MARCAIS in Pevue Bot. 8 (1890) 565 – GENTY ap. MOROT, J. Bot. 5 (1891) – *P. vulgaris* ssp. *alpicola* ROUY, Consp. fl. France (1927) 205 – *P. vulgaris* race *P. alpicola* ROUY, Fl. France XI (1909) 202 – *P. vulgaris* var. *alpicola* CHENEVARD in Bull. herb. Boiss. Sér. 2, III (1903) 295 – *P. vulgaris* β *alpicola* KOCH, Synops. fl. Germ. Helv. ed. I (1837) 578 – *P. vulgaris* γ *alpicola* PERRIER DE LA BATHIE, Cat rais. pl. vasc. Savoie II (1928) 170/180 – *P. vulgaris* ssp. *bohemica* DOSTÁL, Květena ČSSR (1950) 1358 – *P. vulgaris* var. *coerulea* BRIQUET in Ann. Cons. Jard. Bot. Genève 3 (1899) 105 – *P. vulgaris* ssp. *euvulgaris* DOSTÁL, Květena ČSSR (1950) 1358 – *P. vulgaris* var. *minor* MAYER, Fl. Hannover exc. (1849) 430 – *P. vulgaris* β *minor* KOCH, Taschenb. Dt. Schweiz. Fl. (1848) 417 – *P. vulgaris* var. *obtusata* NORDSTEDT apud KROK in Bot. Not. (1863) 15 – *P. vulgaris* β *obtusata* SOMMERFELT, Suppl. fl. Lapponicae (1826) 2 – *P. vulgaris* var. *pratensis* WILLKOMM, Führer Pfl. Dtschl., Österr., Schweiz, ed. II (1882) 548 – *P. vulgaris* α *pratensis* KOCH, Taschenb. Dt. Schweiz. Fl. (1848) 417 – *P. vulgaris* var. *tenuior* FRIES, Summa veget. Scand. (1846) 20 – *P. vulgaris* β *tenuior* WAHLENBERG, Fl. Lapponica (1812) 10 – *P. vulgaris* f. *semiflava* NEUMANN, Sveriges Flora (1901) 119 – *P. vulgaris* α *typica* FIORI & PAOLETTI, Fl. anal. D'Italia III (1900/02) 87 – *P. vulgaris* var. *uliginosa* GENTY apud MOROT, J. Bot. 5 (1891)“.

Taxonomické postavení druhu *Pinguicula bohemica* v odborné literatuře

V Květeně ČR (Bělohlávková 2000) nalezneme taxon *Pinguicula bohemica* uváděný jako plnohodnotný druh s výskytem pouze v oblasti České křídové tabule, což z ní činí českého endemita. Náhled odborné veřejnosti na tento druh však není jednotný. Tučnice česká byla popsána v třicátých letech 20. století z Polabí (Hrabanovská Černava u Lysé nad Labem) botanikem V. Krajinou (Krajina 1927). Krajina si povšiml odlišné barvy květu od tučnice obecné, která se vyskytovala v té době poměrně běžně na vhodných

lokalitách v rámci České křídové tabule. Již v této době byly známy odchylky v barvě koruny od běžného modrofialového zbarvení druhu *P. vulgaris*, které byly popsány jako *P. vulgaris* var. *bicolor* (Woloszczak 1889) a *P. vulgaris* f. *albida* (Neumann 1901). Není proto překvapivé, že Domin (1934–1936) nepovažoval morfologické znaky za dostačující pro uznání druhové úrovně a označil tučnici českou pouze za poddruh *P. vulgaris* (*P. vulgaris* L. subsp. *bohemica* (Krajina) Domin). Stejný názor přetrvával i v padesátých letech a tučnice česká se v Dostálově Květeně a Klíči objevuje jako *P. vulgaris* subsp. *bohemica* (Dostál 1950, 1958). V Klikově práci (Klika 1947) má úroveň variety a v Ernstově monografii (Ernst 1961) je už dokonce uváděna pouze jako synonymum *P. vulgaris*. Stejného názoru jako Ernst byl i Casper (1962, 1966), který uvádí tučnici českou v monografii rodu *Pinguicula* jako varietu tučnice obecné a považuje ji za lokální typ *P. vulgaris*.

Novou pozornost věnovali tučnici české především čeští botanici (př. Hadač 1977; Kubát 1986; Studnička 1981, 1984, 1986, 1987). Asi největší zásluhu na novém uznání tučnice české jako druhu měla dizertační práce M. Studničky (Studnička 1989), který se problematice taxonomického postavení *P. bohemica* věnoval velice podrobně. Ve své práci staví především na morfologických znacích: velikost listů (sledována měřením průměru růžice), délka stvolu, délka koruny, tvar cípů kalicha, poměr šířky středního a postranního cípu dolního pysku koruny, poměr délky ostruhy k délce ostatní koruny i poměr délky k šířce tobolky, počtu listů fertálních rostlin, rozměry semen aj. Ve své práci se věnoval také počtu chromozomů, který uvádí jako $2n = 32$.

Další prací, která podporuje postavení *P. bohemica* jako samostatného endemického druhu, je práce Bělohávkové (Bělohávková 1989), která uvádí stejně jako Studnička (1989), jako zásadní morfologické znaky barvu koruny, velikost ostruhy, tvar kališních cípů a tvar tobolky. Ty považuje za dostačující k odlišení druhu. Ve své práci ale uvádí počet chromozomů $2n = 64$, což odporuje Studničkovým zjištěním (Studnička 1984, 1986, 1989). Chromozomový počet přitom je považován u tučnic za taxonomicky zásadní znak.

V následujících letech se proto druh začal objevovat i v dalších studiích, např. Krahulcové a Jarolímové (Krahulcová & Jarolímová 1991), které se kriticky pozastavují nad problematikou jeho chromozomových počtů. Ve své studii potvrdily výsledek zjištěný již Bělohávkovou (Bělohávková 1989), a to $2n = 64$, což by znamenalo, že *P. bohemica* je oktoploidem stejně jako *P. vulgaris*. Další studií věnující se přímo problematice *P. bohemica* byla práce Studničky a Hejného (Studnička & Hejný 1992),

kteří se opět snaží opřít o morfologické znaky, především v rámci koruny a jejího zbarvení. Také je znovu otevřena otázka chromozomových počtů, kdy je uváděno u *P. bohemica* $2n = 32$, které publikoval Studnička již v dřívějších studiích (Studnička 1984, 1986, 1989). V českých pracích je nadále *P. bohemica* převážně uváděna na úrovni druhu, což je s největší pravděpodobností způsobeno respektováním Květeny ČR (Bělohávková 2000), ve které je tučnice česká uvedena jako samostatný druh. Už v Klíči ke Květeně ČR (Kubát 2002), je ale *P. bohemica* uvedena jen jako poddruh *P. vulgaris*. Na druhové úrovni je také přijímána v některých zahraničních pracích (Degtjareva 2006). Některé práce, které se věnují taxonomii, naopak taxon vůbec nezmiňují ani v synonymice *P. vulgaris* (Legendre 2000, Blanca 2001).

Mohlo by se zdát, že definitivním závěrem by mohlo být potvrzení druhového statutu monografem rodu *Casperem* (Casper & Stimper 2009), který přiznává chybu při hodnocení tučnice české ve svých dřívějších pracích (Casper 1962, 1966) a uvádí, že *Pinguicula bohemica* by již neměla být zaměňována s *P. vulgaris*. Casper & Stimper (2009) také potvrzují chromozomový počet $2n = 32$ a současně nevylučují ani počet $2n = 64$ (stejně jako Krahulcová a Jarolímova 1991), což by znamenalo výskyt tetra i oktoploidů ve stejné populaci. Tento rozpor se snaží vysvětlit možností introgrese a zároveň upozorňují na potřebu dalších studií.

V posledních letech se proměnlivostí *P. vulgaris* v Západních Karpatech zabývala Bernátová (2010). Její studie se věnovala proměnlivosti v barvě korunních laloků, jejichž vysoká variabilita v západokarpatských populacích *P. vulgaris* vedla autorku ke zpochybnění statusu *P. bohemica* na úrovni druhu i hodnocení jejího endemizmu.

Amplified fragment length polymorphism – AFLP

DNA sekvence jsou v dnešní době jedním z hlavních zdrojů informací pro molekulární fylogenetické studie. Pro studium na úrovni rodů a vyšších úrovní je využíván široký rozsah sekvencí různých genů jaderného a plastidového genomu. Pro studie mezi blízce příbuznými rody nebo druhy často sekvence neukazují dost rozdílů a nejsou dostačující pro odvození fylogenetických vztahů. Na nižších taxonomických úrovních je proto vhodnější využití jiných markerů (Koopman 2005). Nejčastěji používanými molekulárními metodami jsou RFLPs – Restriction Fragment Length Polymorphisms, RAPDs – Random Amplified Polymorphic DNAs, mikrosatelity nebo SSR – Simple

Sequence Repeats, ISSRs – Inter Simple Sequence Repeats, a AFLPs – Amplified Fragment Length Polymorphisms.

Metoda AFLP je založena na selektivní PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifikaci restričních fragmentů DNA. Je vhodná pro analýzu polymorfismu na úrovni celé genomické DNA bez předchozí znalosti konkrétní DNA sekvence (Vos et al. 1995). Metoda vyniká vysokou mírou opakovatelnosti a výsledky jsou dobře reprodukovatelné a spolehlivé. Získané markery mohou být dále izolovány, klonovány, sekvenovány a použity na přípravu dalších molekulárních markerů nebo pro jiné účely. Při použití různých kombinací primerů je možno získat unikátní sekvence amplifikovaných fragmentů (Weising et al. 2005).

Metoda AFLP probíhá v několika krocích:

- 1) Restrikce – kdy je DNA naštípána několika restričními enzymy (nejčastěji dvěma enzymy: MseI a EcoRI). Výsledkem jsou různě dlouhé fragmenty nastříhané DNA mající na koncích fragmentů jednovláknové přesahy o velikosti několika bází.
- 2) Ligace – na volné konce se komplementárně vážou tzv. adaptory (synteticky vytvořené krátké úseky dvouřetězcové DNA o známé sekvenci). Napojení adaptorů s konci restričních fragmentů zajišťuje enzym T4 DNA ligáza.
- 3) Preamplifikace (tzv. preselektivní amplifikace) – PCR reakce probíhá s dvojicí primerů, které mají sekvenci komplementární k sekvenci adaptorů a obsahují jednu tzv. selektivní bázi navíc. Výsledkem PCR jsou fragmenty s MseI adaptorem na jednom konci a EcoRI adaptorem na druhém konci. Díky prodloužení o jednu selektivní bázi se amplifikuje pouze 1/16 restričních fragmentů z celkového počtu fragmentů vzniklých v prvním kroku.
- 4) Amplifikace (selektivní amplifikace) – PCR reakce probíhá s použitím primerů komplementárních k adaptorům prodloužené o tři nebo více selektivních bází. Tím je počet fragmentů opět redukován a amplifikuje se pouze 1/256 fragmentů (Vos et al. 1995, Herbstová et al. 2008, Hloušková 2011).
- 5) Hodnocení může probíhat pomocí horizontální agarosové elektroforézy (přesnost na desítky párů bází), vertikální polyakrylamidové elektroforézy (přesnost až na jednotlivé páry bází) nebo pomocí sekvenátoru.

Metoda AFLP byla v rámci čeledi *Lentibulariaceae* použita v několika málo studiích pouze u rodu *Utricularia* (Kameyama et al. 2005; Kameyama & Ohara 2006). U zbylých rodů *Pinguicula* ani *Genlisea* metoda AFLP nebyla zatím použita.

Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie začala být v botanickém světě využívána od osmdesátých let minulého století, kdy se stala důležitou metodou pro odhad obsahu jaderné DNA, určení ploidní úrovně DNA a analýzy buněčného cyklu (Loureiro 2006). Metoda je založena na měření optických vlastností izolovaných jader, která procházejí společně s nosnou tekutinou úzkým prostorem, na který je zaměřen silný paprsek (zdroj) světla (Doležal et al. 1997). Její velkou výhodou je její rychlost a jednoduchost ve srovnání s klasickými metodami počítání chromozomů. Je tak možno změřit desítky či dokonce stovky vzorků během jednoho dne (Suda et al. 2006). Metoda dále umožňuje testovat více vzorků najednou, což umožňuje rychlý a rozsáhlý screening. Další nespornou výhodou je možnost použití téměř jakékoli části rostliny (např. listy, stonky, kořeny, semena). Tímto se liší od metody roztlakových preparátů, kde je zapotřebí buněk s aktivně probíhajícím mitotickým dělením. U průtokové cytometrie není zapotřebí velkého množství rostlinného pletiva, což je příznivé především u studií, kde jsou testovány vzácné či ohrožené druhy a získání materiálu na testování je problematické (Suda et al. 2006).

I přes dnešní běžnost metody průtokové cytometrie, byla metoda na rodu *Pinguicula* zkoušena pouze orientačně v bakalářské práci Válové (Válová 2011), kde bylo otestováno pouze několik jedinců. Metoda zatím nebyla použita ani u příbuzných rodů *Utricularia* a *Genlisea*.

Cíle práce

Komplex druhu *P. vulgaris* je ve střední Evropě komplikovaný a prozatím nebyl zkoumán za pomoci moderních molekulárních metod. Cílem této práce není podat jasné taxonomické stanovisko, ale přispět novými informacemi k poznání těchto druhů a jejich ochraně.

Hlavními cíli (otázkami) práce jsou:

- Mají rostliny *P. vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor* a *P. bohemica* stejnou ploidní úroveň?
- Jsou populace *P. vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor* a *P. bohemica* v České, Slovenské republice a ve Skandinávii geneticky variabilní?
- Je variabilita u těchto taxonů větší mezi populacemi nebo uvnitř populací?
- Prolíná se genetická variabilita studovaných taxonů?

2 Materiál a metody

Ve studii byly použity dvě metody. Metoda průtokové cytometrie a metoda AFLP. Rostlinný materiál použitý pro práci byl sbírán z lokalit v rámci České a Slovenské republiky. Populace byly zvoleny tak, aby byly zastoupeny všechny tři taxony potřebné pro studii – *Pinguicula vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor*, *P. bohemica*. Pro molekulární metodu AFLP byl použit i materiál ze skandinávských populací a druh *P. hirtiflora* byl použit jako outgroup. Veškeré rostliny použité při této metodě byly kultivovány ve skleníku Katedry botaniky.

2.1 Průtoková cytometrie

2.1.1 Rostlinný materiál

Pro potřeby průtokové cytometrie byly použity rostliny z 9 lokalit. Populační vzorek představovalo od 1 do 18 jedinců. Seznam rostlin a lokalit je uveden v Tabulce 1.

2.1.2 Měření množství DNA

Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru značky Partec PAS (Partec GmbH, Münster) vybaveným argonovým laserem (488 nm) na Katedře botaniky UP v Olomouci, za použití metody vnitřního standardu se známým obsahem DNA (Doležal et al. 2007). Jako standard byla použita *Zea mays* L. – kukuřice setá (2C = 5,43 pg DNA).

Na Petriho misce bylo v 1 ml LB01 pufru o pH 7,5 (Doležal et al. 1997) společně nasekáno žiletkou přibližně stejné množství standardu jako vzorku a přefiltrováno přes nylonový filtr do kyvety. K homogenizátu se ihned napipetovalo 50 µl fluorescenčního barviva PI (propidium iodid) a vzniklý roztok byl důkladně protřepán. Takto připravený vzorek se před měřením uložil na 1 h 30 min do ledničky.

Poměr relativního množství DNA byl stanoven podle vzdálenosti mezi G1 vrcholy standardu a vzorku zobrazenými na lineární stupnici grafického výstupu (512 – kanálová škála; Doležal et al. 2007).

Tabulka 1.: Seznam studovaných populací. Země původu: AL – Albánie, CZ – Česká republika, N – Norsko, S – Švédsko, SK – Slovenská republika; n (p.c.) – počet jedinců použitých pro metodu průtokové cytometrie; n (AFLP) – počet jedinců použitých pro metodu AFLP.,

kód populace	země	lokality	nadmořská výška	taxon	n (p.c.)	n (AFLP)	zeměpisná šířka	zeměpisná délka
VU-SK-1	S	střední Švédsko, břeh jezera Havern	210 m n. m.	<i>P. vul. var. vulgaris</i>		3	62°16'06"N	15°07'03"E
VU-SK-2	N	jižní Norsko, vlhké skály u silnice, mezi městy Haugastøl – Ustaoset	980 m n. m.	<i>P. vul. var. vulgaris</i>		4	60°30'15"N	07°56'49"E
VU-SK-3	S	severovýchodní Švédsko, příkop u silnice, nedaleko města Höglund	440 m n. m.	<i>P. vul. var. vulgaris</i>		4	64°34'34"N	15°47'01"E
VU-SK-4	S	jižní Švédsko, SV od města Fagersta, skály u silnice	200 m n. m.	<i>P. vul. var. vulgaris</i>		4	60°01'28"N	15°36'48"E
VU-SK-5	N	jihovýchodní Norsko, rašeliniště u jezera Varaldsjøen	250 m n. m.	<i>P. vul. var. vulgaris</i>		4	60°06'13"N	12°28'28"E
VU-ČR-6	CZ	Šumava, podmáčená louka, 600 m JV od Nového Údolí	850 m n. m.	<i>P. vul. var. vulgaris</i>	14	3	48°49'32"N	13°48'04"E
VU-ČR-7	CZ	Šumava, zrašelinělá louka, 500 m JV od obce Keply	945 m n. m.	<i>P. vul. var. vulgaris</i>		4	49°11'34"N	13°20'43"E
VU-SR-8	SK	Podtatranská kotlina, Vážecké lúky, 2 km S od obce Vážec	800 m n. m.	<i>P. vul. var. vulgaris</i>		4	49°04'48"N	19°58'20"E
BI-SR-1	SK	Malá Fatra, zrašelinělá louka na západním okraji snice Vrícko, (Malá Fatra, Vrícko)	620 m n. m.	<i>P. vul. var. bicolor</i> <i>P. vul. var. vulgaris</i>	18 12	3	48°57'19"N	18°40'07"E
BI-SR-2	SK	Malá Fatra, PR Močiar, rašeliniště SZ od obce Stankovany	443 m n. m.	<i>P. vul. var. bicolor</i>	6	3	49°09'11"N	19°09'08"E
BI-SR-3	SK	Chočské vrchy, okraj turistické cesty, SV od obce Valaská Dubová	800 m n. m.	<i>P. vul. var. bicolor</i>		3	49°08'36" N	19°18'03"E
BI-ČR-4	CZ	Moravská brána, Štramberk: mokřady v bývalém lomu Dolní Kamenárka	425 m n. m.	<i>P. vul. var. bicolor</i>	16	10	49°08'36" N	19°18'03"E
BO-ČR-1	CZ	Ralská pahorkatina, Shnilé louky, slatiniště	260 m n. m.	<i>P. bohémica</i>	12	10	50°36'00"N	14°36'09"E
BO-ČR-2	CZ	Ralská pahorkatina, Baronský rybník, slatiniště	260 m n. m.	<i>P. bohémica</i>		5	50°36'10"N	14°37'22"E
-	CZ	Středolabská tabule, NPR Polabská Černava, JZ od obce Mělnická Vrutice (NPR Polabská Černava)	185 m n. m.	<i>P. vul. var. vulgaris</i> <i>P. bohémica</i>	13 1		50°20'30"N	14°32'28"E
-	SK	Strážovské vrchy, PR Šujské rašelinisko, JV od obce ŠUJA	476 m n. m.	<i>P. vul. var. bicolor</i>	6		49°03'44"N	18°37'13"E
-	SK	Velká Fatra, NPR Rakšianské rašelinisko, východně od obce Rakša (NPR Rakšianské rašelinisko)	520 m n. m.	<i>P. vul. var. bicolor</i> <i>P. vul. var. vulgaris</i>	6 1		48°52'46"N	18°53'29"E
-	CZ	Hrubý Jeseník, NPR Praděd, vlhký svah naprotě chatě Ovčárna	1305 m n. m.	<i>P. vul. var. vulgaris</i>	11		50°04'14"N	17°14'19"E
HI-1	AL	Albanie		<i>P. hirtiflora</i>		2		

2.2 Molekulární metoda AFLP

2.2.1 Rostlinný materiál

Pro molekulární analýzy byly použity rostliny ze 14 populací. Populační vzorek představovalo od 3 do 10 jedinců (Tabulka 1). Seznam rostlin a lokalit je uveden v Tabulce 1.

2.2.2 Izolace genomické DNA

Izolace genomické DNA byla provedena v Laboratoři molekulárních markerů Katedry botaniky UP Olomouc s použitím protokolu Doyle & Doyle (1987). Protokol byl přizpůsoben ve spolupráci s Lubošem Majeským.

Postup izolace:

- 1) Listy (cca 200 mg, očištěné od nalepených bezobratlých) homogenizujeme v dusíku za použití třecích misek a tloučku. Homogenizovaný materiál přeneseme do ependorfek naplněných 700 μ l 2% CTAB pufru s 1% PVP a 2 μ l β ME, který byl zahřát na 65 °C. Inkubujeme při teplotě 65 °C nejméně 1h.
- 2) Po inkubaci do ependorfek přidáme 700 μ l směsi CHF:IAA (chloroform a isoamylalkohol v poměru 24:1), pořádně protřepeme a centrifugujeme (13 000 RPM, 15 minut, 10 °C).
- 3) Horní fázi (cca 500 μ l) přeneseme do nově připravených ependorfek s 500 μ l CHF:IAA, protřepeme a opět centrifugujeme (13 000 RPM, 15 minut, 10 °C).
- 4) Horní fázi (cca. 400 μ l) přeneseme do nově připravených ependorfek s 400 μ l isopropanolu, promícháme a necháme precipitovat při teplotě 4 °C alespoň 30 minut.
- 5) Následně roztok centrifugujeme (13 000 RPM, 15 minut, 4 °C), po centrifugaci slijeme supernatant a pelet necháme proschnout volně na vzduchu. Po proschnutí rozpustíme v 200 μ l 10x TE pufru.
- 6) Přidáme 0,5 μ l Rnázy (10 μ g/ml) a inkubujeme při 37 °C 30 minut.
- 7) Přidáme 20 μ l NaAC a 440 μ l EtOH zchlazeného v mrazničce při -20 °C, necháme precipitovat při teplotě 4 °C alespoň 30 minut.
- 8) Centrifugujeme (13 000 RPM, 15 minut, 4 °C), vzniklý pelet promyjeme 80% EtOH, centrifugujeme (13 000 RPM, 10 minut, 10 °C), promyjeme 70% EtOH, centrifugujeme (13 000 RPM, 10 minut, 10 °C).

9) Pelet vysušíme a rozpustíme v 50 μ l 1x TE pufru.

Ke stanovení koncentrace vyizolované DNA byl použit NanoDrop ND–1000 Spektrofotometr (NanoDrop Technologies, Delaware, USA). Kvalita vyizolované genomické DNA byla ověřena pomocí 1% agarózové elektroforézy.

2.2.3 Amplified fragment length polymorphisms (AFLP)

Pro AFLP analýzy byly všechny vzorky naředěny na koncentraci 50 μ g/ μ l. Metoda AFLP sledovala protokol Vos et al. (1995) s úpravami podle publikace Kitner et al. (2008). Všechny kroky vyžadující použití termálního cycleru byly prováděny na přístroji Peltier Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research, Delaware, USA). Složení premixu pro jednotlivé kroky je uvedeno v příloze (Tabulkách 8. až 13.) a bylo poskytnuto Dr. M. Kitnerem z Laboratoře molekulárních markerů Katedry botaniky PřF UP v Olomouci. Pro zvolení vhodných primerových kombinací s dostatečným počtem hodnotitelných polymorfních markerů bylo nejprve testováno 18 primerových kombinací. Z nichž sedm bylo vybráno pro vykazující heterogenitu a jasnost markerů. Z nich bylo zvoleno 7 kombinací (Tabulka 3.) ukazujících heterogenitu a dobrou zřetelnost získaných markerů.

Úspěšnost jednotlivých kroků PCR reakcí byla kontrolována pomocí 1% agarózového gelu. Konečná separace namnožených fragmentů byla prováděna pomocí vertikální elektroforézy na 6% polyakrylamidovém gelu a vizualizována barvením pomocí stříbra (přesnost cca 1–2 páry bází).

Příprava gelů a vizualizace vzorků:

- 1) **Agarózový gel (1%)** – na přípravu gelu bylo použito 0,35 g agarózy, která byla rozpuštěna v 35 ml 0,5 x roztoku TBE v mikrovlnce. Po rozpuštění a částečném ochlazení byla do roztoku přidána netoxická barvička GelGreen (Biotium, Inc.). Pro vizualizaci pohybu vzorků v gelu byly vzorky před napipetováním do ztuhlého gelu obarveny smícháním s 1 μ l barvičky se vzorkem. Vlastní separace fragmentů DNA byla prováděna v 0,5 x zředěném TBE pufru na horizontální elektroforéze při napětí 300 V a čase 10 min. Po uplynutí času separace byl gel vyndán z elektroforézy a zdokumentován ofocením pod UV osvětlením.
- 2) **Polyakrylamidový gel (6%)** – pro přípravu gelu byly připraveny skla (velké a malé), mezi které se naléval gel. Malé sklo bylo umyto saponátem a důkladně

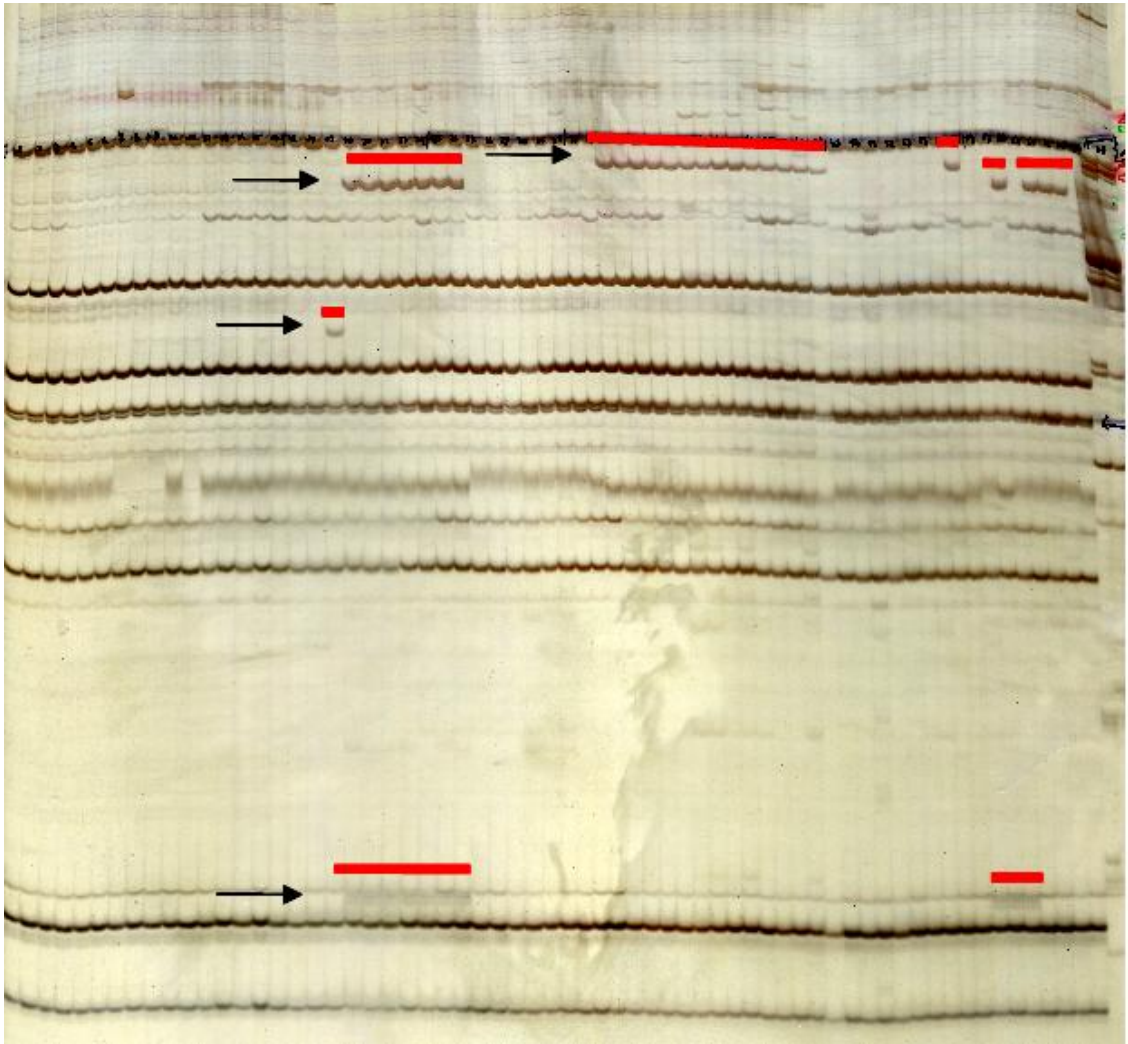
opláchnuto destilovanou vodou. Po opláchnutí bylo sklo osušeno a jedna strana byla ošetřena přípravkem Rain Repellent. Velké sklo bylo omyto saponátem a několikrát opláchnuto destilovanou vodou. Poté bylo osušeno a přeneseno do digestoře. Na sklo byl aplikován 2,8 μl silanu společně s 1 ml kyseliny octové v 96% EtOH, vzniklá směs byla rovnoměrně rozetřena po celé ploše skla, postup byl 2x opakován. Po pěti minutách od aplikace bylo sklo 3x otřeno etanolem. Na okraje velkého skla byly umístěny spacers a bylo na ně přiklopeno malé sklo, ošetřenou stranou dolů. Skla byla k sobě fixována pomocí svorek. Pro přípravu gelu bylo použito 70 ml 6% roztoku akrylamidu, 467 μl 10% roztoku peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ a 46,7 μl tetramethylethylendiaminu. Takto připravenou směsí byl plněn prostor mezi skly. Připravený gel byl umístěn do elektroforézy T-Rex (Thermo Scientific Owl Separation Systems, Rochester, NY, USA). Separace fragmentů probíhala v 0,5 x zředěném roztoku TBE pufru. Před nanášením vzorku byl gel nahřát na teplotu 45 °C. Před nanášením vzorků na gel byly vzorky smíchány s denaturačním pufrem s obsahem formamidu a denaturovány na termocycleru zahřátém na teplotu 96 °C po dobu 3 min. Po denuraci byly vzorky ihned přeneseny na chladicí blok, aby se zabránilo zpětné renaturaci fragmentů DNA. Poté bylo cca 4,2 μl vzorku nanášeno do gelu pomocí osmikanálové pipety. Samotná separace probíhala cca 2 h při napětí 2000 V, 120 mA a 75 W. Po uplynutí času separace bylo sklo sundáno z aparatury a promyto v 10% roztoku CH_3COOH po dobu 20 min. Poté bylo sklo 3x promyto v destilované vodě. Následně bylo sklo ponořeno na 5 min do roztoku 1% HNO_3 a opět 3x promyto v destilované vodě. Vlastní barvení probíhalo v roztoku 0,1% AgNO_3 po dobu 35 min. Po 35 minutách bylo sklo s gelem krátce ponořeno do destilované vody na dobu cca 6 sekund a následně umístěno do 3% roztoku Na_2CO_3 sloužícího jako vývojka na vyvolání latentního obrazu. Sklo bylo ponecháno ve vývojce tak dlouho, dokud se na gelu neobjevily fragmenty DNA ve formě hnědočerných proužků. Když byly fragmenty na gelu jasně zřetelné, proces vývoje obrazu byl zastaven nalitím 10% roztoku CH_3COOH do vývojky. Sklo s gelem bylo v tomto roztoku ponecháno po dobu cca 5 min až do ustálení obrazu. Na konec bylo sklo důkladně omyto v destilované vodě a gel byl vysušen v sušičce při 60 °C po dobu 1 h.

2.2.4 Analýza dat

Vizualizované fragmenty byly skórovány tak, že u každé primerové kombinace byly vybírány pouze jasné a dobře skórovatelné markery. Poté byla u každého vzorku zapsána přítomnost 1, či nepřítomnost 0, daného markeru. Pro každou použitou primerovou kombinaci byla vytvořena matice binárních dat. Poté byla vytvořena jednotná matice, která sdružovala všechny kombinace.

Získaná data byla následně použita pro další analýzy. Z binárních dat byl spočítán: celkový počet hodnocených markerů – NB, počet polymorfních markerů – N_{POL} (markery nevyskytující se u všech hodnocených vzorků) a počet privátních markerů – N_{PRI} (markery vyskytující se u všech zástupců dané populace) v programu FAMD (Schlüter & Harris 2006). Na zjištění genetické diverzity studovaných druhů/populací byl stanoven počet různých genotypů – NG, genotypová diverzita – GD, celkový polymorfismus (vyjádřen v procentech) – PLP a genová diverzita (neboli heterozygotnost) – H_e . Pro tyto výpočty byl použit R script AFLPdat (Ehrich 2006). Počet různých genotypů byl stanoven dvěma způsoby. V prvním případě byl počet genotypů stanoven sečtením všech odlišných genotypů. V druhém případě byly za stejný genotyp považovány i ty genotypy lišící se pouze v 1 markeru. Tento způsob stanovení počtu genotypů umožňuje získat přehled o velikosti rozdílů mezi studovanými vzorky. Pro zjištění rozdělení variability mezi studovanými druhy/populacemi byla provedena analýza molekulární variance (AMOVA) v programu Arlequin suite ver 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Tato metoda umožňuje získat představu o velikosti a distribuci detekované molekulární variability ve studovaném souboru. Všechny výše popsané výpočty byly samostatně provedeny pro jednotlivé populace a taxony. V obou případech byly z použité binární matice odstraněny markery charakteristické pro taxon *P. hirtiflora* a tento taxon nebyl zahrnut do výpočtů. V programu byla vypočtena i celková genetická diverzita studované skupiny a hodnota Wrightova fixačního indexu F_{ST} .

Pro zjištění podobnosti a částečně lze říci i příbuznosti mezi studovanými druhy/populacemi byly použity tři různé klastrovací metody. V programu FreeTree (Pavliček et al. 1999) byla vypočtena matice genetické vzdálenosti na základě koeficientu genetické podobnosti Nei & Li/Dice a byl zkonstruován dendrogram



Obrázek 1.: Sken polyakrylamidového gelu s primerovou kombinací EcoRI E-AGC/MseI M-CAAT. Na snímku jsou šipkou a červenou čarou označeny příklady polymorfních markerů.

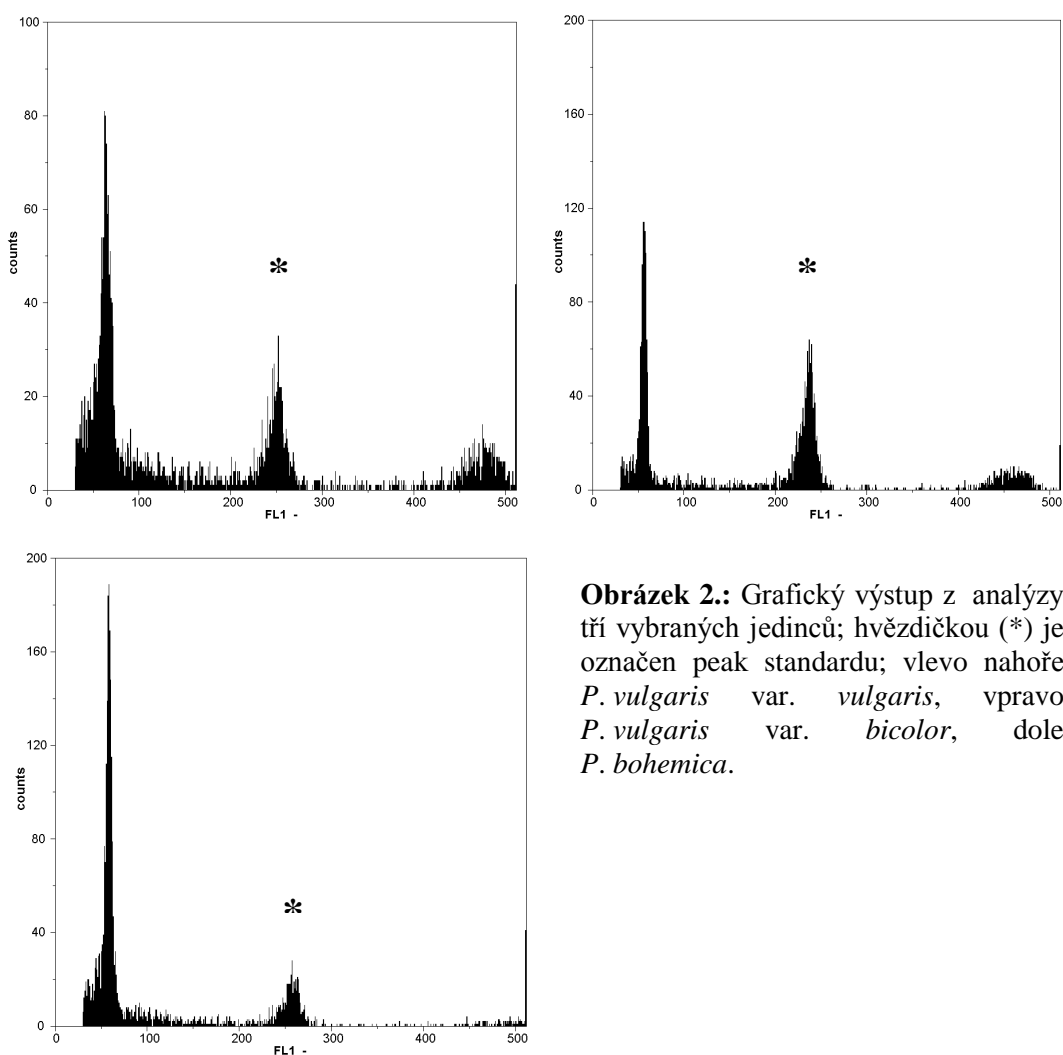
pomocí klastrovacího algoritmu Neighbor Joining. Ten byl graficky vizualizován v programu FigTree (<http://tree.bio.ed.sc.uk/software/figtree/>). Vzniklý dendrogram byl zakořeněn na střed pomocí větve s největší odlišností, což v našem případě byla větev oddělující druh *Pinguicula hirtiflora* od ostatních druhů. Pro ověření získaného shlukování vzorků byla zkonstruována i tzv. síť Neighbor Network v programu SplitsTree 4 (Huson & Bryant 2006). Výhodou síťového zobrazení vztahů mezi vzorky je, že Neighbor Network nezobrazuje pouze jeden možný typ klastrování podobnosti/vztahů, nýbrž zobrazuje všechny pravděpodobné i nepravděpodobné propojení mezi vzorky. Robustnost zobrazeného klastrování byla v obou případech otestována bootstrapovou analýzou.

Pro nalezení počtu geneticky odlišných klastrů (skupin) ve studovaném souboru vzorků (populací) byl zvolen přístup modelového Bayesiánského klastrování, které využívá program Structure (Falush et al. 2007). Program zpracovává genotypovou informaci přepočtenou do frekvence jednotlivých alel a snaží se najít rozdělení vložených dat do různého počtu klastrů. Nejvhodnější rozdělení do určitého počtu klastrů je odvozeno z výstupních dat programu na základě několika parametrů (jako třeba hodnota $\ln P(D)$, ΔK , stabilita opakování, standardní odchylka). Analýza byla provedena standardním postupem používaným v Laboratoři molekulární markerů Katedry botaniky PřF UP. Popis metody testování a vyhodnocování je možné najít v práci L. Majeského (Majeský et al. 2012). Analýza byla provedena a konzultována s RNDr. L. Majeským.

3 Výsledky

3.1 Průtoková cytometrie

Celkem bylo analyzováno populace z 9 lokalit se zastoupením 3 taxonů – *Pinguicula vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor*, *P. bohemica* s celkovým počtem 116 jedinců (*P. vulgaris* var. *vulgaris* – 51, *P. vulgaris* var. *bicolor* – 52, *P. bohemica* – 13). Všechny analyzované rostliny vykazovaly stejnou ploidní úroveň (pravděpodobně oktoploidní $2n = 64$) viz obrázek 2.



Obrázek 2.: Grafický výstup z analýzy tří vybraných jedinců; hvězdičkou (*) je označen peak standardu; vlevo nahoře *P. vulgaris* var. *vulgaris*, vpravo *P. vulgaris* var. *bicolor*, dole *P. bohemica*.

Tabulka 2.: Výsledky analýzy průtokové cytometrie, výsledky vycházejí z měření relativních obsahů jaderné DNA u 116 jedinců tří taxonů; n – počet změřených jedinců pro jednotlivé taxony.

n	taxon	průměrná hodnota poměrů standard/vzorek	Průměrné CV měření (vzorek)
51	<i>P. vulgaris</i> var. <i>vulgaris</i>	3,912	5,94
52	<i>P. vulgaris</i> var. <i>bicolor</i>	3,876	6,29
13	<i>P. bohemica</i>	4,177	6,05

3.2 AFLP

Ze sedmi primerových kombinací bylo získáno 167 markerů, z nichž 163 bylo polymorfních v případě hodnocení všech čtyř taxonů – *Pinguicula vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor*, *P. bohemica*, *P. hirtiflora*. V případě, kdy byly hodnoceny jenom taxony *Pinguicula vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor*, *P. bohemica*, byl celkový počet získaných markerů 100, z nichž 37 bylo polymorfních (Tabulka 2).

Tabulka 3.: Primery a primerové kombinace pro preamplifikační a amplifikační reakce s celkovým počtem zaznamenaných markerů a polymorfních markerů na danou kombinaci. Počty získaných markerů a polymorfních markerů jsou uváděny pro taxony *Pinguicula vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor*, *P. bohemica*/*P. vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor*, *P. bohemica* a *P. hirtiflora*.

Sekvence primerů pro preamplifikaci		
EcoRI 5' – G ACT GCG TAC CAA TTC A – 3'		
MseI 5' – G ATG AGT CCT GAG TAA C – 3'		
Sekvence primerových kombinací pro amplifikaci	Počty hodnocených markerů	Počty polymorfních markerů
EcoRI E–AGC/MseI M–CAAT	10/24	4/23
EcoRI E–AGC/MseI M–CAATC	27/41	10/39
EcoRI E–AGC/MseI M–CAAC	11/23	3/23
EcoRI E–AGG/MseI M–CAAT	16/24	9/24
EcoRI E–AGG/ MseI M–CAATG	9/14	5/13
EcoRI E–AGG/ MseI M–CAATC	14/23	5/23
EcoRI E–ACC/MseI M–CAACC	9/18	1/18

Klonalita studovaných populací a taxonů byla nízká, o čemž svědčí i počty různých genotypů (NB). Ve většině studovaných populací/taxonů bylo detekováno tolik genotypů, kolik studovaných jedinců. V některých případech byl počet genotypů o něco nižší než počet jedinců (Tabulka 3 a 4). S tím souvisí i genotypová diverzita (GD), která dosahovala pro většinu populací/taxonů vysoké hodnoty blízké maximální hodnotě 1. Navzdory nízké klonalitě a vysoké genotypové diverzitě studované populace

Tabulka 4.: Souhrn hodnot genetické variability pro 14 studovaných populací druhů *P. vulgaris* agg. (druh *Pinguicula hirtiflora* není v tabulce zahrnuta), N – počet jedinců; NG – počet genotypů/ počet genotypů, kde se jedinec lišil o 2 a více markerů (jedinci s jedním odlišným markerem jsou považováni za klon); GD – genotypová diverzita; NB – celkový počet markerů; N_{POL} – počet polymorfních markerů; N_{PRI} – počet privátních markerů; PLP – polymorfismus vyjádřený v %; H_e – heterozygotita/genová diverzita.

Populace	VU– SK–1	VU– SK–2	VU– SK–3	VU– SK–4	VU– SK–5	VU– ČR–6	VU– ČR–7	VU– SR–8	BI– SR–1	BI– SR–2	BI– SR–3	BI– ČR–4	BO– ČR–1	BO– ČR–2
N	3	4	4	4	4	3	4	4	3	3	3	10	10	5
NG	2/2	2/2	2/2	3/2	3/1	3/2	2/2	2/1	3/3	3/3	3/3	10/8	8/5	5/4
GD	0.67	0.50	0.50	0.83	0.83	1.00	0.67	0.50	1.00	1.00	1.00	1.00	0.96	1.00
NB	74.0	73.8	73.5	68.8	78.0	68.7	66.5	77.8	80.7	76.3	79.0	76.3	77.8	77.8
N_{POL}	3	5	2	7	2	3	3	1	7	8	7	18	17	10
N_{PRI}	0	4	0	1	1	0	0	0	0	2	0	2	0	0
PLP%	3%	5%	2%	7%	2%	3%	3%	1%	7%	8%	7%	18%	17%	10%
H_e	0.020	0.025	0.010	0.035	0.010	0.020	0.020	0.050	0.047	0.053	0.047	0.059	0.055	0.048

Tabulka 5.: Souhrn hodnot variability zjištěné u tří taxonů (*Pinguicula vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor*, *P. bohemica*), (pro vysvětlení zkratk v tabulce viz Tabulka 3).

Population	<i>vulgaris</i>	<i>bicolor</i>	<i>bohemica</i>
N	30	19	15
NG	19/13	19/17	11/8
GD	0.97	1.00	0.95
NB	72.7	77.4	77.8
N_{POL}	30	24	18
N_{PRI}	6	4	0
PLP%	30%	24%	18%
H_e	0.086	0.079	0.052

druhu/skupiny druhů byly málo polymorfní (Tabulka 3 a 4). Polymorfizmus vyjádřen počtem polymorfních markerů (N_{POL}) a vyjádřen v procentech (PLP%) byl nejvyšší v populaci taxonu *P. bohemica* ($PLP_{BO-SH} = 17 \%$, $PLP_{BO-BR} = 10 \%$). U zbylých populací byly hodnoty polymorfizmu nižší než 10 %. Při hodnocení polymorfizmu u jednotlivých druhů byl nejvíce polymorfní taxon *P. vulgaris* PLP = 30 %, pak *P. var. bicolor* PLP = 24 % a nakonec *P. bohemica* PLP = 18 %. Vysoká podobnost mezi studovanými populacemi a taxony a tudíž vysoká homogenost je patrná i z nízkých hodnot genové diverzity (heterozygosity) – H_e (Tabulka 3 a 4). Hodnoty H_e byly velice nízké u všech populací a nepřevyšovaly hodnoty $H_e = 0,06$. Při hodnocení skupin taxonů byly nejvyšší hodnoty zaznamenány pro *P. vulgaris var. vulgaris* – $H_e = 0,086$, pro *P. vulgaris var. bicolor* $H_e = 0,079$ a pro *P. bohemica* $H_e = 0,052$ (Tabulka 4). Hodnota genové diverzity pro celý soubor (všechny jedince) byla $H_e = 0,102$, poukazující opět na vysokou homogenitu studovaných vzorků. Pro zjištění, zda jsou přítomny genetické markery charakteristické pro jednotlivé populace nebo skupiny druhů, byly sečteny privátní markery. V případě populací byla přítomnost privátních markerů zaznamenána jenom pro 5 z celkového počtu 14 populací. Počty privátních markerů byly nízké od 1 do 4 (Tabulka 3). Když byly hodnoceny jednotlivé taxony, přítomnost privátních markerů byla zaznamenána jen u *P. vulgaris var. vulgaris* a *P. vulgaris var. bicolor* (Tabulka 4).

Největší podíl molekulární variability v případě hodnocení populací se nacházel mezi jednotlivými populacemi (64,53 %). Variabilita uvnitř populací je o polovinu nižší, jenom 35,47 % (Tabulka 13). Při hodnocení variability mezi skupinami třech taxonů, bylo rozdělení následovné: 22,47 % variability se nachází mezi taxony, 44,46 % mezi populacemi jednotlivých taxonů a 33,07 % uvnitř jednotlivých taxonů (Tabulka 12). Hodnota Wrightova fixačního indexu $F_{ST} = 0,6453$ poukazuje na vysokou diferenciaci jednotlivých populací.

Tabulka 6.: Výsledky analýzy molekulární variance (AMOVA) mezi 3 taxony (*Pinguicula vulgaris var. vulgaris*, *P. vulgaris var. bicolor*, *P. bohemica*); d.f. – stupně volnosti, SSD – součet kvadratických odchylek.

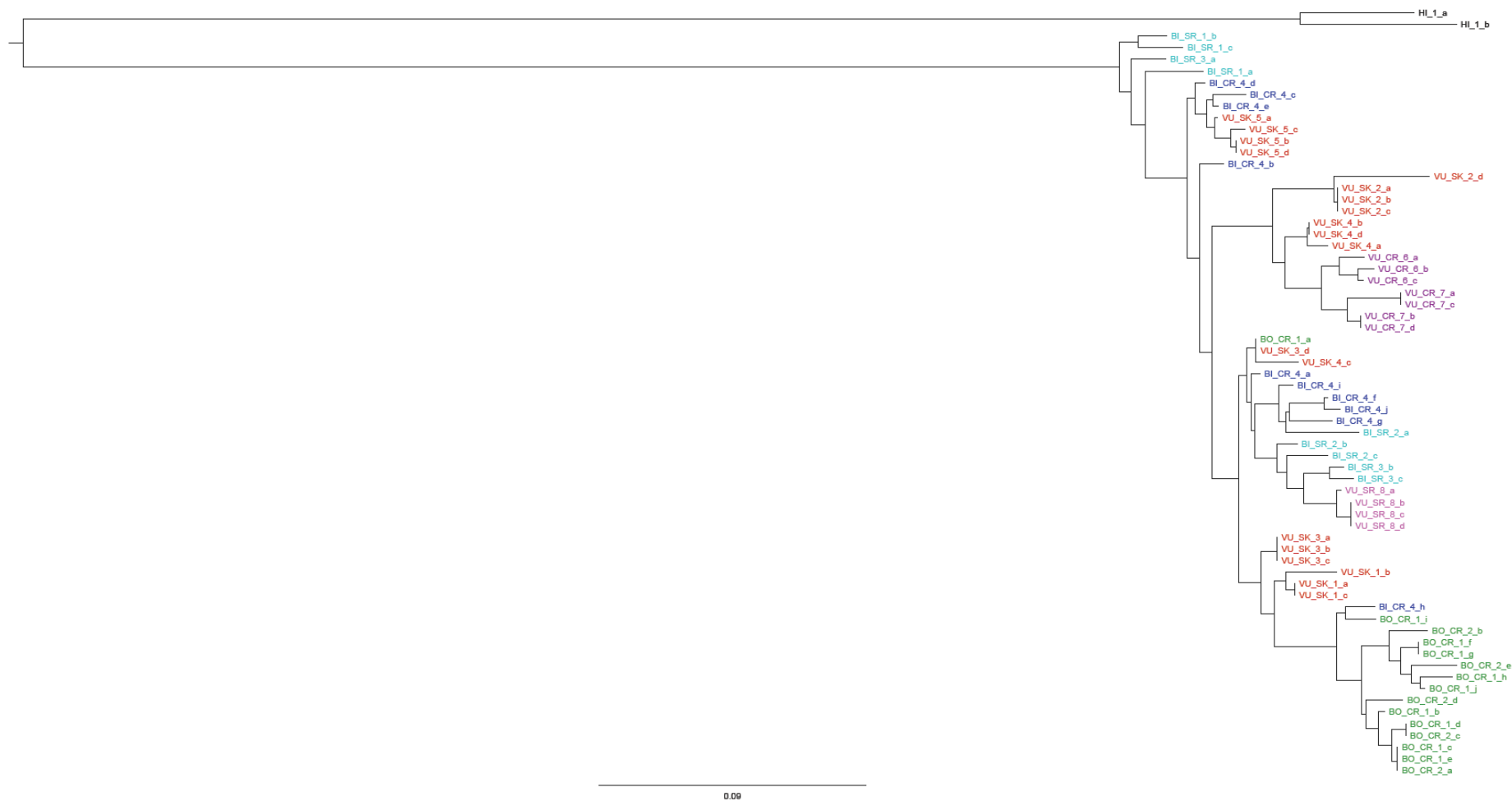
Zdroj variability	d.f.	SSD	variabilita	P-value
Mezi taxony	2	90.190	22.47 %	
Mezi populacemi jednotlivých taxonů	11	136.759	44.46 %	
Uvnitř populací	50	95.317	33.07 %	0.00000

Tabulka 7.: Výsledky analýzy molekulární variance (AMOVA) mezi a uvnitř 14 populací; d.f. – stupně volnosti, SSD – součet kvadratických odchylek.

Zdroj variability	d.f.	SSD	variabilita	P-value
Mezi populacemi	13	226.949	64.53 %	
Uvnitř populací	50	95.317	35.47 %	0.00000

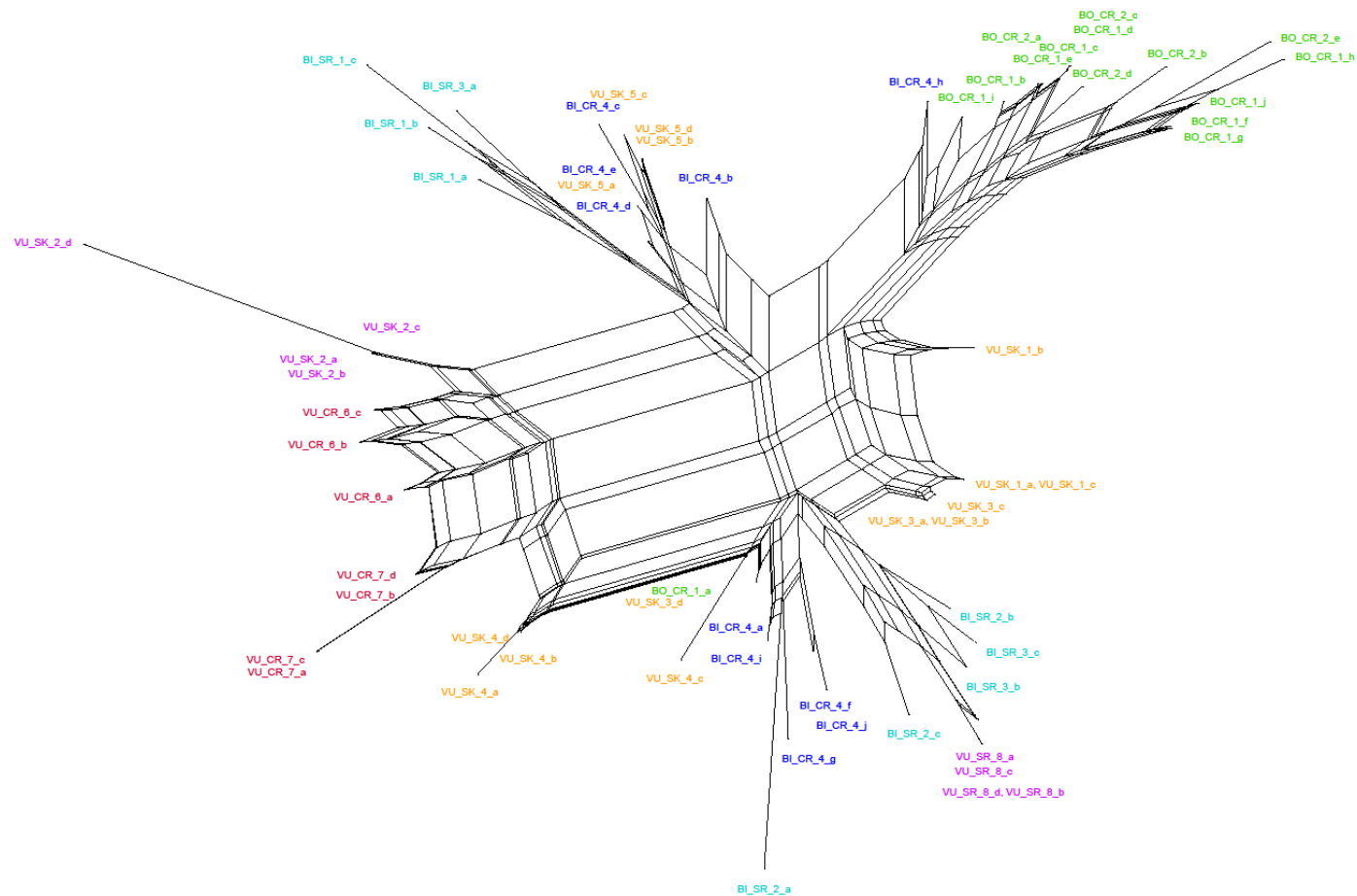
Pomocí klastrovací analýzy byl zhotoven Neighbor-joining dendrogram za účelem pozorování podobnosti a pravděpodobnými vztahy mezi 66 vzorky. Klastrovací analýza byla provedena za pomoci koeficientu podobnosti Nei & Li/Dice a vycházela ze 167 markerů. Vzorky byly seskupeny na základě jejich podobnosti, výsledné schéma můžeme vidět jako dendrogram, který byl zakořeněn pomocí větve oddělující druh *P. hirtiflora* (Obrázek 2). Testovaní jedinci se převážně seskupovali do skupin podle populací, výjimkou byly rostliny pocházející z populace BI-ČR-4, které byly rozmístěny do skupin s jinými populacemi. Zajímavé bylo umístění jednoho vzorku z populace BI-ČR-4 k populacím BO-ČR-1 a BO-ČR-2 a přiřazení jednoho jedince populace BO-ČR-1 k populacím VU-SK-2 a VU-SK-3. Poměrně vysoká byla podpora větví vnitropopulační úrovně, naopak základní větvení mělo velice slabou podporu.

Vzájemné vztahy testovaných rostlin jsme vyjádřili i prostřednictvím síťového znázornění Neighbor Network (Obr. 3), který byl vytvořen pro 64 jedinců tří taxonů a vycházel ze 100 markerů (*P. hirtiflora* nebyla zahrnuta). Stejně jako u Neighbor-joining dendrogramu došlo ke společnému seskupení jedinců stejných populací. Výjimkou byli opět jedinci z populace BI-ČR-4, kteří netvořili vlastní shluk, ale byli rozmístěni mezi ostatními populacemi. Neighbor Network názorně ukázal separování jednoho vzorku z populace BO-ČR-1 od ostatních jedinců téhož druhu, jehož místo jako by obsadil zástupce již výše zmíněné rozptýlené populace BI-ČR-4.



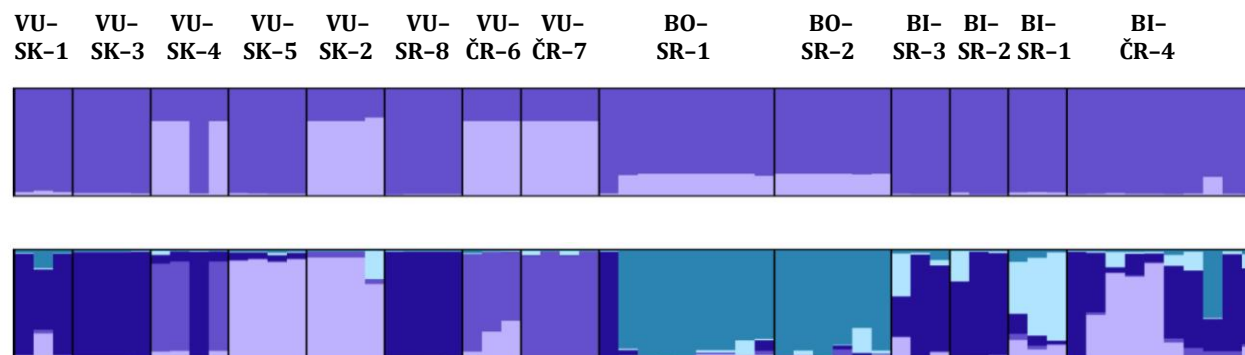
Obrázek 3.: Neighbour-joining Tree (Nei & Li/Dice koeficient podobnosti) odvozený z AFLP dat u 66 jedinců z 15 populací čtyř taxonů rodu *Pinguicula*. Dendrogram je zakořeněný na střed pomocí nejodlišnější větve (větev s druhem *Pinguicula hirtiflora*). Populace jsou označeny kódem, který je uveden v Tabulce 1., posledním písmenem kódu je označen konkrétní jedinec z dané populace. Pro větší názornost byly populace barevně odlišeny.

0.01



Obrázek 4.: Neighbor Network je vytvořen na základě AFLP dat 64 jedinců ze 14 populací tří taxonů rodu *Pinguicula* (*Pinguicula hirtiflora* není zahrnuta). Populace jsou označeny kódem, který je uveden v Tabulce 1., posledním písmenem kódu je označen konkrétní jedinec z dané populace. Pro větší názornost byly populace barevně odlišeny.

Výsledek Bayesiánského klastrovacího přístupu používaného programem Structure nebyl jednoznačný. Testováno bylo rozdělení do 1 – 14 klastřů/skupin. Jako nejvíce stabilní a tudíž lze říci i nejvíce pravděpodobné vycházelo rozdělení do pěti skupin. Už zmiňovaná vysoká podobnost mezi studovanými vzorky byla patrná i při této analýze. Kromě výsledku pro dvě a pět klastřů byly prohlédnuty i výsledky pro sedm a jedenáct klastřů. Při rozdělení do vyššího počtu klastřů docházelo jenom k rozdrobení klastřů na menší části, bez vytvoření nové významnější skupiny. Navíc pro rozdělení do jiného počtu klastřů než dva a pět chyběla významnější statistická podpora.



Obrázek 5.: Výstup Bayesiánské klastrovací analýzy STRUCTURE vytvořený pro 14 populací tří taxonů – *P. vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor*, *P. bohémica*. Zobrazené je rozdělení do dvou a pěti klastřů. Přičemž každý sloupec znázorňuje jeden vzorek a jednotlivé pole populace, které jsou označeny čísly (barvy znázorňují míru pravděpodobnosti přiřazení k různým klastřům).

4 Diskuze

Průtoková cytometrie

Průtokovou cytometrií nebyly zjištěny významné rozdíly v relativních obsazích jaderné DNA mezi zkoumanými taxony – *Pinguicula vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor*, *P. bohemica*. To znamená, že tyto taxony mají s největší pravděpodobností stejnou ploidní (pravděpodobně oktoploidní $2n = 64$) úroveň. Bohužel se za dobu studia nepodařilo stanovit počet chromozomů pomocí klasických karyologických metod, proto je třeba brát údaj o hladině ploidie pouze orientačně.

Zjištění o jediné ploidní hladině u všech tří studovaných taxonů je v částečném rozporu s údaji uváděnými v literatuře. Pro taxon *P. vulgaris* var. *bicolor* je uváděn pouze chromosomový počet $2n = 64$ (Zurzycki 1953, Peruzzi 2004, Casper & Stimper 2009), tj. stejně jako pro *Pinguicula vulgaris* var. *vulgaris* (Casper 1961, 1966, Casper & Stimper 2009; Krahulcová & Jarolímová 1991; Peruzzi 2004). Poměrně malý počet literárních údajů pro *Pinguicula vulgaris* var. *bicolor* může být dán také tím, že často není rozlišována jako samostatný taxon a je zahrnuta do druhu *P. vulgaris* jako synonymum. Oba taxony jsou tedy oktoploidní. Nicméně, Casper & Stimper (2009) ve své studii uvádějí u několika rostlin z Apenin, které označují jako *Pinguicula* cf. *vulgaris*, i chromosomový počet $2n = 128$. Rostliny s tímto počtem se měly vyskytovat společně s oktoploidy (tj. $2n = 64$) v rámci jedné populace. Je tedy zřejmé, že *P. vulgaris* var. *vulgaris* může být jak oktoploidní tak i hexadekaploidní. Rostliny *P. vulgaris* s. str. testované v této studii však byly cytologicky uniformní a všichni měření jedinci měli stejnou ploidní úroveň. Vzhledem k tomu, že výrazně převládající ploidii u *P. vulgaris* var. *vulgaris* je oktoploidní úroveň, lze předpokládat, že oktoploidi byly i rostliny měřené v této studii. Zajímavé je zjištění shodné ploidní úrovně také pro taxon *P. bohemica*, pro který jsou v literatuře uváděny různé chromozómové počty. Tetraploidní počet ($2n = 34$) uvádí např. Studnička (1984, 1986, 1989) nebo Studnička & Hejný (1992), oktoploidní např. Krahulcová & Jarolímová (1991), Bělohávková (1989, 2000) nebo Peruzzi (2004). Studnička (1989) ve své práci uvádí dvě možnosti jak by mohlo dojít k pozorování chromosomového počtu $n = 64$. První možností je špatný metodický postup a druhou možností je polyploidisace pletiv, toto vysvětlení považuje za méně pravděpodobné. Někteří autoři (Casper & Stimper 2009) připouští

výskyt obou ploidních úrovní u *P. bohemica*. Je tedy možné, že *P. bohemica* může být jak tetraploidní tak oktoploidní. Mohlo by se jednat o stejný případ jako v populacích *P. vulgaris* var. *vulgaris*, kde je známa populace s dvěma ploidními úrovněmi (viz výše). Vzorokly testované v této studii byly ale cytologicky uniřofmní a vykazovaly stejnou ploidní úroveň jako jedinci taxonů *P. vulgaris* var. *bicolor* a var. *vulgaris*. Tyto výsledky tedy nepodporují údaje o tetraploidní úrovni u *P. bohemica*. Je zde ale možnost, že všechny měřené rostliny měli jinou než oktaploidní úroveň, ikdyž tato možnost se velice nepravděpodobná.

Počer chromozómů u rodu *Pinguicula* je velmi významným znakem velké taxonomické váhy. Ukazuje totiž na evoluční stáří druhu. Tetraploidi se obecně považují za evolučně starší dobře diferencované taxony, zatímco oktoploidní *P. vulgaris* je mladší a variabilnější taxon (Studnička 1989). Otázka ploidní úrovně *P. bohemica* je tedy zásadní při úvahách o její taxonomické hodnotě a případném endemismu. Shodná ploidní úroveň u *P. vulgaris* a *P. bohemica* podporuje teorii o vzniku *P. bohemica* odštěpením od *P. vulgaris* na konci třetihor alopatričkou speciací v Polabských nížinách, kde se rostliny udržely po klimatických změnách v boreálu (Bělohávková 1989). Avšak pokud by *P. bohemica* byla tetraploidní, svědčilo by to o jejím vyšším stáří a jiné evoluční historii (viz např. Studnička 1989).

Klonalita a genová variabilita zjištěná metodou AFLP

Výsledky naší studie naznačují nízkou klonalitu v rámci zkoumaných populací, o čemž svědčí i vyšší počty různých genotypů. Většina studovaných populací byla reprezentována stejným počtem genotypů jako studovaných jedinců. Dalo by se tedy předpokládat, že u všech tří taxonů dochází k pohlavnímu množení. Pokud bychom vzali počty genotypů pro jednotlivé populace, kdy jsou za samostatný genotyp bráni jedinci, kteří se liší nejméně ve dvou markerech/lokusech, klonalita se nám u většiny populací zvýší. Jedinou výjimkou jsou tři Slovenské populace *Pinguicula vulgaris* var. *bicolor*, kde zůstane shodný počet jedinců s počty zjištěných genotypů. Tento výsledek však může být ovlivněn způsobem odběru jedinců na lokalitách, u kterých byla snaha postihnout variabilitu v rámci populace. Tento fakt může být umocněn malým vzorkem testovaných jedinců. Na druhou stranu, všechny tři Slovenské populace byly velice početné a lze tedy předpokládat, že jejich vitalita a vhodné podmínky stanoviště zvyšují pravděpodobnost pohlavního množení a vzniku nových genotypů. Poměrně zajímavá

byla nízká hodnota klonality na lokalitě Baronský rybník s výskytem druhu *P. bohémica*. Jedinci se zde množí pouze vegetativně a nebylo zde po dobu několika let pozorováno pohlavní množení (Studnička 1989) stejné závěry byli zjištěny i vlastním pozorováním na lokalitách v terénu v letech 2007–2012. Můžeme tedy předpokládat, že přežívající jedinci jsou dobře adaptované genotypy, které vznikly pohlavně v příznivějších obdobích. Oproti tomu na lokalitě Shnilé louky byli pozorováni juvenilní jedinci, což naznačuje šíření pomocí semen. Dal by se zde proto předpokládat větší počet genotypů. Tento předpoklad se ale i přes poměrně vysoký počet testovaných jedinců nepotvrdil. Možným vysvětlením je tzv. efekt zakladatele, kdy populace mohla vzniknout jen z několika málo jedinců (genotypů).

Pozorovaná heterozygotita u zkoumaných populací nabývala hodnot od 0.010 do 0.059 (tabulka 9.). Tyto poměrně nízké hodnoty nám mohou naznačit nízký genetický tok a autogamické množení v populacích. U populací s vyššími hodnotami můžeme předpokládat nedávné pohlavní rozmnožování, případně ustálenou vyšší hodnu genetické variability udržovanou pomocí nepohlavního, vegetativního množení. Tak je možné si například vysvětlit genetickou variabilitu u populace *P. bohémica* z lokality Baronský rybník (BO-ČR-2), která vykazovala v porovnání s ostatními, námi zkoumanými populacemi, poměrně vysoké hodnoty heterozygotity ($H_e = 0.048$). Jak bylo řečeno již výše, jedinci se na lokalitě rozmnožují pouze klonálně. Zvýšené hodnoty heterozygotity proto nemohly vzniknout vlivem pohlavního množení v posledních letech. Rozdílné hodnoty heterozygotity u jednotlivých populací však mohou být poněkud zkreslené nevyrovnanými počty jedinců ve zkoumaných populacích. Vysoká genetická variabilita mezi populacemi a genetická homogenita v rámci jednotlivých populací by mohla být způsobena nízkým tokem genů. Nízký tok genů podporuje snižování genotypové a fenotypové heterogenity mezi jednotlivými populacemi, podporuje izolaci populací a umožňuje vznik genetického driftu. Právě náhodný genetický drift může vést ke zvýšení genetické diferenciaci jednotlivých populací. Tento fenomén by mohl existovat u *Pinguicula vulgaris* agg. ve střední Evropě což naznačují vysoké hodnoty F_{ST} ($F_{ST} = 0,6453$ vysoce diferencované populace) zjištěná touto studií. Ukazují na velkou diferenciaci analyzovaných populací. Tyto předpoklady nám naznačuje i analýza molekulární variance, která prokázala v celkově zjištěné variabilitě výskyt 65 % variability právě mezi testovanými populacemi a pouze 35 % variability uvnitř populací. Vysoká diferenciaci je patrná i z grafických výstupů klastrovacích metod (Obrázku 3. a 4.), kde jedinci stejné populace vytvořili společně

shluky, poměrně dobře odlišené od ostatních populací. Stejně výsledky jsou podporovány i výstupem Bayesiánské klastrovací analýzy STRUCTURE. Zajímavé bylo, že ani jedna z použitých klastrovacích analýz, nenaznačila shlukování podle geografických oblastí. Očekávali jsme separaci Skandinávských populací od zbylých středoevropských populací, ke které však nedošlo. Velice zajímavé výsledky byly zjištěny u populací druh *P. bohemica*. Její dvě recentní populace, které byly v naší práci testovány, vytvářely společný shluk, ve kterém se jedinci z jednotlivých lokalit prolínali, jakoby patřili jen do jediné společné populace. Takto prolínající se shluk byl navíc oddělen od ostatních testovaných populací druhů *P. vulgaris* var. *vulgaris* a *P. vulgaris* var. *bicolor*. Jedinou výjimkou byl vzorek druhu *P. bohemica* (BO_ČR_1_a) který netvořil společně s ostatními jedinci dvou populací již zmíněný shluk, ale byl přiřazen k jedincům z lokality ze Skandinávie (VU-SK-3). Naopak se s populací *P. bohemica* seskupil jeden vzorek *P. vulgaris* var. *bicolor* (BI_ČR_4_h) pocházející z lokality Štramberk. Nejjednodušším vysvětlením této skutečnosti je možnost záměny vzorků v některém z kroků námi prováděné analýzy. Dalším zajímavým výsledkem byla skutečnost, že jedinci taxonu *P. vulgaris* var. *bicolor*, pocházející z lokality Štramberk, netvořili jednotný shluk jako ostatní populace. Shlukovali se do dvou skupin separovaných od sebe. Populace tedy netvořila jednotnou skupinu a zjevně byla geneticky nejvíce heterogenní z celého zkoumaného souboru (nejvyšší % polymorfismus a hodnoty heterozygotity mezi zkoumanými populacemi). Lokalita Štramberk, kde se vyskytuje druh *P. vulgaris* var. *bicolor*, se nachází v bývalém vápencovém lomu, zvaném Dolní Kamenárka, ze kterého je dnes vytvořena Botanická zahrada a arboretum (Botanická zahrada a arboretum Štramberk). Do lomu se *P. vulgaris* var. *bicolor* dostala (P. Pavlík, in verb.) při záchranném transferu z lokality vápencového lomu Kotouč, kde docházelo k rozšíření těžby a ničení slatiných mokřadů s vzácnými druhy rostlin na etážích, kde se delší dobu netěžilo. Předmětem záchranného transferu nebyla přímo *Pinguicula vulgaris* var. *bicolor*, která z Kotouče nebyla nikdy, ani v té době, známa. Během transferu došlo pouze k transportu kompaktních bloků slatiny z Kotouče do Dolní Kamenárky. V přenesených blocích se ojedinělé rostliny *P. vulgaris* var. *bicolor* objevily už v následujícím roce. Je tedy otázkou, zda byli tito jedinci přeneseni do Dolní Kamenárky už z Kotouče (kde mohla už dříve nepovšimnutě vzniknout populace spontánně) nebo byli vysazeni (vyseti) do transportovaných slatiných bloků až po transferu. Vlastník botanické zahrady pan P. Pavlík ovšem druhou variantu prakticky vylučuje. Výsledky naší analýzy nicméně spontánní původ

populace nepodporují a ukazují spíše na možnost výsevu či vysazení rostlin, s největší pravděpodobností s různým původem z různých lokalit. Jako pravděpodobnější se tedy zdá možnost nenáhodného zavlečení *P. vulgaris* var. *bicolor* do Štramberka z blízkých západokarpatských populací (Polsko, Slovensko), kde se taxon vyskytuje. Tento původ populace se jako pravděpodobný jeví také s ohledem na výskyt dalších evidentně vysazených v ČR nepůvodních druhů rodu *Pinguicula* v tomto regionu, např. taxony *P. crystallina* Sm. subsp. *hirtiflora* (Ten.) Strid nebo *P. grandiflora* Lam. subsp. *rosea* (Mutel) Casper (Pyšek et al. 2012).

***Pinguicula bohemica* a možnosti její ochrany**

Studii jsme zjistili poměrně vysokou homogenitu taxonu *P. bohemica* která byla patrná především v grafických výstupech klastrovacích analýz (Obrázek 3.–5.). Obě dvě testované populace (Shnilé louky, Baronský rybník) *P. bohemica* tvořily kompaktní celek a vykazovaly separaci od ostatních populací taxonů *P. vulgaris* var. *vulgaris* a *P. vulgaris* var. *bicolor*. I přes zjištění shodné ploidní úrovně s taxony *P. vulgaris* var. *vulgaris* a *P. vulgaris* var. *bicolor* je zřejmě vhodné zachovat taxonu *P. bohemica* taxonomickou hodnotu variety, nanejvýš sle subspecie jak je tomu i v některých současných pracích (např. Grulich 2012, Danihelka et al. 2012). Za těchto okolností zůstává *P. bohemica* českým endemitem, i když na nižší taxonomické úrovni, a to jako jediný taxon v rámci skupiny masožravých rostlin vyskytujících se na našem území.

Všechny recentní populace taxonu *P. bohemica* jsou slabé a z dřívějších 12 udávaných lokalit (Studnička 1989) se dnes taxon vyskytuje pouze na třech. Měli by chom se tedy zamyslet nad její současnou a budoucí ochranou. V současné době jsou všechny recentní lokality (Polabská černava, Shnilé louky, Baronský rybník) taxonu *P. bohemica* chráněny ve formě maloplošných chráněných území. Lokalita nedaleko obce Mělnická Vrutice má status Národní přírodní rezervace (NPR Polabská černava) a je chráněna již od roku 1946. Na lokalitě se nachází poměrně početná populace druhu *P. vulgaris*. *Pinguicula bohemica* se zde vyskytuje pouze v počtu několika kvetoucích jedinců. V nedávné době se dokonce předpokládalo, že *P. bohemica* z lokality vymizela. Terénní pozorování v průběhu posleních několika let však potvrdila její přítomnost. Determinace *P. bohemica* od početnější *P. vulgaris* var. *vulgaris* je ve sterilním stavu téměř nemožná. Studnička (1989) uvádí z lokality výskyt jedinců fenotypově odpovídajících taxonu *P. bohemica*, ale nabádá k opatrnosti a navrhuje podrobnější

studii těchto jedinců. Tato opatrnost je také nezbytná z důvodu možné hybridizace s *P. vulgaris* var. *vulgaris* nebo možného recentního vysazení rostlin na lokalitu.

Lokality na Dokesku s dnes poslední prosperující populací (lokality Shnilé louky), nebyly do nedávné doby chráněny ze zákona, přičemž první snahy o ochranu území byly podniknuty již v osmdesátých letech minulého století. Přesto, že lokality nebyly chráněny, management je zde prováděn již poměrně dlouhou dobu (Bělohávková 1989). Pokud by nebyly zásahy dlouhodobě prováděny, dalo by se předpokládat, že by se druh na lokalitách již nevyskytoval, případně v menším počtu jedinců. Od roku 2012 jsou Jestřebské populace chráněny formou Národní přírodní památky Jestřebské slatiny. Tato národní přírodní památka zahrnuje jak lokalitu Baronský rybník, tak i lokalitu Shnilé louky. Lokalita Shnilé louky vznikla po těžbě rašeliny, která se zde těžila ještě v osmdesátých letech minulého století. Druh je z lokality uváděn poprvé v roce 1984 (Studnička 1989). Studnička (1989) uvádí, že rostliny, které se zde dnes nacházejí, pravděpodobně vznikly rozmnožením velmi malého počtu jedinců a uvádí i možnost jedné jediné původní zakladatelské rostliny. Molekulární analýza ovšem prokázala u jedinců z této lokality, vyšší počet genotypů a jedny z nejvyšších hodnot polymorfizmu (Tabulka 4.) v rámci studovaných populací. Dá se tedy předpokládat, že populace nevznikla z tak malého počtu jedinců jak předpokládá Studnička (1989). Zjištěná genetická variabilita by však mohla být způsobena druhotně, vnesením nového genotypu do populace při posilujících výsevech rostlin, pocházejících z nedalekých lokalit (Pod Konvalinkovým vrškem, Baronský rybník). Zda ale tyto výsadby (výsevy) skutečně probíhaly se nepodařilo zjistit. Na lokalitě Shnilé louky je management prováděn ve spolupráci se zájmovou organizací pod dohledem OOP. Populace na lokalitě Baronský rybník je dnes tvořena několika shluky rostlin, které jsou tořené mateřskou rostlinou obklopenou klonálně vzniklými jedinci. Tato situace je způsobena pokročilou sukcesí slatiniště. Druh zde již nemá optimální podmínky (rozvolněné plochy s nezapojenou vegetací) a dochází tak pouze k nepohlavnímu, klonálnímu množení. Je tedy možné, že každý z dosud přežívajících shluků rostlin představuje unikátní genotyp. Studnička (1989) uvádí, že lokalita je nejvýznamější nositelkou genofondu druhu, což odpovídá výsledkům této studie. Testování jedinci z lokality Baronský rybník vykazovali poměrně vysoké počty genotypů i vysoké hodnoty heterozygotity v porovnání s ostatními populacemi. Takto fixovaná genetická variabilita však není dlouhodobě udržitelná a se zánikem každé jedné rostliny (shluku jedinců) může dojít k zániku jedinečného genotypu z populace.

Pro zachování genetické diverzity je potřebná nepřetržitá a intenzivní ochrana všech populací, prováděná za pomoci vhodných managementových zásahů. Největším nebezpečím pro populace *P. bohemica*, je probíhající sukcese na stanovištích. Dřívejší meandrující Robečský potok zde vytvářel vhodné biotopy, které byly vhodné pro růst *P. bohemica* (Studnička 1989). Dnes díky regulaci lokalita podléhá sukcesi (zarůstání rákosem, šíření stromového a keřového náletu a zazemňování lokality), která *P. bohemica* příliš nesvědčí a umožňuje pouze její přežívání. Nebezpečí zániku zejména této populace a ztráty jejího genofondu lze proto pokládat stále za poměrně vysoké.

5 Souhrn

Práce se věnovala studiu variability v komplexu *P. vulgaris* ve střední Evropě. Tři zkoumané taxony byly testovány průtokovou cytometrií a metodou AFLP.

Výsledky a závěry práce:

- Průtokovou cytometrií bylo změřeno 116 jedinců z 9 lokalit, tří taxonů – *P. vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor* a *P. bohemica*. Všechny analyzované rostliny vykazovaly stejnou ploidní úroveň.
- Pomocí sedmi primerových kombinací bylo získáno 100 markerů, z nichž 37 bylo polymorfních v případě hodnocení tří taxonů.
- Byla zjištěna variabilita mezi zkoumanými populacemi taxonů *Pinguicula vulgaris* var. *vulgaris*, *P. vulgaris* var. *bicolor*, *P. bohemica*. Přičemž populace druhu *P. bohemica* tvořily poměrně homogenní skupinu, oddělenou od zbývajících populací.
- Největší podíl molekulární variability byl zjištěn mezi jednotlivými populacemi (64,53 %).
- U studovaných populací/taxonů byla zjištěna nízká klonalita, vysoká genotypová diverzita a velice nízký polymorfismus.

6 Literatura

- Barnhart J.H. (1916) Segregation of genera in *Lentibulariaceae*. Memoirs of the New York Botanical Garden 6: 39–64.
- Bernátová D. (2010) K premenlivosti *Pinguicula vulgaris* v Západných Karpatoch na území Slovenska. Bull. Slov. Bot. Spoločn., Bratislava, 32/2: 175–181.
- Bělohávková, R. (1989). Tučnice česká – *Pinguicula bohemica* Krajina. In: Slavík B. et al. Vybrané ohrozené druhy flory ČSSR, Stud. ČSAV 10: 81–93.
- Bělohávková R. (2000) *Pinguicula* L. – tučnice. – In: Hejný, S. & Slavík, B. Editors: Květena ČR 6. Academia, Praha.
- Blanca G. (2001) *Pinguicula* L. In: Paiva J., Sales F., Dedge I.C. Aedo C. Aldaxoro J.J., Castroviejo S., Herrero A., Velayos M. Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares, Madrid: 81–96.
- Casper S.J. (1962) Revision der gettung *Pinguicula* in Eurasien. Feddes Peper. Beih., Berlin, 66: 1–148.
- Casper S.J. (1966). Monographie der Gattung *Pinguicula* L. Bibliotheca Botanica, 127/128, 1–209.
- Casper S.J. & Stimper R. (2009) Chromosome numbers in *Pinguicula* (*Lentibulariaceae*): survey, atlas, and taxonomic conclusions. Plant Syst. Evol. 277: 21–60.
- Cieslak T., Polepalli J.S., White A., Müller K., Borsch T., Barthlott W., Steiger J., Marchant A. and Legendre L. (2005) Phylogenetic analysis of *Pinguicula* (*Lentibulariaceae*): chloroplast DNA sequences and morphology support several geographically distict radiations. American Journal of Botany 92: 1723–1736.
- Danihelka J., Chrtěk J. Jr., Kaplan Zdeněk (2012) Checklist of vascular plants of the Czech Republic. Preslia 84: 647–811.
- De Candolle A.P. (1844) Prodromus systematis naturalis regnis regni vegetabilis VII. S. G. Mason, Paris, France.
- Degtjareva G.V., Casper S.J., Hellwing F.H. Schmidt A.R., Steiger J., Sokolff D.D. (2006) Morphology and nrITS Phylogeny of the Genus *Pinguicula* L. (*Lentibulariaceae*), with Special Attention to Embryo Evolution. Plant Biol. 8: 778–790.

- Doležal J., Lucretti S., Macas J. (1997): Analýza a třídění chromozomů rostlin pomocí průtokové cytometrie. *Biologické listy* 62: 131–160.
- Doležal J., Greilhuber J., Suda J. (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols* 2/9: 2233–2244.
- Dostál J. (1950) Květena ČSR a ilustrovaný klíč k určení všech cévnatých rostlin Díl II, část 2,3. Praha. 737–1408.
- Dostál J. (1958) Klíč k úplné květeně ČSR. ČSAV, Praha.
- Doyle J.J. & Doyle J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19: 11–15.
- Ehrich D. (2006) AFLPdat: a collection fo R functions for convenient handling of AFLP data. *Molekular Ecology Notes* 6: 603–604.
- Ernst A. (1961) Revision der Gattung *Pinguicula*. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 80: 145–194.
- Excoffier L. & Lischer H. (2010) Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes* 7: 574–578.
- Grulich V. (2012) Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. *Preslia* 84: 631–645.
- Hadač E. (1977) Poznámky o endemických rostlinách České socialistické republiky. *Zprávy České Botanické Společnosti*. Praha, 12: 1–15.
- Herbstová M., Koutecký P., Košnar J. (2008): *Metody molekulární biologie v rostlinné ekologii a systematice*. České Budějovice.
- Hloušková P. (2011) *Využití molekulárních markerů v taxonomii sinic*. Bakalářská práce, UP Olomouc.
- Huson D.H. & Bryant D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23: 254–267.
- Jobson R.W., Playford J., Cameron K.M., Albert V.A. (2003) Molecular Phylogenetics of *Lentibulariaceae* Inferred from Plastid rps16 Intron and trnL–F DNA Sequences: Implications for Character Evolution and Biogeography. *Systematic Botany*. Published by: American Society of Plant Tasonomists. Vol. 28, No. 1: pp.157–171.

- Kameyama Y. & Ohara M. (2006) Genetic Structure in Aquatic Bladderworts: Clonal Propagation and Hybrid Perpetuation. *Annals of Botany* 98: 1017–1024.
- Kameyama Y., Toyama M., Ohara M. (2005) Hybrid origins and F₁ dominance in the free-floating, sterile bladderwort, *Utricularia australis* F. *australis* (*Lentibulariaceae*). *American Journal of Botany* 93/3: 469–476.
- Kitner M., Lebeda A., Doležalová I., Maras M., Křístková E., Beharav A., Nevo E., Pavlíček T. & Meglic V. (2008): AFLP analysis of *Lactuca saligna* germplasm collections from four European and three Middle East countries. *Israel J. Pl. Sci.* 56: 185–193.
- Klika J. (1947) Rostlinsociologické jednotky slatin a lučních prostů v Polabí. *Vestník Královské České Společnosti Nauk*, Praha. cl. Manth.–natur., 1945/I: 1–31.
- Koopman W.J.M. (2005) Phylogenetic Signal in AFLP Data Sets. *Systematic Biology* 54/2: 197–217.
- Krahulcová A. & Jarolimová V. (1991) Relationship between *Pinguicula bohemica* Krajina and *Pinguicula vulgaris* L. (*Lentibulariaceae*) from the kryological point of view. *Preslia* 63/ 3–4: 323–328.
- Krajina V.J. (1927) *Pinguicula bohemica* Krajina. *Věstník Královské České Společnosti Nauk* 15: 1.
- Kubát K. (1986) Červená kniha vyšších rostlin Severočeského kraje. Praha.
- Kubát K. (2002) Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha.
- Legendre L. (2000) The genus *Pinguicula* L. (*Lentibulariaceae*): an overview. *Acta Bot. Gallica* 147/1: 77–97.
- Loureiro J., Rodriguez E., Doležal J., Santos C. (2006) Comparison of Four Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry. *Annals of Botany* 98:679–689.
- Majeský L., Vašut R.J., Kitner M., Trávníček B. (2012) The Pattern of Genetic Variability in Apomictic Clones of *Taraxacum officinale* Indicates the Alternation of Asexual and Sexual Histories of Apomicts. *Plos One* 7(8) e41868.
- Müller K.F., Borsch T., Legendre L., Porembski S. and Barthlott W. (2006) Recent Progress in Understanding the Evolution of Carnivorous *Lentibulariaceae* (*Lamiales*). *Pl Biol* 8:748–757.
- Neumann, L.M. (1901) *Sveriges flora*. Gleerup, Lund, Sweden.
- Pavlíček B.A., Hrda S., Flegr J. (1999) FreeTree – Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of

- the tree robustness, Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia-Prague* 45: 97–99.
- Peruzzi L. (2004) Contribution to the Cytotaxonomical Knowledge of the Genus *Pinguicula* L. (*Lentibulariaceae*): a Synthesis of Karyological Data. Technical Refereed Contribution 33: 103–110.
- Peruzzi L. & Gestri G. (2013) A new butterwort species (*Pinguicula*, *Lentibulariaceae*) from Northern Apennine (Italy). *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*
- Pyšek P., Danihelka J., Sádlo J., Chrtek J. (Jr.), Chytrý M., Jarošík V., Kaplan Z., Krahulec F., Moravcová L., Pergl J., Štajerová K., Tichý L. (2012) Catalogue of alien plants of the Czech Republic (2nd edition): checklist update, taxonomic diversity and invasion patterns. – *Nepůvodní flóra České republiky: aktualizace seznamu druhů, taxonomická diverzita a průběh invazí*. *Preslia* 84: 155–255.
- Rodondi G., Beretta M., Andreis C. (2010) Pollen morphology of alpine butterworts (*Pinguicula* L., *Lentibulariaceae*). *Review of Palaeobotany and Palynology* 162: 1–10.
- Shuka L., Xhulaj M., Kashta L., Casper S.J. (2007) The genus *Pinguicula* L. (*Lentibulariaceae*) in Albania – a critical review. *Wulfenia* 14: 15–65.
- Schlüter P.M. & Harris S.A. (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol Ecol Notes* 6: 569–572.
- Sohma K. (1975) Pollen morphology of the Japanese species of *Utricularia* L. and *Pinguicula* L. with notes on fossil pollen of *Utricularia* from Japan. *The Journal of Japanese Botany* 50 (164–179): 193–208.
- Studnička M. (1981) The Czech Butterwort *Pinguicula bohemica*. *Carnivorous Plant Newsletter*, Fullerton, 10: 38,40,44–47.
- Studnička M. (1984) *Masožravé rostliny*. Academia, Praha.
- Studnička M. (1986) Tučnice I. *Živa* 3: 90–91.
- Studnička M. (1986) Záchrana *Pinguicula bohemica* Krajina posilováním přírodní populace. In: *Problematika záchrany ohrožených druhů rostlin*, 96–102. Praha [Pobočka ČSVTS při Středočeské státní památkové péči a ochrany přírody Středočeského kraje].
- Studnička M. (1987) Nejnovější údaje o záchraně tučnice české v kultuře a v přírodě. – *Severočeská Příroda*, Litoměřice, 20: 95–99.
- Studnička M. (1988) Rod tučnice – přehled druhů. *Živa* 3: 86–87.

- Studnička M. (1989) Studie kriticky ohroženého druhu *Pinguicula bohemica* se zřetelem na možnosti jeho záchrany. Thesis, Bot. Ústav AVČR Průhonice, Praha.
- Studnička M. & Hejný S. (1992) Does *Pinguicula bohemica* exist? Carniv PI Newslett 21/3: 64–67.
- Suda J., Krahulcova A., Travníček P., Krahulec F. (2006) Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. – Taxon 55: 447–450.
- Tsymbalyuk Z.M., Mosyaki S.L., Bezusko L.G. (2008) Comparative morphological characterization of pollen grains of species of *Pinguicula* L. and *Utricularia* L in the flora of Ukraine. Ukr. Bot. Journ. 65: 520–534.
- Válová L. (2010) Rod tučnice (*Pinguicula*) v České republice. Diplomová práce, Katedra ekologie a životního prostředí, PřF UP, Olomouc.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Theo van de Lee, Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23/21: 4407–4414.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Günter K. (2005) DNA Fingerprinting in plants principle, methods and applications, Ed. 2. CRC Press, Boca Raton.
- Woloszczak E. (1889) *Pinguicula bicolor*. Oester. Bot. Zeitschr.. Wien. 25: 133.
- Yildirim H., Senol S.G., Pirhan A.F. (2012) *Pinguicula habilii* (*Lentibulariaceae*), a new carnivorous species from South–West Anatolia, Turkey. Phytotaxa 64: 46–58.
- Yolande H.–H. (2004) *Pinguicula* L.. Journal of Ecology 92: 1071–1118.
- Zamora R., Jamilena M., Rejón M.R., Blanca G. (1996) Two new species of the carnivorous genus *Pinguicula*, (*Lentibulariaceae*) from Mediterranean habitats. Plant Systematics and Evolution 200: 41–60.
- Zurzycki J. (1953) Studia nad polskimi tlustoszami (*Pinguicula* L.). – Studies in *Pinguicula*–species occurring in Poland. Fragm. Florist. Geobot. 1/1: 16–31.

7 Přílohy

Příloha 1.: Použité roztoky

βME (2-Mercaptoethanol)

CTAB (cetyltrimethylammonium bromide); 4%

10 ml TRIS 1 M; 4 ml EDTA 0,5 M; 28 ml NaCl 5 M; 8 ml destilované vody; 1 g PVP

Denaturační pufr s obsahem formamidu

0,125 g bromfenolové modře; 0,125 g xylenové modře; 25 ml destilované vody; 100 ml formamidu

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid): 0,5 M

EDTA 292,24 g/mol

PVP (polyvinyl pyrrolidon)

Silan (monosilan, SiH₄)

TBE (10 x)

108 g Tris, 55 g kyseliny borité H₃BO₃, 40 ml Na₂EDTA 0,5 M; rozpouštíme a doplníme destilovanou vodou do 1 l

TE (10 x)

10 ml 1 M TRIS (pH = 8); 2 ml 0,5 M EDTA (pH = 8); 88 ml destilované vody

TRIS (tris (hydroxymethyl) aminomethane); 1 M

TRIS 121,14 g/mol

Příloha 2.: Složení premixů a průběh pro jednotlivé kroky metody AFLP.

Tabulka 8.: Složení premixu pro restrikci.

	Množství pro 1 vzorek
Destilovaná voda	12,790 μ l
EcoRI BUFF	2,000 μ l
EcoRI	0,063 μ l
MseI	0,125 μ l
DNA (50 μ g/ μ l)	5,000 μ l
	$\Sigma=20 \mu$l

PCR protokol: 37 °C; 2,5 hod

Tabulka 9.: Složení premixu pro ligaci.

	Množství pro 1 vzorek
Destilovaná voda	3,00 μ l
EcoRi adapter	0,50 μ l
MseI adapter	0,50 μ l
LIGASE	0,50 μ l
	$\Sigma=5 \mu$l

PCR protokol: 37 °C; 3 hod

Tabulka 10.: Složení premixu pro preamplifikaci.

	Množství pro 1 vzorek
Destilovaná voda	11,850 μ l
Buffer (5x)	4,500 μ l
dNTPs (10 mM)	0,500 μ l
EcoA*primer	0,500 μ l
MseI*primer	0,500 μ l
goTag (Polymerase)	0,150 μ l
Ligase coctail	2,000 μ l
	$\Sigma=20 \mu$l

Tabulka 11.: PCR protokol pro preamplifikaci; 1 hod 25 min

	20x opakování cyklů 2c,3c,4c	
1	94 °C	3:00 min
2c	94 °C	0:30 min
3c	56 °C	1:00 min
4c	72 °C	1:45 min
5	72 °C	5:00 min
6	4 °C	–

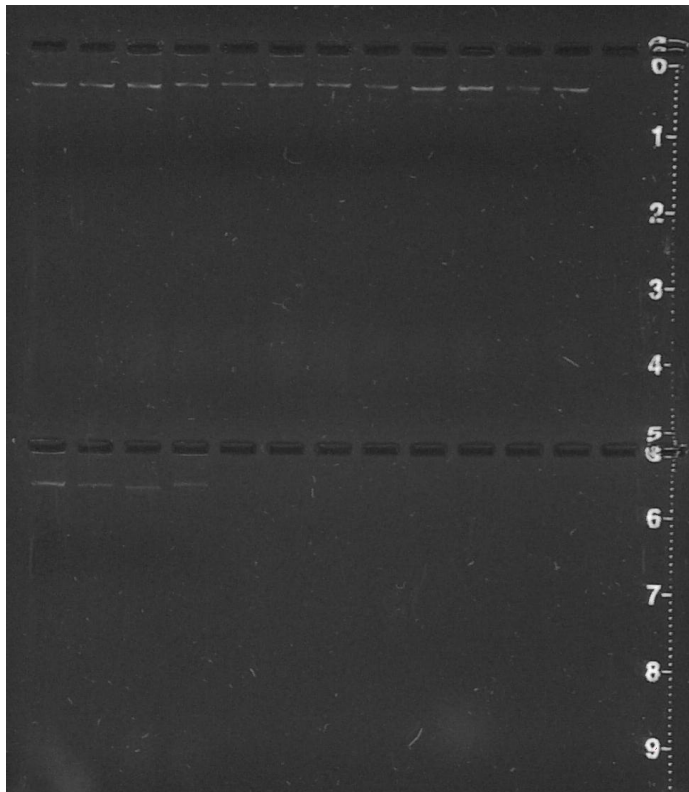
Tabulka 12.: Složení premixu pro amplifikaci.

	Množství pro 1 vzorek
Destilovaná voda	3,74 µl
Buffer (5x)	2,00 µl
dNTPs (10 mM)	0,20 µl
EcoA***primer	1,00 µl
MseI***primer	1,00 µl
goTag (Polymerase)	0,06 µl
preamplifikát (7x zředěný)	2,00 µl
	Σ=10 µl

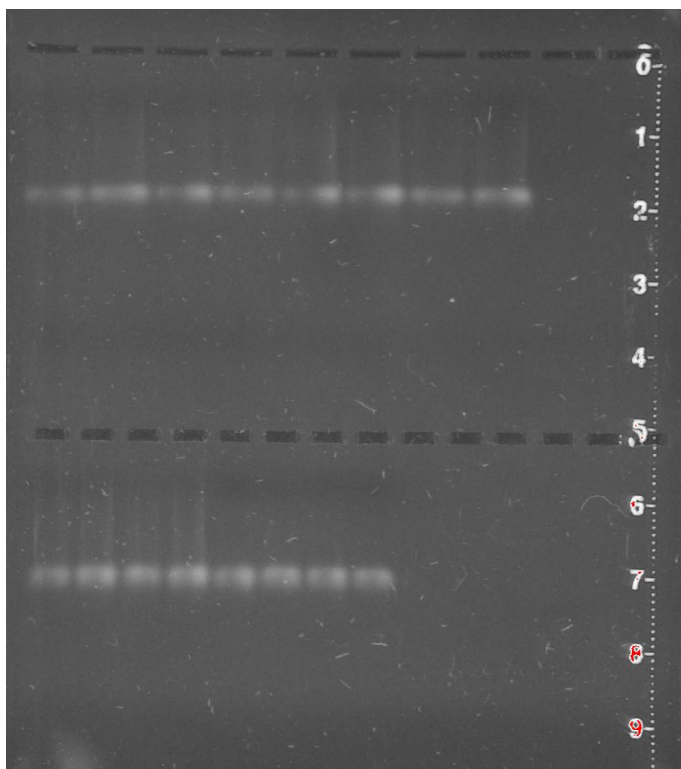
Tabulka 13.: PCR protokol pro amplifikaci; 49 min.

	20x opakování cyklů 2c,3c,4c	
1	95 °C	3:30 min
2c	95 °C	0:30 min
3c	60,1 °C	0:30 min
4c	72 °C	1:00 min
5	95 °C	0:30 min
6	56 °C	0:30 min
7	72 °C	1:00 min
8	4 °C	–

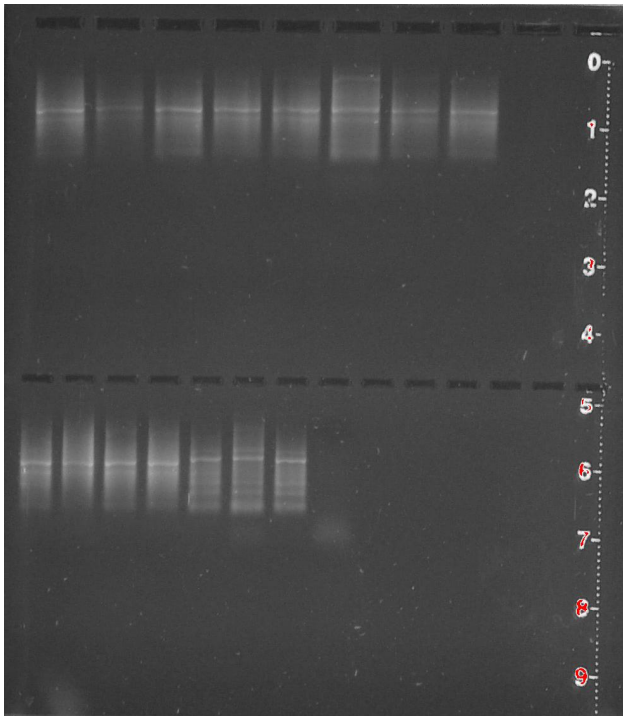
Příloha 3.: Dokumentace výstupů izolace a jednotlivých fází AFLP metody, vizualizovaných pomocí agarózového gelu (snímky byly nafoceny pod UV světlem).



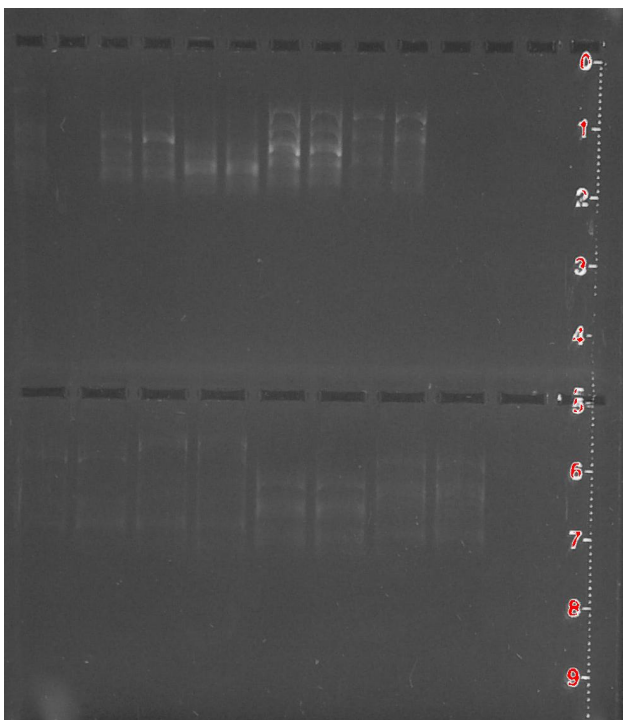
Obrázek 6.: Izolace



Obrázek 7.: Ligace



Obrázek 8.: Preamplifikace



Obrázek 9.: Amplifikace