

University of South Bohemia in České Budějovice  
Faculty of Science



# **Ecological comparison of three closely related species from *Myosotis palustris* group**

Ekologické porovnání tří blízce příbuzných druhů  
ze skupiny *Myosotis palustris*

PhD. thesis

**RNDr. Eva Koutecká**

Supervisor:

Prof. RNDr. Jan Lepš, CSc.

České Budějovice  
2011

Koutecká E. (2011): Ecological comparison of three closely related species from *Myosotis palustris* group. – PhD. Thesis [composite in English/Czech], University of South Bohemia, Faculty of Science. České Budějovice, Czech Republic, 162 pp.

## **Annotation**

The study is focused on comparative ecology of three closely related species from *Myosotis palustris* group. Importance of various functional traits of individual species was evaluated experimentally in the greenhouse (germination experiments), in the pot experiment and in the reciprocal transplant field experiment. Germination, production of clonal structures and response to various environmental conditions (competition, moisture conditions, etc.) were studied. The experimental data are supplemented with an analysis of phytosociological relationships of the studied species.

## **Declaration - Prohlášení**

I declare that this dissertation was fully worked out by myself using the cited literature only. I declare that in accordance with the Czech legal code § 47b law No. 111/1998 in valid version I consent to the publication of my dissertation in an edition made by removing marked parts archived by Faculty of Science in an electronic way in the public access section of the STAG database run by the University of South Bohemia in České Budějovice on its webpages.

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

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

České Budějovice, 24<sup>th</sup> June 2011

**Eva Koutecká**

## List of original articles:

- I. **Koutecká E.** & Lepš J. (2009): Effect of light and moisture conditions and seed age on germination of three closely related *Myosotis* species. *Folia Geobotanica* 44: 109-130.
- II. **Koutecká E.** & Lepš J. (2011): Performance of three closely related *Myosotis* species in an experiment in which substrate quality and competition were manipulated. *Preslia* 83: xx-xx. (in press)
- III. **Koutecká E.** & Lepš J.: Growth and survival of three closely related *Myosotis* species in a three years transplant experiment. (manuscript)
- IV. **Koutecká E.,** Koutecký P. & Lepš J.: Comparison of community composition and site conditions between three closely related *Myosotis* species. (manuscript)
- V. **Chaloupecká E.** & Lepš J. (2004): Equivalence of competitor effects and tradeoff between vegetative multiplication and generative reproduction: case study with *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa*. *Flora* 199: 157-167. (Appendix of Thesis)

## Authors contribution to the articles

**I. – V.** In all articles (published and manuscripts), which are part of the PhD thesis, Eva Koutecká (Chaloupecká) is the main author, which correspond to her participation. Eva Koutecká contributed to the design of the experiments, collected the data, processed them for analysis, analysed them (with exception of **IV.** manuscript) and evaluated them, and wrote the papers.

Jan Lepš, as a supervisor of the PhD thesis and co-author of all the papers and manuscripts, contributed to the design of the experiments, helped with data analyses, and with formulation of texts. In published papers Jan Lepš helped with responses to reviewers' comments.

**IV.** Petr Koutecký as the co-author helped with processing of the collected data to analysis and conducted the statistical analyses of the data.

**V.** This paper is based on the author's bachelor thesis.

## **Acknowledgements**

Especially, I want to sincerely thank to my supervisor Jan Šuspa Lepš, for his help, never-ending support, advice and time.

Special thanks belong to my husband Petr Koutecký for professional, but also personal help and support, and for final appearance of this publication.

My thanks also belong to many colleagues and friends, who helped me with seedlings counting, with planting and watering of my plants and with visiting of field (Vojta Lanta, Simona Poláková, Tereza Lamošová-Michálková, Hanka Urbanová, and many others).

I also want to thank to Tereza Rejnková for useful comments to my Czech language.

My special thanks are addressed to my mother and children, for their support and suggestion that life is not only about work.

## **Financial support**

The presented work was supported by grants: GAČR 206/03/H034 and 206/09/1471; MSMT 6007665801 and LC 06073

# Table of contents

Chapter I:	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
Chapter II:	<b>Ekologické porovnání tří blízce příbuzných druhů <i>Myosotis</i> ze skupiny <i>M. palustris</i> [in Czech]</b>	<b>7</b>
Chapter III:	<b>Effect of light and moisture conditions and seed age on germination of three closely related <i>Myosotis</i> species</b>	<b>31</b>
	Koutecká E. & Lepš J. (2009) Folia Geobotanica 44: 109-130	
Chapter IV:	<b>Performance of three closely related <i>Myosotis</i> species in an experiment in which substrate quality and competition were manipulated</b>	<b>57</b>
	Koutecká E. & Lepš J. (2011) Preslia 83: xx-xx [in press]	
Chapter V:	<b>Growth and survival of three closely related <i>Myosotis</i> species in a three years transplant experiment</b>	<b>81</b>
	Koutecká E. & Lepš J. [manuscript]	
Chapter VI:	<b>Comparison of community composition and site conditions between three closely related <i>Myosotis</i> species</b>	<b>117</b>
	Koutecká E., Koutecký P. & Lepš J. [manuscript]	
Chapter VII:	<b>Conclusions</b>	<b>137</b>
Appendix:	Equivalence of competitor effects and tradeoff between vegetative multiplication and generative reproduction: case study with <i>Lychnis flos-cuculi</i> and <i>Myosotis nemorosa</i>	141
	Chaloupecká E. & Lepš J. (2004) Flora 199: 157-167	



# **CHAPTER I**

## **Introduction**





## Introduction

Closely related (sub)species are suitable objects for comparative studies and experiments in plant ecology (Krahulec 1994, Krahulec et al. 1999): because they share majority of their evolutionary history, differences in their traits are more likely caused by ecological adaptation to different habitats and environmental conditions. Comparison of habitat preferences and traits (and ecophysiology) of related species helps us to understand processes that led to their speciation. Understanding the relationship between the traits of species and their habitat preferences is one of the more important goals of present ecological research (Lavorel & Garnier 2002). Closely related species have been studied from various aspects, with regard to their taxonomy, (eco)physiology, ecology and phytosociology. But for full understanding of adaptation mechanisms, we need to combine field observations of species habitat and phytosociological preferences with experimental studies of their ecology. Unfortunately, such complex studies of related species are not common (e.g. (Wallossek 1999; Eckstein et al. 2004, 2006).

In the present study we focus on three taxa from *Myosotis palustris* group: *M. caespitosa* C.F.Schultz, *M. palustris* subsp. *laxiflora* (Rchb.) Schübl & Mart. and *M. nemorosa* Besser (the taxonomic concept adopted in the Flora of the Czech Republic, Štěpánková 2000). Ecological studies of individual species are rare and their interpretation is complicated by the changing taxonomy and nomenclature within the *Myosotis palustris* group; it differs among individual taxonomic classifications in various countries and times (e. g. Hegi 1979, Schuster 1967, Štěpánková 2000). No comparative ecological study of more species within the *Myosotis palustris* group is available. Phylogenetic study of the complex based on molecular data is not available. However, differences in morphological characteristics separate *M. caespitosa* species as the most different from the rest of *M. palustris* group (Štěpánková 2002, Štěpánková 2000) and in some floras it is separated into *Caespitosae* group (e. g. Adler et al. 1994). The three species studied differ from each other in their ploidy level, and with some experience may be safely identified (Štěpánková 2000).

All three *Myosotis* species prefer wet habitats (various types of wet meadows and forests and banks of running and standing waters), but rarely share a locality. Moreover, they differ in their traits, such as life span, intensity of clonal growth, or seed germination, although data about some of their traits differ according to source and have high width of variability. For example, comparison of published data about life strategy and clonality of the three *Myosotis* shows considerable differences: *M. caespitosa* is usually considered to be an annual (Grime et al. 1981, Štěpánková 2000), non-clonal annual to biennial without clonal potential (Klimešová & Klimeš 1998) or biennial semirosette hemicryptophyte (Klotz et al. 2002), which is non-clonal and does

not form vegetative lateral shoots (Klimešová & Klimeš 1998); *M. paustris* subsp. *laxiflora* is long-lived perennial hemicryptophyte species (Štěpánková 2000, Klotz et al. 2002), strongly clonal, forming both the below-ground and above-ground rooting lateral shoots of stem origin (Štěpánková 2000, Klotz et al. 2002); *M. nemorosa* is considered to be annual to biennial with no or only low clonal potential (Klimešová & Klimeš 1998), but also long-lived perennial hemicryptophyte (Štěpánková 2000, Klotz et al. 2002, Chaloupecká & Lepš 2004), and clonal, with forming of short below-ground shoots of stem origin (Štěpánková 2000, Chaloupecká & Lepš 2004). All three species are sufficiently common in the study area of southern Bohemia.

Plant species, but also individual populations within a species are expected to be adapted to local conditions (including both, the physical environment, and the biotic interactions in the surrounding community). Reciprocal transplant experiments are often used to quantify this adaptation and so deduce the intensity of selection of genotypes (Silvertown & Charlesworth 2001). Plants are sessile organisms, with individual populations more or less isolated from each other; therefore we can expect differences caused by local adaptation also among populations within individual species (Lenssen et al. 2004). Should the closely related species have an ecological significance, then their ecological differentiation should be greater than ecological differentiation of individual populations within a species. However, we are not aware of any study, which combines transplanting of related plant species and involving more populations of each species and comparing variation between closely related species with variation of populations within individual species.

Germination behaviour is an important part of a species regeneration strategy (Baskin & Baskin 1998, Fenner 1992, Grubb 1977). The germination stage is very sensitive to external conditions, e. g. amount and quality of light (red/far red ratio), or temperature (Baskin & Baskin 1998, Fenner). Dormancy and its interruption are possible mechanisms of regulation and timing of germination. Closely related species have been shown to differ in reproductive strategy (Karlsson & Milberg 2008; Moravcová et al. 2001), or effects of some factor on survival, growth and reproduction (e.g. Stöcklin 1999).

The potential for clonal growth is an important trait, which is connected with life strategy and influences the competitive ability of individual species (Herben et al. 1994, van Groenendael et al. 1996, Klimeš et al. 1997). Both, the relative representation of clonal species in a community and also the clonal behaviour of individual species differ according to environmental conditions, including competitive pressure from neighbouring vegetation.

Competition of surrounding vegetation is one of the most important micro-scale factors in the field. Mostly, negative effect of competition from surrounding plants on growth of target plants has been documented under various nutrient conditions (Wilson & Tilman 1991). Gaps are places with

reduced competition in plant communities, which represent suitable micro-sites for seedling germination and establishment and for growth of young plants (e.g. Mehrhoff & Turkington 1996; Morgan 1997; Špačková et al. 1998). On the other hand, seedlings and young plants can be also more exposed to negative conditions there, e.g. drought, standing water, extreme temperatures, herbivores (Kotorová & Lepš 1999).

To reveal the relationship between traits of the three closely related species and their ecological and phytosociological behaviour, we have carried out three manipulative experiments (sensitivity of seed germination to selected factors, greenhouse pot experiment, and field transplant experiment), and compared their results with results of analysis of a set of phytosociological relevés from southern part of Bohemia, containing the three studied species.

### **Aims of the thesis**

The main objectives of the thesis are:

- to verify experimentally the published data about selected functional traits of three *Myosotis* species
- to compare the differences between closely related *Myosotis* species with the variability among populations within individual species in all the three experiments.
- to compare, how is germination of three experimental species influenced by selected external factors (soil moisture, light intensity and quality, low temperatures) and by age of seeds in the greenhouse
- to compare germination of several populations of three experimental species in several field localities.
- to evaluate the role of microsite type, representing different competitive pressure from surrounding vegetation, on survival, growth and flowering of experimental plants of three *Myosotis* species in pot and in reciprocal transplant field experiments.
- to quantify, if ecological differences between the three closely related *Myosotis* taxa revealed experimentally are reflected in their habitat preferences and phytosociological affinity, characterized by plant community composition of their respective habitats.

### **References**

- Adler, W., Oswald, K. & Fischer, R. 1994. *Exkursionsflora von Österreich*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart und Wien, pp. 705 – 708.
- Baskin C. C. & Baskin J. M. (1998): Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, San Diego.
- Chaloupecká E. & Lepš J. (2004): Equivalence of competitor effects and tradeoff between vegetative multiplication and generative reproduction: case study with *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa*. - *Flora* 199: 157-167.

- Eckstein R. L., Danihelka J., Hölzel N. & Otte A. (2004): The effects of management and environmental variation on population stage structure in three river-corridor violets. *Acta Oecologica - International Journal of Ecology* 25: 83-91.
- Eckstein R. L., Hölzel N. & Danihelka J. (2006): Biological Flora of Central Europe: *Viola elatior*, *V. pumila* and *V. stagnina*. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 8: 45-66.
- Fenner M. (1992): Seeds: The ecology of regeneration in plant communities. Redwood Books, Trowbridge.
- Grime J. P., Mason G., Curtis A. V., Rodman J., Band S. R., Mowforth M. A. G., Neal A. M. & Shaw S. (1981): A comparative study of germination characteristics in a local flora. - *J. Ecol.* 69: 1017-1059.
- Grubb P. J. (1977): The maintenance of species-richness in plant communities: the importance of the regeneration niche. *Biol. Rev.* 52: 107-145.
- Hegi, G. 1979. *Illustrierte Flora von Mittel-europa Band III, Teil 2*. Berlin, Hamburg.
- Herben T., Hara T., Marshall C. & Soukupová L. (1994): Plant clonality: biology and diversity. - *Folia Geobot. Phytotax.* 29: 113-122.
- Karlsson L. M. & Milberg P. (2008): Variation within species and inter-species comparison of seed dormancy and germination of four annual *Lamium* species. *Flora* 203: 409-420.
- Klimeš L., Klimešová J., Hendriks R. & van Groenendael J. (1997): Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. - In: de Kroon H. & van Groenendael J. (eds), *The ecology and evolution of clonal plants*, p. 1-29, Backbuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Klimešová J. & Klimeš L. (1998): CLOPLA1 (CLOnal PLAnts, version 1) - a database of clonal growth in plants of central Europe. -URL: [<http://www.butbn.cas.cz/klimes/>].
- Klotz S., Kühn I. & Durka W. (2002): BIOLFLOR - Eine Datenbank mit biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland. Bonn-Bad, Godesberg.
- Kotorová I. & Lepš J. (1999): Comparative ecology of seedling recruitment in an oligotrophic wet meadow. - *J. Veg. Sci.* 10: 175-186.
- Krahulec F. (1994): Clonal behaviour in closely related plants. - *Folia Geobot. Phytotax.* 29: 277-289.
- Krahulec F., Marhold K. & Schmid B. (1999): Ecology of closely related plant species: An introduction. *Folia Geobot.* 34: 1-5.
- Lavorel S. & Garnier E. (2002): Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Funct. Ecol.* 16: 545-556.
- Lenssen J. P. M., Menting F. B. J. & Van der Putten W. H. (2003): Plant responses to simultaneous stress of waterlogging and shade: amplified or hierarchical effects? *New Phytol.* 157: 281-290.
- Mehrhoff, L. A. & Turkington, R. (1996): Growth and survival of white clover (*Trifolium repens*) transplanted into patches of different grass species. *Canad. J. Bot.* 74: 1243-1247.
- Moravcová, L., Zákřavský, P. & Hroudová Z. (2001): Germination and seedling establishment in *Alisma gramineum*, *A. plantago-aquatica* and *A. lanceolatum* under different environmental conditions. *Folia geobotanica* 36: 131-146.
- Morgan, J. W. (1997): The effect of gap size on establishment, growth and flowering of the endangered *Rutidosia leptorrhynchoidea* (Asteraceae). *J. Appl. Ecol.* 34: 566-576.
- Schuster, R. 1967. Taxonomische Untersuchungen über die Serie Palustres M. Pop. der Gattung *Myosotis* L. *Feddes Repertorium* 74: pp. 39-98.
- Silvertown J. W. & Charlesworth D. (2001): Introduction to plant population biology. Blackwell, Oxford.
- Stöcklin, J. 1999. Differences in life history traits of related *Epilobium* species: clonality, seed size and seed number. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* 34: 7-18.

- Špačková, I., Kotorová, I. & Lepš, J. (1998): Sensitivity of seedling recruitment to moss, litter and dominant removal in an oligotrophic wet meadow. *Folia Geobot.* 33: 17-30.
- Štěpánková J. (2000): 16. *Myosotis* L. – pomněnka. - In: Slavík B. (ed.), Květena ČR 6. [Flora of the Czech Republic, vol. 6], p. 216-234, Academia, Praha.
- Štěpánková J. (2002): 14. *Myosotis* L. – pomněnka (Boraginaceae Juss.). In: Kubát K., Hrouda L., Chrtěk J. jun., Kaplan Z., Kirschner, J. & Štěpánek J. (eds.), Klíč ke květeně České republiky, p. 526-530. (Key to the flora of the Czech Republic, in Czech). Academia, Praha.
- van Groenendael J. M., Klimeš L., Klimešová J. & Hendricks R. J. J. (1996): Comparative ecology of clonal plants. – *Phil. Trans. Royal Soc. London, Series B* 351: 1331–1339.
- Wallossek, C. 1999. The acidophilous taxa of the *Festuca varia* group in the Alps: new studies on taxonomy and phytosociology. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* 34: 47-75.
- Wilson, S. & Tilman, D. (1991): Components of plant competition along an experimental gradient of nitrogen availability. *Ecology* 72: 1050-1065.



# CHAPTER II

**Ekologické porovnání tří blízce příbuzných druhů *Myosotis* ze skupiny *M. palustris***





## Ekologické porovnání tří blízce příbuzných druhů ze skupiny *Myosotis palustris*

### Proč

Jedním z důležitých zájmů současné ekologie rostlin je studium vztah mezi druhovými charakteristikami rostlin (*traits*) a preferovanými vlastnostmi prostředí, a dále možný adaptivní charakter těchto vztahů (Lavorel & Garnier 2002), a dále nakolik mají tyto vztahy adaptivní charakter. Vhodnou cestou je studium blízce příbuzných druhů, neboť tyto mají společnou větší část své evoluční historie, než druhy nepříbuzné (Krahulec 1994, Krahulec et al. 1999). Některé shodné druhové vlastnosti jsou dány spíše společnou evoluční historií příbuzných druhů (*evolutionary constraints*) a nemají nutně adaptivní význam (Silvertown & Charlesworth 2001). Naopak rozdílné charakteristiky blízce příbuzných druhů ve vztahu ke konkrétním rozdílům v charakteristikách jejich prostředí vznikly mnohem pravděpodobněji přizpůsobením ke konkrétním podmínkám stanoviště, takzvanou ekologickou adaptací, a budou mít zřejmě i funkční význam pro rozdíly v jejich ekologickém chování.

### Příkladové studie blízce příbuzných druhů

Studium blízce příbuzných druhů se zaměřuje na jejich taxonomii, (eko)fysiologii, ekologii či fytoecologii. Přístup může být buď popisný – shrnující údaje o druhových vlastnostech či vztazích mezi příbuznými druhy, nebo experimentální. Bohužel, komplexnější studie více přístupů porovnání blízce příbuzných druhů jsou vzácné.

Několik prací se zabývá studiem tří vzácných druhů *Viola*, např. souhrnem a srovnáním jejich taxonomie, morfologie, životního cyklu, ekologie a stanovištních nároků, či jejich experimentální populační biologií (Eckstein et al. 2006; Eckstein et al. 2004). Výsledky těchto prací shrnují vlastnosti a požadavky jednotlivých druhů na jejich úspěšné přežívání, mimo jiné vyzdvihují důležitost pozitivního vlivu managementu stanovišť na uchycování a růst semenáčků. Můžeme najít další obsáhlejší studie blízce příbuzných druhů, kombinující fytoecologický přístup s dalšími. Například spíše souhrnně popisné studie dvojic druhů, z nichž jeden je běžný a druhý vzácný: Daskobler et al. (1999) se zaměřili na morfologii, rozšíření a fytoecologické vazby dvou druhů *Stellaria*; Boscaiu et al. (1997) na rozšíření a další druhové charakteristiky u dvojice druhů *Cerastium*. Hölzel (2003) demonstroval na příkladové studii tří vzácných druhů *Viola* užitečnost využití fytoecologických snímků a údajů o druhových charakteristikách z elektronické fytoecologické databáze. Druhy se tu dobře rozlišily podle druhových vazeb i gradientu vlhkosti a chemismu půdy.

Pokusné studie (Harper & Chancellor 1959) několika blízce příbuzných druhů rodu *Rumex* (které mohou růst pohromadě na stejných stanovištích) doložila, že pokud byly tyto druhy vysévány jednotlivě, pak reagovaly obdobně (svou klíčivostí, růstem a další produkcí semen) na stejné vlhkostní a půdní podmínky. Naopak při současném výsevu dvojic různých druhů *Rumex* docházelo k vzájemné interakci a odezva některých druhů na vodní režim či půdní typ se změnila.

Taxonomické studie (morfologické, cytologické,...) u blízce příbuzných druhů jsou poměrně časté, neboť mívají za cíl ověřit a porovnat či nově rozlišit jednotlivé taxony. Například práce Wallossek (1999) úspěšně potvrzuje rozlišení druhů ze skupiny *Festuca varia*, a to pomocí morfologie, fytoecologie a dalších ekologických charakteristik. Studie skupiny *Asplenium trichomanes* se zabývá především jejich cytologií a morfometrikou (Ekrt & Štech 2008). Studie blízce příbuzných druhů ze skupiny *Centaurea phrygia* se zabývá jejich morfologií a cytologií, ale je doplněna i fytoecologickými snímky a údaji o rozšíření druhů (Koutecký 2007).

Mnohé práce se zaměřují na zkoumání regenerační niky blízce příbuzných druhů. Například Petruš & Lepš (2000) srovnávali populační dynamiku druhů *Pedicularis sylvatica* a *P. palustris*, a mimo jiné potvrdili důležitost obhospodařování lučního porostu, při kterém zde vznikají místa se sníženou konkurencí (*gapy*), vhodná pro úspěšné klíčení a přežívání semenáčků. Další studie příbuzných druhů se zabývaly reprodukční strategií příbuzných druhů. Například porovnáním klíčivosti semen u čtyř druhů rodu *Lamium* byl zaznamenán rozdíl v síle dormance mezi jednotlivými druhy, ačkoliv všechny druhy reagovaly podobně na různé teplotní stratifikace i na různé teplotní podmínky při vlastním klíčení. Navíc zde byla zkoumaná i vnitrodruhová variabilita v klíčivosti, která byla vysoká (Karlsson & Milberg 2008). Obsáhlejší experimentální studie se zabývá vlivem různých faktorů na klíčení a následné uchycení a vývoj semenáčků tří druhů rodu *Alisma* (Moravcová et al. 2001). Mezi těmito druhy byly zaznamenány rozdíly v dormanci i klíčivosti semen, ale i v odolnosti vegetativních orgánů v různých přírodních podmínkách. Porovnáním klíčivosti čtyř druhů *Impatiens* v laboratorních podmínkách i v květináčovém pokusu bylo zjištěno, že domácí druh *I. noli-tangere* má ve srovnání s ostatními invazivními druhy menší klíčivost, a k tomu jen krátkodobou banku semen (Perglová et al. 2009). Studie dvou druhů *Viola* se zabývala jejich klíčivostí, ale i následnou plodností a přežíváním (Moora et al. 2003). Bylo zjištěno, že vzácnější druh *V. elatior* je více závislý na obhospodařování lokalit, které umožňuje vznik mikrostanovišť vhodných ke klíčení i následnému přežití mladých rostlin.

Vlivem vybraných charakteristik prostředí na přežívání, růst a reprodukci blízce příbuzných druhů se zabývala např. již zmiňovaná studie druhů *Rumex* (Harper & Chancellor 1959), či práce zkoumající *trade-off* v alokaci mezi klonální a sexuální reprodukcí u několika příbuzných druhů rodu

*Epilobium* (Stöcklin 1999), kde bylo zjištěno, že i klonální druhy investují značnou část svých zdrojů do semen, která slouží ke kolonizaci nových míst, a ačkoliv jsou semena menší než u druhů neklonálních, je jich naopak hodně. Dorman et al. (2009) experimentálně zkoumali, nakolik se v různých typech prostředí projevuje lokální adaptace u čtyř příbuzných druhů *Iris*. Ačkoliv se druhy mezi sebou lišily, lokální adaptace genotypů nebyla nepotvrzena. Studie Wu et al. (2010) se zabývala tím, jak jsou vnějšími podmínkami (vlhkostí, typem půdy) ovlivňovány různé druhové charakteristiky u tří příbuzných druhů *Mimulus*. Zjistili, že u jednoho ze sledovaných druhů významně klesla produkce semen s nižší dostupností vody. Fytcenologická a ekologická studie čtyř taxonů *Bolboschoenus* (Hroudová et al. 1999) ukazuje, že ačkoliv jsou si tyto druhy morfologicky podobné, jsou rozlišitelné ekologicky, neboť rostou v jiných typech prostředí a rostlinných společenstvech. Další studie Diekmann & Lawesson (1999) porovnávala šířku nik u čtyř dvojic blízce příbuzných lesních druhů pomocí fytcenologických dat a charakteristik prostředí (zjišťovaných pomocí Ellenbergových čísel). Zjistili, že větší šířku niky měly rostliny ze severu Evropy (okraje areálu výskytu) oproti centrální Evropě, a to zřejmě proto, že je tu méně druhů, a tudíž i nižší konkurence.

Mnoho studií se zabývá polyploidními komplexy rostlin - např. Flegrová & Krahulec (1999) u dvou příbuzných druhů *Anthoxanthum odoratum* a *A. alpinum*, kde zkoušeli reciproké výsadby. Významným faktorem u těchto druhů se ukázala být nadmořská výška, neboť *A. odoratum* ve vyšších nadmořských výškách méně kvetla, zatímco *A. alpinum* byla v nižších polohách vytlačena konkurencí. Urbanska-Worytkiewicz (1980) porovnávala reprodukci a klonální růst u několika druhů *Cardamine*, dvou diploidních druhů a jejich kříženců. Ukázalo se, že triploidní hybrid *C. insueta* sice produkuje málo semen a téměř neklíčí, zato se úspěšně šíří klonálně. Zato amfidiploid (allohexaploid) *C. schulzii* ke svému šíření úspěšně využívá jak generativní reprodukci, tak klonální růst.

Studium rozšíření blízce příbuzných druhů dohromady s porovnáním jejich druhových charakteristik nám může pomoci nalézt odpovědi na mnoho důležitých otázek v rostlinné ekologii. Například srovnávací studie (rozšíření, fytcenologie, druhových charakteristik) párů či skupin blízce příbuzných druhů, kde jeden je vzácný a druhý běžný, nám může pomoci vysvětlit jejich vzácnost. Dokládá to například obsáhlejší studie dvou druhů *Banksia* (Witkowski & Lamont 1997), které mají velmi podobné vlastnosti, ale vzácnost jednoho z nich je způsobená nejspíš jeho ekologickou vazbou na specifický typ prostředí, který ubývá kvůli fragmetaci krajiny. Studie dvojice druhů *Solidago* (Walck et al. 2001) ukázala, že běžný druh *S. altissima* je oproti vzácnému druhu *S. shortii* úspěšnější v mnoha druhových vlastnostech (např. v klonalitě, produkci semen). Také již dříve zmiňované studie (Boscaiu et al. 1997; Daskobler et al. 1999; Eckstein et al. 2004; Moora et al. 2003) se zabývají studiem dvojic či trojic blízce příbuzných a různě vzácných druhů. Práce Rünk

et al. (2004, 2010) a Rünk & Zobel (2009) doložily, že rozdíly v růstových charakteristikách mezi třemi příbuznými druhy *Dryopteris* vysvětlují i jejich lokální rozšíření.

Další možnost ekologických studií se nabízí u dvojic (či skupin) příbuzných druhů, kde jeden je původní, a druhý nepůvodní (často úspěšnější, invazní), kde vzájemným porovnáním můžeme zjistit, které druhové charakteristiky mají největší vliv na větší úspěšnost invazního druhu (např. již zmiňovaná studie Perglová et al. (2009) zabývající se klíčivostí čtyř druhů *Impatiens*). Výsledky mohou mít praktické využití v restaurační ekologii či v ochraně přírody.

### **Důležitost porovnání vnitrodruhové x mezidruhová variability**

Při porovnávání druhů v ekologických studiích se téměř výhradně používá k porovnání pouze jedna populace od každého druhu, a tudíž se úplně pomíjí vnitrodruhová variabilita. Vzácně se porovnávají genotypy v rámci jedné populace. Přitom vysoká variabilita mezi populacemi studovaného druhu byla prokázána v mnoha studiích (např. Chen et al. 2009 u druhu *Rumex palustris*; van Tienderen & van der Porn 1991 u druhu *Plantago lanceolata*). To dokládá potřebu, aby byla vnitrodruhovým rozdílům (reprezentovaným variabilitou mezi populacemi, ne pouze variabilitou mezi individui v rámci jedné každé populace) věnovaná náležitá pozornost. Rozdíly mezi populacemi v rámci druhu jsou způsobeny mimo jiné i fragmentací krajiny, kdy jsou jednotlivé populace izolované od ostatních – protože genetická výměna (*gene flow*) mezi populacemi je pak značně omezená, může snadno dojít k diferenciaci jednotlivých populací. Navíc, ke speciaci mezi populacemi dochází i v malém měřítku (což zde znamená vzdálenost od několika cm do několika stovek metrů), jak dokládá např. souhrnná studie na rostlinných druzích s různou životní strategií, růstovou formou a různě vzácných (Linhart & Grant 1996).

### **O studovaných druzích rodu *Myosotis***

Na světě existuje okolo 80 (100) druhů rodu *Myosotis*. Jedná se o byliny z čeledi *Boraginaceae*, z nichž se převážná většina vyskytuje v temperátní oblasti v Eurasii, ale i na jižní polokouli (bohaté zastoupení má tento rod hlavně v oblasti Nového Zélandu), několik zástupců rodu dále můžeme nalézt v horách tropické jižní Afriky, na Nové Guineji a v Austrálii (Štěpánková 2000). Fylogeneticky pochází celý rod zřejmě ze severní polokoule (Winkworth et al. 2002).

Tato práce se zaměřuje na ekologické porovnání tří blízce příbuzných (pod)druhů ze skupiny *Myosotis palustris*. Skupina *Myosotis* ser. *Myosotis* – takzvaných „bahenních pomněnek“ (Syn.: *Myosotis* ser. *Palustres* M. POPOV, *M. palustris* agg.) je taxonomicky obtížná. Od ostatních druhů rodu *Myosotis* se skupina liší charakterem kališní trubky, která je roztroušeně chlupatá, pouze s

rovnými (nikoliv háčkovitými) přitisklými chlupy a kališní cípy dosahují nanejvýš poloviny délky celého kalicha. V Květeně ČR (Štěpánková 2000) a v klíči ke Květeně ČR (Štěpánková 2002) jsou podle současného členění rozlišovány následující taxony ze skupiny *Myosotis palustris*: *Myosotis palustris* se dvěma poddruhy subsp. *palustris* a subsp. *laxiflora*, *M. brevisetacea*, *M. nemorosa* a *M. caespitosa*.

Bohužel, neexistuje fylogenetická studie komplexu *Myosotis palustris* založená na molekulárních datech. Na základě rozdílů v morfologických charakteristikách (např. přítomnost a orientace chlupů na lodyze a spodní straně listů, hloubka dělení kališní trubky, charakter lodyžního větvení, schopnost a tvar vytváření klonálních výběžků, velikost a barva květů a semen – tvrdek) je však druh *M. caespitosa* nejvíce odlišný od ostatních druhů ze skupiny *M. palustris* (Štěpánková 2002, Štěpánková 2000), a v některých flórách je dokonce oddělován do samostatné skupiny *Caespitosae* (např. Adler et al. 1994). Existuje několik taxonomických studií, které se zabývají karyologickým výzkumem druhů skupiny *Myosotis palustris*, a ukazují, že druhy z této skupiny mají různé ploidní úrovně od diploidní *M. nemorosa* až po oktoploidní *M. caespitosa* (Przywara 1983, Štěpánková 1993).

Neexistuje ekologická studie, která by vzájemně porovnávala druhy komplexu *Myosotis palustris* mezi sebou. Vzácně můžeme najít ekologické práce, které se zabývají jen jedním druhem ze skupiny *M. palustris* nebo některý z druhů okrajově zmiňují (např. studie Albrecht et al. (1997) a Lenssen et al. (2003) zabývající se vlivem vybraných ekologických charakteristik na klíčení *M. palustris* (přesněji *M. scorpioides*)). Interpretace jejich výsledků je ale často komplikovaná, neboť ne vždy se můžeme spolehnout na správné taxonomické určení jednotlivých druhů *Myosotis*.

Hlavní důvody nedůsledného a nepřesného určování jednotlivých taxonů *Myosotis* ze skupiny *palustris* jsou následující:

- Taxonomické členění rodu *Myosotis* ser. *Myosotis* je v různých flórách rozdílné a během času u něj došlo i k mnoha výrazným změnám z hlediska chápání jednotlivých taxonů (např. u vymezení (pod)druhů *M. brevisetacea* a *M. pal.* subsp. *laxiflora*) (Adler et. al. 1994; Dostál 1950; Dostál 1989; Grau & Merxmüller 1972; Hegi 1979; Holub 1966; Králik & Šípošová 1993; Rothmaler 1976; Schuster 1967; Štěpánková 2000).
- Zástupci skupiny *Myosotis palustris* jsou si morfologicky velice podobní a jednotlivé taxony se proto nesnadno rozlišují. Hlavní určovací znaky se nalézají na kvetoucích rostlinách, na pohlavních orgánech či na spodních listech, které již bývají v druhé půlce sezóny odumřelé. Proto jsou sterilní rostliny často určovány pouze jako *Myosotis palustris* agg. (či *M. palustris* sensu lato, *M. nemorosa* sensu lato), jak dokládají např. i snímky z Národní fytoecnologické databáze (Chytrý & Rafajová 2003).

- Situaci navíc komplikuje i vysoká fenotypová variabilita a morfologická plasticita jak mezi, tak i v rámci populací.

Pro tuto ekologickou studii byly vybrány tři (pod)druhy *Myosotis*: *M. caespitosa* C. F. SCHULTZ – pomněnka trsnatá, *M. pal.* subsp. *laxiflora* (REICHENB.) SCHÜBLER ET MARTENS – pomněnka bahenní volnokvětá a *M. nemorosa* BESSER – pomněnka hajní, neboť ačkoliv se jedná o druhy podobné a vázané na vlhká stanoviště, jsou mezi nimi rozdíly jak v jejich vlastnostech a chování (např. v ploidii, ve vegetativním růstu - klonalitě, délce života a životní strategii, v kvetení), tak zároveň i v ekologických vazbách na určité typy rostlinných společenstev a vlastnosti stanovišť (např. vlhkost, zastínění, nadmořská výška, hustota a sukcesní fáze vegetace). Navíc, všechny tři druhy *Myosotis* jsou poměrně hojně zastoupeny v cílovém území (Jižní Čechy a část Vysočiny), kde byly prováděny i fytoecologické snímky, a bylo tudíž možné nasbírat dostatečný počet semen potřebných ke všem pokusům, a to z několika různých populací od každého druhu.

### **Přehled druhových charakteristik u zkoumaných druhů *Myosotis***

Životní strategie je u všech tří porovnávaných druhů *Myosotis* podle literatury stejná, a to CSR (konkurenční – stres-tolerantní – ruderal; Klotz et al. 2002) – kdy v sobě druh spojuje vlastnosti všech tří základních strategií, jak jsou definovány podle Grima (1977). Přesto se ale jednotlivé druhy podle údajů v literatuře liší svojí vytrvalostí i charakterem klonálního růstu. Za druh s nejkratší životností je považována *M. caespitosa*, kde se nejčastěji udává, že je to druh jednoletý (Grime et al. 1981, Štěpánková 2000) či maximálně dvouletý polorůžicový hemikryptofyt bez klonálního růstu (Klimešová & Klimeš 1998, Klotz et al. 2002). Naproti tomu druh *Myosotis palustris* subsp. *laxiflora* je jasně dlouhověký vytrvalý hemikryptofyt, je silně klonální a vytváří podzemní i nadzemní kořenující výběžky stonkového původu – takzvané rhizomy a stolony (Štěpánková 2000, Klotz et al. 2002). Nejrůznorodější jsou údaje o vytrvalosti druhu *M. nemorosa*, který je považován jednak za jednoletý až dvouletý druh s malým potenciálem klonálního růstu (Klimešová & Klimeš 1998) ale i za vytrvalý hemikryptofyt (Štěpánková 2000, Klotz et al. 2002, Chaloupecká & Lepš 2004).

Všechny tři druhy jsou zřejmě zastoupeny v semenné bance (pravděpodobně přechodná semenná banka - *transient seed bank*) na stanovištích, kde rostou, a mají i velmi dobrou klíčivost. Ale konkrétní údaje jsou vzácné.

Porovnání tří druhů ze skupiny *Myosotis palustris*

Tab. 1.– Přehled publikovaných údajů o druhových vlastnostech tří blízce příbuzných druhů *Myosotis*, které jsou předmětem této studie.

Druhová vlastnost	<i>M. caespitosa</i> C. F. SCHULTZ	<i>M. pal. subsp. laxiflora</i> (REICHENB.) SCHÜBLER ET MARTENS	<i>M. nemorosa</i> BESSER
Ploidie	Oktoploid (2n=88)	Hexaploid (2n=66)	Diploid (2n= 22)
Délka života	Jednoletý druh (Grime et al. 1981, Štěpánková 2000) Jedno- až dvouletý druh (Klimešová & Klimeš 1998), dvouletý hemikryptofyt (Klotz et al. 2002)	Vytrvalý hemikryptofyt (Štěpánková 2000, Klotz et al. 2002)	Jedno- až dvouletý druh bez klonálního růstu (Klimešová & Klimeš 1998), vytrvalý hemikryptofyt (Štěpánková 2000, Klotz et al. 2002, Chaloupecká & Lepš 2004)
Klonalita	Bez klonálního růstu, netvoří postranní vegetativní výhony (Klimešová & Klimeš 1998)	Silně klonální, vytváří podzemní rhizomy i nadzemní kořenující stolony (Štěpánková 2000, Klotz et al. 2002)	Klonální, vytváří krátké podzemní rhizomy (Štěpánková 2000, Chaloupecká & Lepš 2004)
Životní strategie podle Grima (Grime 1977)	CSR (Klotz et al. 2002)	CSR (Klotz et al. 2002); CR (Grime et al. 1987, pod jménem <i>M. scorpioides</i> )	CSR (Klotz et al. 2002)
Výškové stupně ve střední Evropě (Štěpánková 2000)	Od nížin do hor (do 630 m n.m.)	Od nížin do hor (do 650 m n.m.)	Od nížin do hor (až 1400 m n.m.)
Floristické zóny (Klotz et al. 2002)	Meridionální, submeridionální, J a S temperátní a boreální	Submeridionální, J a S temperátní a boreální	J a S temperátní
Oceánita (Klotz et al. 2002)	Slabě oceánický druh	Slabě suboceánický druh	Suboceánický druh
Habitat preferences	Bahnité břehy tekoucích i stojatých vod, mokřady, okraje rybníků a obnažená rybníční dna, náplavy okolo tekoucích vod, vlhké příkopy, pramenné oblasti, okraje rákosin a ostřicových porostů (Grime et al. 1981, Štěpánková 2000)	Mokřady, náplavy řek a potoků, druh je schopný růst i pod hladinou vody (Grime et al. 1987, Klotz et al. 2002, Lenssen et al. 2003), náplavy řek a potoků (Štěpánková 2000)	Vlhké louky, náplavy potoků, pramenné oblasti, vlhké lesy, vlhké příkopy (Štěpánková 2000)
Kvetení	Od května do června (Štěpánková 2000)	Od května do září (Grime et al. 1987, Štěpánková 2000, Klotz et al. 2002)	Od května do srpna (Štěpánková 2000)
Semenná banka	Neexistují data	Přechodná a dlouhodobá (Thompson et al. 1997, Jensen 1998)	V semenné bance má početné zastoupení (Weiterová 2008)
Klíčivost	Dosahuje až 100% (Grime et al. 1981)	Dobrá klíčivost (52-96%; Grime et al. 1981)	Dobrá klíčivost (65% v terénu a 80% ve skleníku; Kotorová & Lepš 1999)

## Vybrané důležité druhové charakteristiky, na které se zaměřuje tato srovnávací studie

### *Regenerační nika – klíčení*

Diferenciace regeneračních nik je jedním z hlavních mechanismů koexistence druhů v rostlinných společenstvech (Grubb 1977). Rozdíly ve fenologii a v klíčení semen hrají významnou roli v regenerační strategii druhů, a mohou být také zásadními druhovými charakteristikami, kterými se odlišují druhy blízce příbuzné (Petruš & Lepš 2000, Baskin & Baskin 1998, Fenner 1992, Grubb 1977). Klíčení je citlivá fáze, kdy velmi záleží na správném načasování. Často je období dozrávání semen nevhodné pro okamžité vyklíčení – bývá již relativně sucho, často následuje i období nevhodné pro následné přežívání semenáčků. Pozdržení klíčení na období s vhodnějšími podmínkami umožňuje takzvaná semenná dormance. Jsou-li semena dormantní, potom neklíčí okamžitě po dozrání a opuštění mateřské rostliny, ale až po delším časovém intervalu. Ten může být dlouhý pár týdnů, měsíců, ale i let či desetiletí. Včasné přerušení dormance záleží na fyziologických mechanismech uvnitř semene, ale hlavně na vnějších podmínkách (např. musí být semena nejprve určitou časovou periodu vystavena nízkým teplotám, a teprve poté jsou schopná vyklíčit, nastanou-li vhodné vnější podmínky (jaro). Existuje tu ale trade-off v načasování klíčení, neboť čekání na vhodný okamžik se může vyplatit, ale promeškání vhodného okamžiku naopak může vést k zániku semene. Semena mohou snadno přerůst okolní vegetací, či jinými semenáčky, mohou být snědena či jinak zničena. U většiny semen navíc jejich životnost klesá v čase (např. Leck et al. 1989), a opožděné klíčení ze starších semen může mít navíc za následek i redukováný růst rostlin a jejich nižší finální biomasu v konkurenci s okolními rostlinami, jak ukazují např. Rice & Dyer (2001) ve své studii s druhem *Bromus tectorum*. Aby bylo riziko nevhodného načasování klíčení minimální, mají rostliny (i jejich semena) mechanismy, kterými vnímají své okolí, aby mohly reagovat na vhodné externí podmínky, dané např. množstvím a kvalitou světla (poměrem red/far red záření), vlhkostí či okolní teplotou (Baskin & Baskin 1998, Fenner 1992; Pons 1992). Vhodná kombinace těchto faktorů se u jednotlivých druhů obvykle liší, a souvisí s jejich ekologickým chováním a nikou. Druhy rostoucí na narušovaných či dočasných stanovištích jsou často krátkověké, bez či s limitovaným klonálním růstem, zato jsou často schopné vyklíčit velmi rychle, jakmile k tomu nastanou vhodné podmínky. Tyto druhy často mají malá semena, která jsou ve srovnání s velkými semeny mnohem citlivější na sluneční záření (Milberg et al. 2000). Protože jsou populace těchto druhů na semenech životně závislé, probíhá u nich pozitivní selekce genotypů s vysokou klíčivostí. Přežívání druhů narušovaných stanovišť je také závislé na semenech ze semenné banky, kde je důležité, aby dobrá klíčivost přetrvala i u starších semen (např. Ritland 1983, Venable & Brown



1988, Grime 2001). I tady však existuje u rostlin trade-off v investicích do množství, velikosti a kvality (např. trvanlivosti) semen. Variabilita v klíčivosti obecně zvyšuje pravděpodobnost úspěšnosti jednotlivých populací a druhů, přestože mnoho jedinců nepřežije (Silvertown 1997).

Klíčivost semen pokusných druhů *Myosotis* byla sledována ve dvou skleníkových pokusech a v klíčícím pokusu v terénu na několika různých lokalitách.

#### *Konkurenceschopnost, konkurence a konkurenční zásahy v pokusech – gapy*

Konkurence v rostlinném společenstvu probíhá mezi sousedními rostlinami, a to jak mezi různými druhy, tak mezi jedinci stejného druhu. Úspěšnost přežívání, růstu a reprodukce rostlin je ovlivňována vlastnostmi nejbližšího okolí, a záleží zde opravdu i na velmi malém měřítku (Bischoff et al. 2006). Vždyť k adaptivní genetické diferenciaci mezi rostlinnými populacemi dochází také i v malém měřítku (vzdálenosti pouhých několika centimetrů až několika metrů), což bylo úspěšně potvrzeno na rostlinách s různou životní formou, délkou života a různě vzácných (Linhart & Grant 1996). V rostlinném společenstvu je z hlediska konkurence důležitá především velikost konkurujících rostlin, proto bývají rostliny se stejnou životní formou považované za ekvivalentní konkurenty (Goldberg & Werner 1983). Sledování vlivu konkurence v rostlinném společenstvu je důležitou součástí rostlinné ekologie. Většina těchto sledování potvrzuje negativní vliv konkurence na přežívání, růst i reprodukci sledovaných rostlin, což bylo prokázáno i při různé dostupnosti živin (Wilson & Tilman 1991). V malém měřítku lze v rostlinném společenstvu najít i místa se sníženou konkurencí od okolních rostlin (*gaps*), která reprezentují vhodná mikrostanoviště pro klíčení semenáčků a další růst mladých rostlin (např. Špačková et al. 1998; Mehrhoff & Turkington 1996; Morgan 1997). Na druhou stranu, tato místa mohou být více vystavena špatným vnějším podmínkám (např. suchu, či naopak zaplavení, extrémním teplotám, napadení herbivory; Kotorová & Lepš 1999). Nepříznivé podmínky mohou nastat v důsledku extrémní změny vnější situace, ale mohou být také součástí typické sezónní variability (např. letní vysychání).

Pomocí transplantačních pokusů bývá studována lokální adaptace populací či druhů. Že lokální adaptace existuje, potvrzuje mnoho pokusů (např. Joshi et al. 2001; Knight & Miller 2004; Rice & Knapp 2008). Známé jsou však i případy, kdy byly na pokusné lokalitě úspěšnější populace cizí, ve srovnání s domácí, jak ukazuje např. reciproční výsevový pokus s populacemi druhu *Bromus tectorum* (Rice & Mack 1991). Jak silný je vliv rozdílných přírodních podmínek ve srovnání s geografickou a genetickou blízkostí rostlinných populací, dokazuje také např. studie Montalvo & Ellstrand (2000). Existuje překvapivě málo experimentálních studií, které by zkoumaly vliv konkurence v

rostlinných společenstvech pomocí reciproční výsadby (př. Reader et al. 1994; Rice & Knapp 2008).

### *Klonalita*

Významnou druhovou charakteristikou rostlinných druhů je klonalita, která je spojená s jejich růstovou formou a životní strategií. Klonalita významně ovlivňuje přežívání a konkurenceschopnost daného druhu v rostlinném společenstvu (Herben et al. 1994, van Groenendael et al. 1996, Klimeš et al. 1997). Klonální růst rostlin bývá přímo ovlivněn konkurenčním tlakem od okolních druhů rostlinného společenstva, ale i konkurencí od ostatních jedinců stejného druhu. Náš předchozí terénní pokus s druhem *Myosotis nemorosa* (Chaloupecká & Lepš 2004) ukazuje, že tento druh reagoval vyšší intenzitou klonálního růstu na sníženou okolní konkurenci (růst v „*gapech*“), a že mezi investicemi do klonálního šíření a kvetení nebyl zaznamenaný žádný trade-off (Chaloupecká & Lepš 2004).

Jedním z důležitých cílů mé práce bylo sledování charakteru a intenzity klonálního růstu jednotlivých druhů. U druhu *M. caespitosa* bylo zajímavé ověření, zda jde opravdu o druh krátkověký – jedno až dvouletý (Grime et al. 1981, Klimešová & Klimeš 1998, Štěpánková 2000, Klotz et al. 2002). Také u druhu *M. nemorosa* bylo zajímavé potvrdit či vyvrátit údaje o jeho vytrvalosti a intenzitě klonality, které se různí (Klimešová & Klimeš 1998, Štěpánková 2000, Klotz et al. 2002, Chaloupecká & Lepš 2004). U všech tří druhů *Myosotis* šlo i o ověření podoby vytvářených klonálních orgánů (stolony, rhizomy či dceřiné růžice), o jejich početnost a o intenzitu rozrůstání a šíření jednotlivých klonů.

Vlivu konkurence na přežívání, růst a kvetení tří druhů *Myosotis*, a zároveň i klonalitě sledovaných druhů *Myosotis*, byla věnována pozornost ve dvou experimentálních studiích: v tříletém zahradním květináčovém pokusu a ve tříletém terénním pokusu, kde byly použity reciproké výsadby sledovaných druhů na několika lokalitách.

### **Cíle práce**

Hlavními cíly mé disertační práce bylo:

- pokusně ověřit, nakolik vybrané funkční druhové vlastnosti (traits) tří sledovaných druhů *Myosotis* odpovídají publikovaným údajům o těchto druzích
- porovnat rozdíly mezi blízce příbuznými druhy *Myosotis* s variabilitou mezi populacemi v rámci jednotlivých druhů
- porovnat ve skleníkovém pokusu klíčivost tří sledovaných druhů *Myosotis* za různých vnějších podmínek (vlhkost půdy, intenzita a kvalita záření, vystavení nízké teplotě) a při různém stáří semen

- porovnat klíčení více populací od každého ze tří druhů *Myosotis* na několika různých lokalitách
- zhodnotit vliv mikrostanovišť na přežívání, růst a kvetení tří druhů *Myosotis*, a to v květináčovém i v terénním pokusu (kde byly použity reciproké výsadby sledovaných druhů na několika lokalitách)
- shrnout, nakolik ekologické rozdíly a rozdílné druhové vlastnosti (zjištěné v našich pokusech) mezi třemi blízce příbuznými druhy *Myosotis* odpovídají jejich požadavkům na vlastnosti charakteristických typů prostředí, kde rostou (vyjádřeno zastoupením typických rostlinných společenstev a dalšími ekologickými vlastnostmi prostředí)

### **Shrnutí a výsledky jednotlivých pokusů:**

#### ***Klíčení – dva skleníkové pokusy***

Viz kapitolu č. 3:

Koutecká E. & Lepš J. (2009): Effect of light and moisture conditions and seed age on germination of three closely related *Myosotis* species. – Folia Geobot. 44: 109-130.

Klíčivost tří blízce příbuzných druhů *Myosotis* byla porovnána ve dvou skleníkových pokusech. V prvním pokusu bylo zkoumáno, jak klíčivost ovlivňují dva externí faktory – vlhkost (byly použity 4 úrovně zásahu od suchého, přes vlhký, střídavě zaplavovaný až po trvale zaplavený) a světlo (byly použity 3 typy zásahu: bez zástinu, stínění zelenou fólií a stínění nepropustným štítem); pokus byl v kompletním faktoriálním uspořádání. V druhém pokusu bylo studováno, jaký vliv má na klíčivost stáří použitých semen (čerstvá a 3 roky stará semena) a způsob jejich skladování (jestli před klíčením byla či nebyla semena vystavena nízkým teplotám). V obou pokusech bylo sledované konečné procento vyklíčených semen a zároveň i rychlost klíčení reprezentovaná veličinou  $T_{50}$  (čas, kdy vyklíčila polovina z vysetých semen, udávaný počtem dnů). V obou pokusech byla použita semena z více populací od každého druhu, proto mohly být vzájemně porovnány nejen tři sledované druhy *Myosotis* ale i mezipopulační variabilita v rámci jednotlivých druhů.

#### ***Hlavní cíle a očekávání***

Při porovnání vlivu různé intenzity dvou externích faktorů – vlhkosti a světla – na klíčivost jsme očekávali, že citlivost jednotlivých druhů *Myosotis* k těmto faktorům bude odpovídat jejich nárokům na podmínky prostředí, ve kterém běžně rostou. Při testování klíčivosti různě starých semen tří druhů *Myosotis* (vystavených navíc i různým teplotním podmínkám při skladování před vlastním klíčením) jsme předpokládali, že nejlepší klíčivost by mohla zůstat zachována u krátkověkého a neklonálního druhu *M. caespitosa*, neboť tento ze sledovaných druhů musí nejvíce spoléhat na zachování a šíření pomocí semen a

semenné banky. V tomto klíčícím pokusu jsme porovnávali i mezidruhovou a mezipopulační variabilitu u tří druhů *Myosotis*. Předpokládali jsme, že *M. caespitosa* jakožto druh krátkověký a z nejméně narušovaných stanovišť (kde je největší selekční tlak na úspěšné uchycení semenáčků) by mohl mít nejlepší klíčivost u většiny populací.

### *Výsledky skleníkových pokusů s klíčením*

Všechny tři druhy *Myosotis* potřebovaly ke klíčení vlhkost a byly negativně ovlivněny suchem. Zastínění mělo na klíčivost druhů pouze nízký vliv, který se projevil malým zpomalením klíčení pod zelenou fólií simulující změněnou kvalitou světelného záření vegetační pokryv. Vystavení semen nízkým teplotám při skladování nemělo na klíčení vliv, což ukazuje, že semena *Myosotis* z velké části nejsou dormantní. Výsledky skleníkového pokusu s klíčením tří druhů *Myosotis* ukazují na rozdíly mezi druhy, ale zároveň ukazují i na to, že byly tyto rozdíly relativně malé ve srovnání s vysokou variabilitou mezi populacemi. Srovnání klíčivosti jednotlivých druhů *Myosotis* převážně potvrdilo naše předpoklady ve vztahu k charakteru jejich přirozených stanovišť. Konkrétně, *M. caespitosa* (krátkověký druh rostoucí na dočasných stanovištích) byl druh s nejvyšší (dosahující často i 100%) a nejrychlejší klíčivostí v obou pokusech ve srovnání s ostatními dvěma druhy *Myosotis*, a to napříč všemi svými populacemi. Navíc, konečná klíčivost tohoto druhu ještě nepatrně vzrostla s rostoucím věkem semen, zatímco u ostatních dvou druhů s věkem klesla (jak je u většiny semen běžné). I silně klonální druh *Myosotis palustris* subsp. *laxiflora* dosahoval v obou pokusech vysoké klíčivosti, variabilita mezi jeho populacemi byla střední. U druhu *M. nemorosa* byla v obou pokusech zaznamenána největší mezipopulační variabilita. Zajímavé je i to, že klíčivost *M. nemorosa* byla ve srovnání s oběma ostatními druhy zpomalena v trvale zaplavených podmínkách pokusu (to se shoduje i s požadavky na charakter prostředí, neboť tento druh roste ve srovnání s oběma ostatními i v sušších typech stanovišť, jako jsou např. luční společenstva či vysychavé příkopy).

### ***Zkoumání vegetativního růstu v různém substrátu a konkurenci - květináčový pokus***

Viz kapitulu č. 4:

Koutecká E. & Lepš J. (2011): Performance of three closely related *Myosotis* species in an experiment in which substrate quality and competition were manipulated. – *Preslia* 83: xx–xx [in press]

Tříletý květináčový pokus se zabýval odezvou tří blízkých příbuzných druhů pomněnek ze skupiny *Myosotis palustris* na konkurenci a typ substrátu. Rostliny ze čtyř populací od každého druhu byly pěstovány ve faktoriálně uspořádaných kombinacích dvou typů substrátu (živinami bohatý zahradnický substrát a jeho směs s pískem) a konkurence (s či bez konkurenční trávy *Holcus*

*lanatus*). Bylo sledováno přežívání, klonální růst a některé další charakteristiky jednotlivých druhů. Protože pokusné rostliny byly opět z více populací, mohly být i v této pokusné práci navíc sledovány nejen rozdíly mezi druhy, ale i mezipopulační variabilita v rámci druhů.

### *Hlavní cíle a očekávání*

Hlavním cílem práce bylo porovnat, zda se rozdíly mezi druhy shodují s našimi očekáváními, která máme na základě našich znalostí jejich druhových vlastností a stanovištních preferencí. Očekávali jsme, že druhy rostoucí na dočasných stanovištích (v našem případě hlavně *M. caespitosa*, možná i *Myosotis palustris* subsp. *laxiflora*) budou přežívat nejkratší dobu, a zároveň budou nejvíce ovlivněny kompeticí. Všechny druhy budou pozitivně ovlivněny vyšším obsahem živin v substrátu, ale tento efekt by měl být mnohem výraznější v květináčích bez konkurenčního druhu *Holcus lanatus*, který je lépe adaptovaný na živinami bohaté podmínky, a měl by tudíž jakožto silný kompetitor (Lepš 1999) odčerpat část živin a vyrušit tím jejich pozitivní vliv. Zajímalo nás, objeví-li se trade-off v alokaci zdrojů mezi klonálním (vegetativním) růstem a kvetením (reprezentujícím generativní šíření). Ačkoliv tento trade-off v alokaci nebyl zaznamenán v pokusné studii u druhu *M. nemorosa* (Chaloupecká & Lepš 2004), mohl by se vyskytnout v případě omezených zdrojů, nebo u krátkověkého druhu *M. caespitosa*, který je podle údajů v literatuře jedno- až dvouletý (Grime et al. 1981, Klimešová & Klimeš 1998, Klotz et al. 2002, Štěpánková 2000).

### *Výsledky květináčového pokusu*

Všechny tři druhy *Myosotis* se shodně ukázaly jako konkurenčně slabé, negativní vliv kompetice byl velmi silný. Pro růst a přežívání všech druhů se jako vhodnější jeví živinami chudší písčité směs; podobně i pro klíčení semenáčků, které probíhalo ve dvou vlnách: na jaře (květen) a na podzim (říjen/listopad). Naproti tomu výška rostlin byla větší v živinami bohatší půdě. Chování pokusných druhů dobře odpovídalo jejich preferencím pro jednotlivé typy stanovišť. V řadě případů se ukázalo, že rostliny žijí déle, než je uváděno v literatuře.

Druh *M. caespitosa* je považován za krátkověký, omezený na dočasná stanoviště typu obnažených rybníčních den. V našem květináčovém pokusu tento druh reagoval na konkurenci nejcitlivěji a do konce druhé sezóny v konkurenčních zásazích všechny rostliny zahynuly. V květináčích bez konkurence však několik rostlin přežilo i do třetí sezóny a překvapivě úspěšně se klonálně rozrůstaly pomocí dceřiných růžic či krátkých stolonů. Typickým stanovištěm druhu *M. palustris* subsp. *laxiflora* jsou břehy řek a rybníků, které jsou často narušované proudící vodou. V našem pokusu přežívaly rostliny tohoto druhu nejlépe a většina se jich zároveň i nejlépe klonálně rozrůstala

pomocí vysokého počtu vytvářených rhizomů i stolonů, schopných prorůst plochu i obvod celého květináče. Tím druh *M. palustris* subsp. *laxiflora* potvrdil svůj velký potenciál k rychlé vegetativní kolonizaci narušovaných a dosud neobsazených stanovišť. Druh *M. nemorosa* se ve srovnání s ostatními dvěma druhy vyskytuje na převážně stabilnějších typech prostředí, například na loukách, které jsou ale zároveň i prostředím s největší konkurencí od okolních druhů rostlin. V našem pokusu byly rostliny *M. nemorosa* druhé nejúspěšnější v přežívání i v klonálním růstu, kdy vytvářely buď velmi krátké nekořenující stolony či krátké rhizomy.

Mezipopulační variabilita byla v rámci jednotlivých druhů různá, neboť zatímco mezi populacemi *M. nemorosa* byla variabilita ve všech sledovaných charakteristikách největší (což zřejmě souvisí s lokální adaptací tohoto druhu k podmínkám na velmi různých typech stanovišť), odezvy populací *M. caespitosa* byly naopak v rámci druhu velmi podobné.

### ***Zkoumání vegetativního růstu v různé konkurenci na několika lokalitách - reciproční přesazovací pokus***

Viz kapitulu č. 5:

Koutecká E. & Lepš J.: Growth and survival of three closely related *Myosotis* species in a three years transplant experiment [manuscript]

Reciproční transplantační pokus byl prováděn se třemi blízce příbuznými druhy pomněnek ze skupiny *Myosotis palustris* na pěti pokusných lokalitách, na každé z nich se jeden z pokusných druhů i přirozeně vyskytuje. K výsadbám byly použity dvě různé populace od každého druhu. Mladé pokusné rostliny byly vysazované do tří typů mikrostanovišť s různou intenzitou konkurence od okolní vegetace: „gap“ (místo bez nadzemní konkurence, nejméně 15 cm v průměru), „střední konkurence“ (místo s méně hustou vegetací) a „silná konkurence“ (hustá vegetace nebo trs travin). Přežívání rostlin bylo sledováno po tři roky, některé klonální a růstové charakteristiky byly měřeny 7x během dvou vegetačních sezón. Pomocí kontrastů (statistická metoda) bylo porovnáno, jestli je na stanovišti původní druh *Myosotis* ve srovnání s ostatními dvěma na jednotlivých lokalitách úspěšnější. Na šesti podobných lokalitách byl proveden i pokus zkoumající klíčivost tří příbuzných druhů *Myosotis*, a to celkem s dvanácti různými populacemi. V obou pokusech byly porovnány rozdíly mezi jednotlivými druhy, ale i mezipopulační variabilita v rámci jednotlivých druhů.

### ***Hlavní cíle a očekávání***

V našem pokusu jsme chtěli porovnat rozdíly mezi třemi blízce příbuznými druhy *Myosotis*, i rozdíly mezi populacemi v rámci druhů. Zajímalo nás, jestli budou mít domácí druhy *Myosotis* na svých lokalitách výhodu v přežívání, růstu, klíčení., Dále nás zajímalo, jak budou jednotlivé druhy reagovat na

různou úroveň konkurence. Očekávali jsme, že vliv konkurence na všechny sledované druhy bude negativní, a to nejvíce u druhu *M. caespitosa*, má nejkratší délku života, a roste pouze na dočasných a narušovaných stanovištích. U tohoto druhu jsme také očekávali nejlepší klíčivost.

#### *Výsledky recipročního přesazovacího pokusu*

Byly zaznamenány velké rozdíly mezi druhy *Myosotis*, stejně jako mezi populacemi druhů. Jednotlivé druhy *Myosotis* byly na svých „domácích“ lokalitách úspěšnější pouze v některých druhových charakteristikách, a to bylo přežívání a výška klonů, zatímco v klonalitě, kvetení a klíčení nebyly „domácí“ druhy na svých lokalitách průkazně lepší. Jediná lokalita, kde byl domácím druh *M. caespitosa*, byla zaplavena hned po první sezóně a obě lokality s domácím druhem *M. palustris* subsp. *laxiflora* byly zničeny během druhé sezóny. Tato skutečnost ilustruje, že lokality obou druhů mají pouze dočasný charakter a bývají často narušované (například bývají zaplaveny či spláchnuty povodní).

V našem pokusu měl druh *M. caespitosa* nejvyšší úmrtnost klonů a nejcitlivěji reagoval na okolní konkurenci, což odpovídá jeho udávané délce života (jedno- či dvouletý druh) a také charakteru prostředí, ve kterém běžně roste (narušovaná a krátkodobá stanoviště). Zároveň ale tento druh, ve srovnání s oběma dalšími, vytvářel během první sezóny největší množství dceřiných růžic a výhonů v gapech, a několik jeho klonů úspěšně přežilo až do třetí sezóny. Druh *M. pal.* subsp. *laxiflora* přežíval nejlépe na svých domácích lokalitách, kde byly během první sezóny jeho klony i největší. Tento druh reagoval svým růstem nejcitlivěji na konkurenci, a proto se nejlépe rozrůstal v gapech, zatímco jeho klonální šíření bylo omezené se vzrůstající konkurencí. To odpovídá jeho schopnosti rychlé kolonizace a šíření podél vod na narušovaných místech bez vegetace, ale zároveň i nízké konkurenceschopnosti v pozdějších fázích sukcese vegetace. Druh *M. nemorosa* měl nejvyšší klony na svých domácích lokalitách v průběhu celého pokusu. Rostliny tohoto druhu navíc nejlépe přežívaly, a to na třech lokalitách z pěti první sezónu, a na všech zbývajících lokalitách během druhé a třetí sezóny, což ukazuje na vysokou schopnost adaptace klonů *M. nemorosa* k dlouhodobému přežívání v různých typech prostředí.

Samotná intenzita konkurence v různých typech mikrostanovišť měla jen slabý vliv na přežívání pokusných druhů (jako hlavní efekt), ale vhodnost různých typů mikrostanovišť se lišila mezi jednotlivými lokalitami a také v čase. V obou dvou experimentech (transplantačním i výsevovém) se ukázalo, že zde jsou především velké rozdíly mezi pokusnými lokalitami. Výsledky výsevového pokusu ukázaly, že jsou velké rozdíly v klíčivosti mezi populacemi v rámci jednotlivých druhů *Myosotis*, a to především u druhu *M. nemorosa*, zatímco rozdíly mezi druhy nebyly průkazné.

**Porovnání mezidruhových vazeb a vybraných charakteristik stanovišť u tří blízce příbuzných druhů bahenních pomněnek – fytoecologické snímky**

Viz kapitolu č. 6:

Koutecká E., Koutecký P. & Lepš J.: Comparison of community composition and site conditions between three closely related *Myosotis* species [manuscript]

Pořizování fytoecologických snímků tří blízce příbuzných druhů *Myosotis* sloužilo především k seznámení se s charakterem a ekologií přirozených stanovišť, kde se cílové druhy *Myosotis* vyskytují, a také k zmapování vazeb na okolní rostlinná společenstva. Zároveň byla při této činnosti sbírána semena a byly hledány pokusné lokality pro další pokusy. Snímky byly pořizovány v jižní části České republiky na lokalitách, kde se přirozeně vyskytoval alespoň jeden z cílových druhů. Zároveň byly na místech snímků subjektivně zaznamenávány (kromě základních údajů, jako např. pokryvnosti jednotlivých pater, nadmořská výška, sklon,...) některé další charakteristiky stanovišť, jako vlhkost, zástin. V následné analýze získaných dat (převážně pomocí mnohorozměrných metod) byly jednotlivé snímky kromě těchto zaznamenaných údajů charakterizovány i průměrnými hodnotami Ellenbergových čísel.

Přestože všechny tři druhy rostou ve vlhkém prostředí, jen velmi vzácně rostou pohromadě na jedné lokalitě, a i jejich fytoecologické snímky se svým druhovým složením značně liší. Když porovnáme požadavky sledovaných tří druhů *Myosotis* na vlastnosti prostředí, kde rostou, s výsledky našich předchozích experimentů (klíčení, květináčový a reciproční přesazovací pokus), můžeme ukázat, že některé důležité funkční vlastnosti vybraných druhů *Myosotis* jsou vhodně využity k přežití, růstu a reprodukci v jejich charakteristických typech prostředí, a odpovídají i typickým rostlinným společenstvům, ve kterých rostou.

Druh *M. caespitosa* rostl na obnažených rybníčních dnech a jejich okrajích. Jeho výskyt byl pozitivně korelovaný s intenzitou záření a negativně s hustotou pokryvnosti bylinného patra, což odpovídá iniciálním sukcesním stádiím vegetace a dočasnosti tohoto typu prostředí. Také to odpovídá výsledkům našich předchozích pokusů, kde byl druh *M. caespitosa* nejslabší v konkurenceschopnosti a dlouhodobém přežívání, ale měl nejlepší klíčivost (která byla vysoká, nejrychlejší, a také konstantní v průběhu několika let a u mnoha různých populací).

Výskyt druhu *M. palustris* subsp. *laxiflora* byl pozitivně korelovaný s úživností stanoviště, negativně s dostupností záření a mírně negativně s pokryvností bylinného patra. To odpovídá i jeho typickým stanovištím, což jsou živinami bohaté a vlhké břehy tekoucích vod nebo olšiny (obojí stíněné stromy, ale s nižší pokryvností ostatní vegetace). Také výsledky našich pokusů souhlasí, že důležité druhové vlastnosti *M. palustris* subsp. *laxiflora* se hodí do tohoto typu prostředí: druh je silně klonální, se schopností šířit se pomocí nadzemních



stolonů a podzemních rhizomů, ale především v prostředí bez konkurence. Přitom měl tento druh i poměrně dobrou klíčivost. Druh *M. palustris* subsp. *laxiflora* je pravděpodobně závislý především na rychlé vegetativní kolonizaci míst, která jsou narušená či v rané fázi sukcese vegetace.

Ve srovnání s ostatními dvěma druhy byl výskyt *M. nemorosa* pozitivně korelovaný s vyšší vegetační pokryvností a negativně s vlhkostí. Jeho typickými stanovišti byly louky, rašeliniště a příkopy s velmi variabilní vlhkostí (od zamokřených po téměř suchá stanoviště), a s převážně hustším a stabilním vegetačním pokryvem. S tím souhlasily i jeho funkční druhové vlastnosti, potvrzené v našich předchozích experimentech: relativně dobré dlouhodobé přežívání klonů, a to dokonce i ve větší konkurenci, relativně nízká a pomalá klíčivost ve srovnání s ostatními dvěma druhy (která byla ještě zpomalena dlouhodobým zaplavením) a vysoká vnitrodruhová variabilita ve všech charakteristikách. Zdá se, že strategií *M. nemorosa* je bezpečné přežívání klonů na osvědčeném místě kombinováno s regenerací pomocí semen.

### **Celkové shrnutí výsledků**

Když shrneme výsledky našich pokusů a fytoecologického snímkování tří blízce příbuzných druhů *Myosotis* ze skupiny *Palustris*, pak můžeme říci, že kombinace druhových vlastností jednotlivých druhů odpovídá jejich ekologii a chování.

V našich pokusech byl druh *M. caespitosa* nejvíce citlivý ke konkurenci a jeho rostliny měly zřetelně nejkratší délku života. Jeho klíčivost byla na druhou stranu excelentní – konstantně vysoká, rychlá a stabilní i u starších semen, a to navíc stejně u různých populací. V našich pokusech několik rostlin tohoto druhu přežilo překvapivě dlouho dokonce i ve stálejších typech prostředí (druhově bohatá louka, zarostlá lesní cesta), která nejsou pro něj typická, a dokonce se tu jeho rostliny úspěšně klonálně rozrůstaly nejméně tři vegetační sezóny pomocí postranních dceřiných růžic nebo krátkých výběžků – stolonů. Typickými prostředími výskytu tohoto druhu jsou spíše krátkodobá stanoviště vystavená slunečnímu svitu a dostatečně zavodněná, jako jsou obnažená dna rybníků a jejich okraje. Všechny naše výsledky ukazují, že hlavní strategií přežití u druhu *M. caespitosa* je produkce dobře klíčících semen a také existence přetrvávající semenné banky.

Výsledky našich pokusů potvrdily, že druh *M. palustris* subsp. *laxiflora* je z našich tří druhů nejlépe přizpůsoben k šíření pomocí klonálního růstu, neboť vytváří dva typy dlouhých výběžků – stolony a rhizomy. Klonální rozrůstání tohoto druhu bylo nejvíce ovlivněnou okolní úrovní konkurence – rostliny se šířily velice intenzivně a rychle v místech s omezenou konkurencí (*gapy*), ale v konkurenčním prostředí bylo toto šíření zřetelně omezené. Přitom byla u tohoto druhu současně zjištěna i relativně dobrá klíčivost. Typickým prostředím, kde tento druh roste, jsou živinami bohatá stanoviště, vlhká, a s

nižším vegetačním pokryvem, konkrétně břehy tekoucích vod nebo olšiny. Hlavní strategií druhu *M. palustris* subsp. *laxiflora* je pravděpodobně rychlá vegetativní kolonizace míst, která jsou narušená či v rané fázi sukcese vegetace, doplněná generativním šířením pomocí semen. Navíc je u tohoto druhu podpořeno i šíření na dlouhé vzdálenosti podél tekoucí vody řek a potoků, a to i pomocí kořenujících vegetativních fragmentů.

V našich pokusech byl druh *M. nemorosa* velmi úspěšný v přežívání, a to především na terénních lokalitách. Tento druh měl největší toleranci ke konkurenci a byl schopný se přizpůsobit podmínkám ve všech typech konkurenčních mikrostanovišť na různých lokalitách, přestože je schopný vegetativně se šířit pouze na krátké vzdálenosti (cca 5 cm za rok), a to hlavně pomocí krátkých rhizomů. Klíčivost u *M. nemorosa* byla nejvíce variabilní, nejnižší a také nejpomalejší ze tří sledovaných druhů, a navíc bylo klíčení zpomaleno při dlouhotrvajícím zaplavení. Typickými stanovišti druhu *M. nemorosa* jsou vlhké louky, mokřady a vlhké příkopy, s různě variabilní vlhkostí (ale často sušší ve srovnání se stanovišti ostatních dvou druhů *Myosotis*) a s mnohem hustším a stabilnějším vegetačním pokryvem. Zdá se, že strategií druhu *M. nemorosa* je hlavně úspěšné přetrvání na stanovišti (v menším měřítku i na vhodných místech v porostu), a to dokonce i v husté vegetaci, pomocí dlouhodobého přežívání individuí (jako individuum je zde braný klon – geneta, který přežívá, ačkoliv jednotlivé nadzemní lodyhy po odkvětu odumřou), společně s regenerací pomocí semen, které závisí na výskytu vhodných mikrostanovišť (ovlivněných časoprostorovou variabilitou).

Ve všech našich pokusech jsme zjistili velké rozdíly mezi populacemi v rámci jednotlivých druhů, což ukazuje, jak je pro všechna mezidruhová srovnání v ekologických studiích důležité, aby nezapomínala brát v potaz i vnitrodruhovou variabilitu!

### Literatura:

- Adler W., Oswald K. & Fischer R. (1994): Exkursionsflora von Österreich, p. 705–708, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart und Wien.
- Albrecht G., Biemelt S. & Baumgartner S. (1997): Accumulation of fructans following oxygen deficiency stress in related plant species with different flooding tolerances. – *New Phytol.* 136: 137–144.
- Baskin C. C. & Baskin J. M. (1998): Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. – Academic Press, San Diego.
- Bischoff A., Crémieux L., Smilauerova M., Lawson C. S., Mortimer S. R., Dolezal J., Lanta V., Edwards A. R., Brook A. J., Macel M., Leps J., Steinger T. & Müller-Schärer H. (2006): Detecting local adaptation in widespread grassland species – the importance of scale and local plant community. – *J. Ecol.* 94: 1130–1142.
- Boscaiu M., Marhold K. & Ehrendorfer F. (1997): The *Cerastium alpinum* group (Caryophyllaceae) in the high mountains of Poland and Slovakia. – *Phyton-Ann. Rei Bot.* 37: 1–17.

- Chaloupecká E. & Lepš J. (2004): Equivalence of competitor effects and tradeoff between vegetative multiplication and generative reproduction: case study with *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa*. – *Flora* 199: 157–167.
- Chen X., Huber H., de Kroon H., Peeters J. M., Poorter H., Volesenek L. A. C. J. & Visser E. J. W. (2009): Intraspecific variation in the magnitude and pattern of flooding-induced shoot elongation in *Rumex palustris*. – *Ann. Bot.* 104: 1057–1067.
- Chytrý & Rafajová (2003): Czech National Phytosociological database: basic statistics of the available vegetation-plot data. – *Preslia*, 75: 1–15.
- Dakskobler I., Seliškar A. & Vreš B. (1999): *Stellaria nemorum* L. and *S. montana* Pierrat (Caryophyllaceae) in the Forest Communities of Slovenia. – *Folia Geobot.* 34: 115–125.
- Diekmann M. & Lawesson J. E. (1999): Shifts in ecological behaviour of herbaceous forest species along a transect from northern central to north Europe. – *Folia Geobot.* 34: 127–141.
- Dorman M., Sapir Y. & Volis S. (2009): Local adaptation in four *Iris* species tested in a common-garden experiment. – *Biol. J. Lin. Soc.* 98: 267–277.
- Dostál, J. (1950): Květena ČSR a ilustrovaný klíč k určení všech cévnatých rostlin. – Přírodovědecké nakladatelství, Praha.
- Dostál, J. (1989): Nová květena ČSSR. – Academia, Praha.
- Eckstein R. L., Danihelka J., Hölzel N. & Otte A. (2004): The effects of management and environmental variation on population stage structure in three river-corridor violets. – *Acta Oecol. – Int. J. of Ecol.* 25: 83–91.
- Eckstein R. L., Hölzel N. & Danihelka J. (2006): Biological Flora of Central Europe: *Viola elatior*, *V. pumila* and *V. stagnina*. – *Perspectives in Plant Ecology, Evol. and Syst.* 8: 45–66.
- Ekrt L. & Štech M. (2008): A morphometric study and revision of the *Asplenium trichomanes* group in the Czech Republic. – *Preslia* 80: 325–347.
- Fenner M. (1992): Seeds: The ecology of regeneration in plant communities. – Redwood Books, Trowbridge.
- Flegrová M. & Krahulec F. (1999): *Anthoxanthum odoratum* and *A. alpinum*: life history parameters at two different altitudes. – *Folia Geobot.* 34: 19–31.
- Goldberg D. E. & Werner P. A. (1983): Equivalence of competitors in plant communities: a null hypothesis and a field experimental approach. – *Amer. J. Bot.* 70: 1098–1104.
- Grau J. & Merxmüller H. (1972): *Myosotis*. L. – In: Tutin T. G. et al. (eds), *Flora Europaea*. 3: 111–117, Cambridge University Press, Cambridge.
- Grime J. P. (1977): Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. – *Amer. Nat.* 111: 1169–1194.
- Grime J. P. (2001): *Plant strategies, vegetation processes and ecosystem properties*. Ed. 2. – John Wiley & Sons, Chichester.
- Grime J. P., Hodgson J. G. & Hunt R. (1987): *Comparative plant ecology: a functional approach to common British species*. – Unwin Hyman, London.
- Grime J. P., Mason G., Curtis A. V., Rodman J., Band S. R., Mowforth M. A. G., Neal A. M. & Shaw S. (1981): A comparative study of germination characteristics in a local flora. – *J. Ecol.* 69: 1017–1059.
- Grubb P. J. (1977): The maintenance of species-richness in plant communities: the importance of the regeneration niche. – *Biol. Rev.* 52: 107–145.
- Harper, J. L. & Chancellor, A. P. (1959): The comparative biology of closely related species living in the same area. IV. *Rumex*: interference between individuals in populations of one and two species. – *J. of Ecol.* 47: 679–695.
- Hegi G. (1979): *Illustrierte Flora von Mittel-europa Band III, Teil 2*. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Herben T., Hara T., Marshall C. & Soukupová L. (1994): Plant clonality: biology and diversity. – *Folia Geobot. Phytotax.* 29: 113–122.

- Holub J. (1966): Bemerkungen zur Nomenklatur der in der Tschechoslowakei vorkommenden Vertreter des Komplexes *Myosotis palustris*. – *Preslia* 38: 130–136.
- Hölzel N (2003): Re-assessing the ecology of rare flood-meadow violets (*Viola elatior*, *V. pumila*, *V. persicifolia*) with large phytosociological data sets. – *Folia Geobot.* 38: 281–298.
- Hroudová Z., Zákavský P. & Frantík T. (1999): Ecological differentiation of central European *Bolboschoenus* taxa and their relationship to plant communities. – *Folia Geobot.* 34: 77–96.
- Jensen K. (1998): Species composition of soil seed bank and seed rain of abandoned wet meadows and their relation to aboveground vegetation. – *Flora* 193: 345–359.
- Joshi J., Schmid B., Caldeira M. C., Dimitrakopoulos P. G., Good J., Harris R., Hector A., Huss-Danell K., Jumpponen A., Minns A., Mulder C. P. H., Pereira J. S., Prinz A., Scherer-Lorenzen M., Siamantziouras A.-S. D., Terry A. C., Troumbis A. Y. & Lawton J. H. (2001): Local adaptation enhances performance of common plant species. – *Ecol. Lett.* 4: 536–544.
- Karlsson L. M. & Milberg P. (2008): Variation within species and inter-species comparison of seed dormancy and germination of four annual *Lamium* species. – *Flora* 203: 409–420.
- Klimeš L., Klimešová J., Hendriks R. & van Groenendael J. (1997): Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. – In: de Kroon H. & van Groenendael J. (eds), *The ecology and evolution of clonal plants*, p. 1–29, Backbuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Klimešová J. & Klimeš L. (1998): CLOPLA1 (CLonal PLAnts, version 1) - a database of clonal growth in plants of central Europe. URL: [<http://www.butbn.cas.cz/klimes/>].
- Klotz S., Kühn I. & Durka W. (2002): BIOLFLOR – Eine Datenbank mit biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland. – Landwirtschaftsverlag, Bonn – Bad Godesberg.
- Knight T. M. & Miller T. E. (2004): Local adaptation within a population of *Hydrocotyle bonariensis*. – *Evol. Ecol. Research* 6:103–114.
- Kotorová I. & Lepš J. (1999): Comparative ecology of seedling recruitment in an oligotrophic wet meadow. – *J. Veg. Sci.* 10: 175–186.
- Koutecká E. & Lepš J. (2011): Performance of three closely related *Myosotis* species in an experiment in which substrate quality and competition were manipulated. – *Preslia* 83: xx–xx. [in press.]
- Koutecká E. & Lepš J. (2009): Effect of light and moisture conditions and seed age on germination of three closely related *Myosotis* species. – *Folia Geobot.* 44: 109–130.
- Koutecký P. (2007): Morphological and ploidy level variation of *Centaurea phrygia* agg. (Asteraceae) in the Czech republic, Slovakia and Ukraine. – *Folia Geobot.* 42: 77–102.
- Krahulec F. (1994): Clonal behaviour in closely related plants. – *Folia Geobot. Phytotax.* 29: 277–289.
- Krahulec F., Marhold K. & Schmid B. (1999): Ecology of closely related plant species: An introduction. – *Folia Geobot.* 34: 1–5.
- Králik E. & Šípošová H. (1993): *Myosotis L.* – nezábudka. – In: Bertová L. & Goliašová K. [eds.]: *Flóra Slovenska V/1.* – VEDA, Bratislava.
- Lavorel S. & Garnier E. (2002): Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. – *Funct. Ecol.* 16: 545–556.
- Leck M. A., Parker V. T. & Simpson R. L. (eds.) (1989): *Ecology of seed banks.* – Academic Press, San Diego.
- Lenssen J. P. M., Menting F. B. J. & Van der Putten W. H. (2003): Plant responses to simultaneous stress of waterlogging and shade: amplified or hierarchical effects? – *New Phytol.* 157: 281–290.
- Lepš J. (1999): Nutrient status, disturbance and competition: an experimental test of relationships in a wet meadow. – *J. Veg. Sci.* 10: 219–230.

- Linhart Y.B. & Grant M.C. (1996): Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. – *Ann. Rev. of Ecol. and Syst.* 27: 237–277.
- Mehrhoff L. A. & Turkington R. (1996): Growth and survival of white clover (*Trifolium repens*) transplanted into patches of different grass species. – *Canad. J. Bot.* 74: 1243–1247.
- Milberg P., Andersson L. & Thompson K. (2000): Large-seeded species are less dependent on light for germination than small-seeded ones. – *Seed Science Research* 10: 99–104.
- Montalvo A.M. & Ellstrand N.C. (2000): Transplantation of the subshrub *Lotus scoparius*: testing the home-site advantage hypothesis. – *Cons. Biol.* 14: 1034–1045.
- Moora M., Söber V. & Zobel M. (2003): Responses of a rare (*Viola elatior*) and a common (*V. mirabilis*) congeneric species to different management condition in grassland—is different light competition ability responsible for different abundances? – *Acta Oecol.* 24: 169–174.
- Moravcová L., Zákavský P. & Hroudová Z. (2001): Germination and seedling establishment in *Alisma gramineum*, *A. plantago-aquatica* and *A. lanceolatum* under different environmental conditions. – *Folia Geobot.* 36: 131–146.
- Morgan, J. W. (1997): The effect of gap size on establishment, growth and flowering of the endangered *Rutidosis leptorrhynchoides* (Asteraceae). – *J. Appl. Ecol.* 34: 566–576.
- Perglová I., Pergl J., Skálová H., Moravcová L., Jarošík V. & Pyšek P. (2009): Differences in germination and seedling establishment of alien and native *Impatiens* species. – *Preslia* 81: 357–375.
- Petrů, M. Lepš, J. (2000): Regeneration dynamics in populations of two hemiparasitic *Pedicularis* species in wet grasslands. – In: White P. S., Mucina L. Lepš J. Proc. 41th Symposium of IAVS. – *Opulus Press, Uppsala.*
- Pons T. L. (1992): Seed responses to light. – In: Fenner M. (ed.), *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities*, p. 259–283, Redwood Books, Trowbridge.
- Przywara L. (1983): Further karyological studies on the series *Palustres* M. Pop. of the genus *Myosotis* L. from Poland. – *Acta Biol. Crac., ser. Bot.* 25: 85 – 101.
- Reader R. J. et al. (1994): Plant competition in relation to neighbor biomass: an intercontinental study with *Poa pratensis*. – *Ecology* 75: 1753–1760.
- Rice K. J. & Dyer A. R. (2001): Seed aging, delayed germination and reduced competitive ability in *Bromus tectorum*. – *Plant Ecol.* 155: 237–243.
- Rice K. J. & Knapp E.E. (2008): Effects of competition and life history stage on the expression of local adaptation in two native bunchgrasses. – *Rest. Ecol.* 16: 12–23.
- Rice K. J. & Mack R.N. (1991): Ecological genetics of *Bromus tectorum*. III. The demography of reciprocally sown populations. – *Oecologia* 88: 91–101.
- Ritland K. (1983): The point evolution of seed dormancy and flowering time in annual plants living in variable environments. – *Theor. Popul. Biol.* 24: 213–243.
- Rothmaler W. (1976): *Exkursionsflora für die Gebiete der DDR und der BRD.* – Kritischer Band. p. 442 – 444, Volk und Wissen, Berlin.
- Rünk K., Moora M. & Zobel M. (2004): Do different competitive abilities of three fern species explain their different regional abundances? – *J. Veg. Sci.* 15: 351–356.
- Rünk K. & Zobel M. (2009): Differences in post-emergence growth of three fern species could help explain their varying local abundance. – *Amer. Fern J.* 99: 307–322.
- Rünk K., Zobel M. & Zobel K. (2010): Different factors govern the performance of three closely related and ecologically similar *Dryopteris* species with contrastingly different abundance in a transplant experiment. – *Botany-Botanique* 88: 961–969.
- Schuster R. (1967): *Taxonomische Untersuchungen über die Serie Palustres* M. Pop. der Gattung *Myosotis* L. – *Feddes Rep.* 74: 39–98.
- Silvertown, J. (1997): II. The demographic and evolutionary consequences of seed dormancy. – In: Silvertown, Franco & Harper. *Plant life histories (Ecology, Phylogeny and Evolution)*, p. 205–219, Cambridge University Press.

- Silvertown J. W. & Charlesworth D. (2001): Introduction to plant population biology. – Blackwell, Oxford.
- Stöcklin J. (1999): Differences in life history traits of related *Epilobium* species: clonality, seed size and seed number. – *Folia Geobot. Phytotax.* 34: 7–18.
- Špačková I., Kotorová I. & Lepš J. (1998): Sensitivity of seedling recruitment to moss, litter and dominant removal in an oligotrophic wet meadow. – *Folia Geobot.* 33: 17–30.
- Štěpánková J. (1993): Ploidy variation in the group of *Myosotis palustris* and *M. laxa* in the Czech Republic and Slovakia. – *Folia Geobot. Phytotax.* 28: 113–128.
- Štěpánková J. (2000): 16. *Myosotis L.* – pomněnka. – In: Slavík B. (ed), Květena ČR. 6: 216–234 [Flora of the Czech Republic; in Czech], Academia, Praha.
- Štěpánková J. (2002): 14. *Myosotis L.* – pomněnka. – In: Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J. & Štěpánek J. (eds), Klíč ke květeně České republiky [Key to the flora of the Czech Republic; in Czech], Academia, Praha.
- Thompson K., Bakker J. & Bekker R. (1997): The soil seed bank of North West Europe: methodology, density and longevity. – Cambridge University Press, UK.
- Urbanska-Worytkiewicz K. (1980): Reproductive strategies in a hybridogenous population of *Cardamine L.* – *Acta Oecol., Oecol. Plant.* 1: 137–150.
- van Groenendael J. M., Klimeš L., Klimešová J. & Hendricks R. J. J. (1996): Comparative ecology of clonal plants. – *Phil. Trans. Royal Soc. London, Series B* 351: 1331–1339.
- van Tienderen P. H. & van der Toorn J. (1991): Genetic differentiation between populations of *Plantago lanceolata*. I. Local adaptation in three contrasting habitats. – *J. Ecol.* 79: 17–42.
- Venable D. L. & Brown J. S. (1988): The selective interactions of dispersal, dormancy, and seed size as adaptation for reducing risk in variable environments. – *Amer. Nat.* 131: 360–384.
- Walck J. L., Baskin J. M. & Baskin C. C. (2001): Why is *Solidago shortii* narrowly endemic and *S. altissima* geographically widespread? A comprehensive comparative study of biological traits. – *J. of Biogeog.* 28: 1221–1237.
- Wallossek C. (1999): The acidophilous taxa of the *Festuca varia* group in the Alps: new studies on taxonomy and phytosociology. – *Folia Geobot. Phytotax.* 34: 47–75.
- Weiterová I. (2008): Seasonal and spatial variance of seed bank species composition in an oligotrophic wet meadow. – *Flora* 203: 204–214.
- Wilson S. & Tilman D. (1991): Components of plant competition along an experimental gradient of nitrogen availability. – *Ecology* 72: 1050–1065.
- Winkworth R. C., Grau J., Robertson A.W. & Lockhart P.J. (2002): The origins and evolution of the genus *Myosotis L.* (Boraginaceae). – *Molecular Phyl. and Evol.* 24: 180–193.
- Witkowski E. T. F. & Lamont B. B. (1997): Does the rare *Banksia goodii* have inferior vegetative, reproductive or ecological attributes compared with its widespread co-occurring relative *B. gardneri*? – *J. of Biogeog.* 24: 469–482.
- Wu C. A., Lowry D. B., Nutter L. I. & Willis J. H. (2010): Natural variation for drought-response traits in the *Mimulus guttatus* species complex. – *Oecologia* 162: 23–33.

# CHAPTER III

## **Effect of light and moisture conditions and seed age on germination of three closely related *Myosotis* species**

Eva Koutecká & Jan Lepš  
Folia Geobotanica 44: 109–130, 2009





# Effect of light and moisture conditions and seed age on germination of three closely related *Myosotis* species

Eva Koutecká & Jan Lepš

## Abstract

Germination of three closely related species from the *Myosotis palustris* group (*M. nemorosa*, *M. palustris* subsp. *laxiflora*, *M. caespitosa*) differing in their habitats and capacity for clonal growth, was compared in two greenhouse experiments. To evaluate both inter- and intraspecific variation, each species was represented by seeds from several populations. Final germination percentage and germination rates  $T_{50}$  were compared both between species and populations within species. In the first experiment, we studied the influence of two external factors, moisture and light. Four moisture levels (dry, wet, periodically flooded and permanently flooded soil) and three types of shading (without shading, shaded with green foil, shaded with solid paper sheet) were combined in a complete factorial design. In all three species, total germination percentage was the same in the three wettest treatments, and decreased in the dry treatment. Germination in the treatments shaded with green foil (simulating vegetation cover, which changed light quality) was significantly slower than in treatments without shading and treatments shaded with a solid paper sheet. There were significant differences among species, but we also found very pronounced differences among populations within a species. *M. caespitosa* had the uniformly highest germination percentage (reaching in some cases 100%) and also fastest germination. Germination of *M. palustris* subsp. *laxiflora* populations was slower and reached lower final proportions, and medium variability among populations. Inter-population variability in the final germination percentage was highest, and the final germination the lowest in *M. nemorosa*. In addition, *M. nemorosa*, a species typical for permanent meadow communities was delayed by permanent flooding. In the second experiment, we studied the effects of seed age and storage conditions. Three combinations of seed age and storage were used: younger seeds (half year old) with no-chilling, younger seeds with chilling and old seeds (three years old) with chilling. *M. caespitosa* had again the highest final germination percentage and fastest germination rates  $T_{50}$ . In addition, final germination percentage of this species slightly increased with seed age, whereas it decreased in the other two species. The germination behaviour corresponded well to expectation based on species life histories and habitat preferences. Remarkably stable and high germination percentages and fastest germination rates  $T_{50}$  were ascertained in *M. caespitosa*, a species of disturbed habitats, with lowest capacity for clonal spread. *M. palustris* subsp. *laxiflora* (species with highest clonal capacity) and *M. nemorosa* (species with medium clonal potential) achieved lower, but still very high final germination percentage. In addition, *M. nemorosa* showed the highest inter-populations variability in our experiments.

This chapter was published in *Folia Geobotanica*, Volume 44, Pages: 109–130.

Published online: June 2009.

## Jaký vliv mají různé světelné a vlhkostní podmínky a různé stáří semen na klíčivost tří blízce příbuzných druhů *Myosotis*

### Abstrakt:

Klíčivost tří blízce příbuzných druhů ze skupiny *Myosotis palustris* group (*M. nemorosa*, *M. palustris* subsp. *laxiflora*, *M. caespitosa*), které rostou v různých typech prostředí a liší se v klonálním růstu, byla porovnána ve dvou skleníkových pokusech. Každý druh byl zastoupený semeny z několika různých populací, aby mohly být porovnány mezidruhové rozdíly, ale i mezipopulační variabilita v rámci jednotlivých druhů., a to jak u dosaženého konečného podílu vyklíčených semen, tak u rychlosti klíčení ( $T_{50}$ : čas, kdy vyklíčila polovina z vysetých semen, udávaný počtem dnů). V prvním pokusu bylo zkoumáno, jak klíčivost ovlivňují dva externí faktory – vlhkost (byly použity 4 úrovně zásahu od suchého, přes vlhký, střídavě zaplavovaný až po trvale zaplavený) a světlo (byly použity 3 typy zásahu: bez zástinu, stínění zelenou fólií a stínění nepropustným štítem); pokus byl v kompletním faktoriálním uspořádání. Všechny tři druhy *Myosotis* potřebovaly ke klíčení vlhkost a byly negativně ovlivněny suchem. Zastínění mělo na klíčivost druhů pouze nízký vliv, který se projevil malým zpomalením klíčení pod zelenou fólií simulující změněnou kvalitou světelného záření vegetační pokryv. Byly zaznamenány průkazné rozdíly mezi jednotlivými druhy *Myosotis*, ale zároveň i velké rozdíly mezi populacemi v rámci druhů. Druh *M. caespitosa* dosahoval nejvyšší klíčivosti (často i 100%) a současně klíčil nejrychleji, a to napříč všemi svými populacemi. Klíčení populací *M. palustris* subsp. *laxiflora* již bylo mírně variabilní mezi populacemi, a celkově o něco nižší. U druhu *M. nemorosa* byla mezipopulační variabilita největší, a dosažená klíčivost nejnižší. Navíc bylo u tohoto druhu (typického pro luční společenstva) v trvale zaplaveném substrátu klíčení zpomalené. Ve druhém pokusu bylo studováno, jaký vliv má na klíčivost stáří použitých semen a způsob jejich skladování. Byly použity tři kombinace různého stáří semen a způsobu jejich skladování: mladší semena (stará ½ roku) bez vystavení nízkým teplotám, mladší semena vystavená nízkým teplotám, a starší semena (tři roky stará) vystavená nízkým teplotám. Druh *M. caespitosa* měl opět nejvyšší a nejrychlejší klíčivost. Navíc konečná klíčivost tohoto druhu ještě nepatrně vzrostla s rostoucím věkem semen, zatímco u ostatních dvou druhů s věkem klesla (jak je u většiny semen běžné). Srovnání klíčivosti jednotlivých druhů *Myosotis* převážně potvrdilo naše předpoklady ve vztahu k charakteru jejich přirozených stanovišť. Konkrétně, *M. caespitosa* (krátkověký druh rostoucí na dočasných stanovištích, s nejmenším potenciálem pro klonální růst) byl druh s nejvyšší (dosahující často i 100%) a nejrychlejší klíčivostí v obou pokusech ve srovnání s ostatními dvěma druhy *Myosotis*, a to napříč všemi svými populacemi. Silně klonální druh *Myosotis palustris* subsp. *laxiflora* a druh *M. nemorosa* (který má střední klonální potenciál), dosahovali sice nižší, ale stále velmi vysoké klíčivosti. U druhu *M. nemorosa* byla v obou pokusech zaznamenána největší mezipopulační variabilita.

Zbytek této kapitoly byl uveřejněn v časopise: *Folia Geobotanica*, Volume 44, Pages: 109–130.

Publikováno online: červen 2010.

# CHAPTER IV

## **Performance of three closely related *Myosotis* species in an experiment in which substrate quality and competition were manipulated**

Eva Koutecká & Jan Lepš  
Preslia 83: xx-xx [in press]



# Performance of three closely related *Myosotis* species in an experiment in which substrate quality and competition were manipulated

Eva Koutecká & Jan Lepš

## Abstract

Closely related species can be used for studying the ecological significance of their traits. The response in terms of survival, clonal growth and vegetative and generative characteristics of three related *Myosotis* species to competition and soil characteristics were studied in a three year pot experiment. Plants from four populations per species were cultivated in a factorial combination of substrate (nutrient rich soil and mixtures with sand) and competition (with or without *Holcus lanatus*) treatments. Survival, clonal growth and the majority of the growth characteristics of all three *Myosotis* species were reduced by competition. The effect of substrate was less pronounced, and variable for various traits: the soil with sand mixture was more suitable for survival, clonal growth and seed germination whereas in the soil plants were taller, but this effect was modified by competition. The differences among species corresponded well to expectation based on their known habitat preferences. *Myosotis caespitosa*, a species typical of short term habitats such as emerged bottoms of ponds, exhibited the shortest life span and was also the most sensitive to competition: all plants of this species died in the competition treatment before the end of the second season. Nevertheless, the surviving plants (in the no competition treatment) were able to form several daughter rosettes or stolons; some of them spread clonally till the third year. *Myosotis palustris* subsp. *laxiflora*, which inhabits the banks of rivers and brooks often disturbed by torrential floods, survived best and had the highest potential for clonal growth and spreading. Most plants of this species produced rhizomes and stolons and spread the furthest of all the three species. *Myosotis nemorosa*, which lives mostly in meadows, the most stable habitat of the studied congeners, but also a habitat with a strongly competitive matrix of species, was intermediate in terms of survival, and clonal growth, forming mainly short rhizomes. This species exhibited the highest among-population variability in all recorded characteristics, which might be due to its local adaptation to a wide spectrum of habitats. We argue that the details of prevailing disturbance regime, rather than some general disturbance intensity explain the clonal behaviour of the species compared.

This chapter will be published in *Preslia*, Volume 83, 18 pages.  
Accepted: May 2011, in press.

## Reakce tří blízce příbuzných druhů *Myosotis* v experimentu s manipulovanou kvalitou substrátu a konkurencí

### Abstrakt:

Blízce příbuzné druhy jsou vhodným objektem studií, nakolik jejich druhové vlnkivosti souvisí s jejich ekologickým chováním. Tříletý květináčový pokus se zabýval odezvou tří blízce příbuzných druhů pomněnek ze skupiny *Myosotis palustris* (reprezentovanou jejich přežíváním, klonálním růstem, a dalšími vegetativními a generativními charakteristikami) na konkurenci a typ substrátu. Rostliny ze čtyř populací od každého druhu byly pěstovány ve faktoriálně uspořádaných kombinacích dvou typů substrátu (živinami bohatý zahradnický substrát a jeho směs s pískem) a konkurence (s či bez konkurenční trávy *Holcus lanatus*). Přežívání, klonální růst, i většina růstových charakteristik všech tří druhů *Myosotis* byly shodně negativně ovlivněny konkurencí. Vliv substrátu byl méně výrazný, a lišil se pro různé druhové vlastnosti. Pro růst, přežívání a pro klíčení semenáčků všech druhů se jako vhodnější jevila živinami chudší písčité směs. Naproti tomu výška rostlin byla větší v živinami bohatší půdě, ale zároveň zde byla i více ovlivněna konkurencí. Chování pokusných druhů dobře odpovídalo jejich preferencím pro jednotlivé typy stanovišť. Druh *M. caespitosa* je považován za krátkověký, omezený na dočasná stanoviště typu obnažených rybníčních den. V našem květináčovém pokusu měly rostliny tohoto druhu jasně nejkratší délku života, a navíc reagovaly nejcitlivěji na konkurenci: do konce druhé sezóny v konkurenčních zásazích všechny rostliny zahynuly. V květináčích bez konkurence však několik rostlin přežilo i do třetí sezóny a překvapivě úspěšně se klonálně rozrůstaly pomocí dceřiných růžic či krátkých stolonů. Typickým stanovištěm druhu *M. palustris* subsp. *laxiflora* jsou břehy řek a rybníků, které jsou často narušované proudící vodou. V našem pokusu přežívaly rostliny tohoto druhu nejlépe a většina se jich zároveň i nejlépe klonálně rozrůstala pomocí vysokého počtu vytvářených rhizomů i stolonů, schopných prorůst plochu i obvod celého květináče. Druh *M. nemorosa* se ve srovnání s ostatními dvěma druhy vyskytuje na převážně stabilnějších typech prostředí, například na loukách, které jsou ale zároveň i prostředím s největší konkurencí od okolních druhů rostlin. V našem pokusu byly rostliny *M. nemorosa* druhé nejúspěšnější v přežívání i v klonálním růstu, kdy vytvářely hlavně krátké rhizomy. Mezi populacemi *M. nemorosa* byla variabilita ve všech sledovaných charakteristikách největší (což zřejmě souvisí s lokální adaptací tohoto druhu k podmínkám na velmi různých typech stanovišť). Naše pozorování nasvědčují tomu, že klonální chování jednotlivých druhů *Myosotis* může být ovlivňováno více vnějšími faktory, které se navzájem ovlivňují.

Zbytek této kapitoly bude uveřejněn v časopise: *Preslia*, Volume 83, 18 pages.

Přijato: květen 2011, v tisku.

# CHAPTER V

## **Growth and survival of three closely related *Myosotis* species in a three years transplant experiment**

Eva Koutecká & Jan Lepš  
manuscript





# Growth and survival of three closely related *Myosotis* species in a three years transplant experiment

Eva Koutecká & Jan Lepš

## Abstract

We have studied the growth and survival of three closely related species from *Myosotis palustris* group (*Myosotis caespitosa*, *M. palustris* subsp. *laxiflora* and *M. nemorosa*) in a three year reciprocal transplant experiment. Plants from two populations of each species were transplanted into five experimental localities where one of the three *Myosotis* species was resident. Young plants were planted into three types of competitive microsites: gap (without above-ground vegetation, at least 15 cm in diameter), middle competition (less dense vegetation) and high competition (dense vegetation or thick tussock). Survival, and selected clonal and growth characteristics were measured for three years. Germination experiment with seeds from twelve populations of the same *Myosotis* species was conducted on six experimental localities.

The experiment demonstrated differences among species but also large differences among populations within a species in many characteristics consistent over the localities. However, the relative success of the species differed among individual localities, and also according to the competition treatment. The contrast analysis has shown that on average, the *Myosotis* species had advantage on localities where the species was resident (significant for survival, plant height). The only locality of *M. caespitosa* was flooded after the first season, the two localities of *M. palustris* subsp. *laxiflora* were destroyed during the second season. This corresponds well to the permanence of typical habitats of the species.

*M. caespitosa* exhibited the highest mortality of its clones, which was particularly pronounced under competition, which corresponds well to its habitat preferences (disturbed and short-term sites), but this species produced the highest amount of secondary rosettes and shoots in gaps (in comparison with other two species) in the first season, and some clones persisted successful till the third season. *M. palustris* subsp. *laxiflora* survived best on its original localities and its clones were highest there. In gaps, the species spread best clonally, but also, its clonal spread was most suppressed by competition. This corresponds well to its ability to colonize fast vegetation-free sites along water, but weak competitiveness in later stages of vegetation succession. *M. nemorosa* clones were highest on their original localities, . The species survived best on three localities (from five) during the first season, and on all persisting localities the second and the third seasons, which shows the best adaptability of *M. nemorosa* clones for long-term surviving on different habitat types.

Influence of competitive treatment (as main effect) on surviving of plants was weak, but suitability of individual types of microsite differed among localities, among species and changed in time. In the sowing experiment, we have demonstrated large differences among individual populations within all three species, especially at *M. nemorosa*, while differences among species were not significant.

## Keywords

competition, field experiment, gap, home-site advantage, intraspecific variability, reciprocal transplanting

## Introduction

Closely related (sub)species share evolutionary history, therefore they also share many characters and traits. Comparison of their ecology and adaptation to environment helps to understand and explain processes that led to their separation. Moreover, the comparison of (sub)species morphological, physiological and ecological differentiation could help to disentangle the effect of phylogenetic constraints, and adaptive evolution on (sub)species ecological behavior (Krahulec 1994; Krahulec et al. 1999).

Related species can be investigated with regard to their taxonomy, (eco)physiology, ecology and phytosociology, but complex studies of more than one aspect are rare and are frequently in a review form (e.g. Wallossek 1999; Walck et al. 2001; Eckstein et al. 2006). Comparisons of related species have been focused, e.g. on reproductive strategy (Karlsson & Milberg 2008; Moravcová et al. 2001; Moora et al. 2003; Perglová 2009); on relationship of species to habitat-types and characteristics, represented among others by affinities to plant communities (Diekmann & Lawesson 1999; Hroudová et al. 1999). Taxonomical studies of closely related species (morphological, cytological) are often focused on comparison, confirmation or identification of individual taxa (e.g. Koutecký 2007; Ekrt L. & Štech M. 2008). Relatively common are studies of various growth characteristic or phytosociological affinities of pairs or groups of closely related plant species, which should help to explain their rarity or local abundance (e.g. Boscaiu et al. 1997; Daskobler et al. 1999; Eckstein et al. 2004; Rünk et al. 2004, 2010 and Rünk & Zobel 2009). Useful connection of phytosociological comparison and traits of species with using of relevés from electronic database was demonstrated by Hölzel (2003). Other studies investigated effects of selected factor(s) on survival, growth and reproduction of closely related plant species (e.g. Harper & Chancellor 1959; Stöcklin 1999; Dorman et al. 2009; Wu et al. 2010). A few studies investigated tradeoff between vegetative and generative reproduction of related species (e.g. Stöcklin & Zoller 1992). Special attention has also been paid to polyploid complexes (e.g. Urbanska-Worytkiewicz 1980; Flegrová & Krahulec 1999; Duchoslav et al. 2010).

Plant species, but also individual populations within a species are expected to be adapted to local conditions (including both, the physical environment, and the biotic interactions in the surrounding community). The Home-site advantage hypothesis has important consequences also for restoration ecology (e.g. Montalvo & Ellstrand 2000). Reciprocal transplant experiments are often used to quantify this adaptation and so deduce the intensity of selection of genotypes (Silvertown & Charlesworth 2001). Plants are sessile organisms, with individual populations more or less isolated from each other; therefore we can expect differences caused by local adaptation also among populations within individual species (Lenssen et al. 2004). Field

reciprocal transplant experiments studying local adaptation of populations, genotypes or ecotypes are more frequent (e.g. Bowman et al. 2008; Kindell et al. 1996; Knight & Miller 2004; Platenkamp 1990; Rice & Knapp 2008; Rice & Mack 1991, van Tienderen & van der Toorn 1991) than transplant studies with related (sub)species (e.g. Flegrová & Krahulec 1999; Gauthier et al. 1998; Nagy et al. 1997). Some transplant studies involved several spatial scales, but also these compared populations within individual species (e.g. Becker et al. 2006; Becker et al. 2008; Bischoff et al. 2006; Joshi et al. 2001). Should the closely related species have an ecological significance, than their ecological differentiation should be higher than ecological differentiation of individual populations within species. However, we are not aware of any study, which combines transplanting of related plant species and involving more populations of each species and comparing variation between closely related species with variation of populations within individual species.

The well known trade-off between realisms and ability to control independent variables in ecological manipulative experiments is reflected also in comparative studies of species or populations. Many of them have been done under (more or less) controlled condition, e.g. in pots, in greenhouse, or in experimental gardens. These enable to study the response, e.g. to competition (Linhart 1988), to allelopathic activity of competing species (e.g. Grøndahl & Ehlers 2008), to flooding (Lenssen et al. 2004), to competition and substrate (Prati & Schmid 2000), or other abiotic or biotic factors or their combinations (e.g. Harper & Chancellor 1959). Similarly, we have studied the response of our species in a pot experiment (Koutecká & Lepš 2011). Nevertheless, the real plants live in a variable natural environmental conditions - temperature, light, precipitation, nutrients, competition and predation, etc., all undergo both, seasonal cycles and random variability (Aarssen & Epp 1990). These are reflected in manipulative field experiments, where the individual populations are transplanted into field conditions; these show more realistic reactions of experimental plants, because their survival, growth and reproduction are restricted by natural combinations of studied factors, and these are reflected in differences between individual experimental localities.

The other important factor in transplant experiments depends on micro-scale level, because the microhabitat in the closest surrounding of a transplant could play major role for surviving and reproduction (Bischoff et al. 2006). Adaptive genetic differentiation among plant populations over small scales (a few cm to a few hundred cm) has been documented at plants of different life history, life forms and rarity (Linhart & Grant 1996).

Competition of surrounding vegetation is one of the most important micro-scale factors in the field. Surprisingly, competition has rarely been experimentally manipulated within a reciprocal transplant design (but see Reader et al. 1994; Rice & Knapp 2008). Mostly, negative effect of competition from surrounding plants on growth of target plants has been documented under

various nutrient conditions (Wilson & Tilman 1991). Gaps are places with reduced competition, which represent suitable micro-sites for seedling germination and establishment and for growth of young plants (e.g. Mehrhoff & Turkington 1996; Morgan 1997; Špačková et al. 1998). On the other hand, seedlings and young plants can be also more exposed to negative conditions there, e.g. drought, standing water, extreme temperatures, herbivores (Kotorová & Lepš 1999). This usually happens in a type of extreme situation but might be also part of seasonal variation (e.g. summer drought at the locality).

For our comparative study, we used plants from the group of closely related species of swamp forget-me-nots (the *Myosotis palustris* complex), from different populations. Although the whole group typically occurs in wet habitats, the individual species differ in their habitat preferences. For our comparative study we have selected populations and experimental localities from south-west part of the Czech Republic. This is an area where all the three species frequently occur (although they rarely share a locality). We selected area including South Bohemia and Českomoravská vrchovina highlands (cca 150 x 100 km, with altitude of seed collection and experimental localities from 380 to 640 a. s. l.). Because we expected some variability among populations of individual species, we used two populations of one species in our comparative study.

In our previous greenhouse and pot studies with the same three *Myosotis* species (each represented by more populations), we have shown that short-lived *M. caespitosa* had highest final germination percentages and fastest germination rates in all cases and uniformly at all populations. *M. palustris* subsp. *laxiflora* was species with slower germination and lower final proportions, and medium variability among populations. *M. nemorosa* showed the highest inter-population variability and lowest, but still very high final germination in our experiments, delayed by permanent flooding treatment (Koutecká & Lepš 2009).

In a pot experiment focused on survival and clonal growth of the three *Myosotis* species in competitive and non-competitive neighbourhood (Koutecká & Lepš 2011), *M. caespitosa*, exhibited the shortest life span and was also the most sensitive to competition. Nevertheless, the surviving plants were able to form several secondary rosettes or shoots, with some spreading clonally till the third year. *M. palustris* subsp. *laxiflora* was the best survivor with the highest production of shoots and spreading for the longest distances. *M. nemorosa* was intermediate in survival and in clonal growth, and exhibited the highest among-population variability. However, in both the experiments, we have demonstrated large differences among individual populations within a species in all the studies species.

For our reciprocal transplanting experiment we used six populations, two of each of the three *Myosotis* species studied. On five experimental

localities we followed survival and growth of transplanted young plants in different types of competitive microsites. Sowing experiment at six localities investigated germination ability of seeds of twelve different *Myosotis* populations on field (four populations per each *Myosotis* species). Supplementary experiment and measurements investigated seed bank, biomass and soil nutrients.

Our first aim was to compare the differences between closely related species with the variability among populations within species. We have hypothesized that the species should be more successful in their original localities.

Our second aim was to evaluate the role of microsite type, representing different competitive pressure from surrounding vegetation, on survival and growth of experimental plants. Our experiences and observations show, that all three experimental *Myosotis* species are competitively weak in dense vegetation. We hypothesized that the negative effect of competition on survival and growth should be greatest at *Myosotis caespitosa*, the species of disturbed habitats and with the shortest life span. In addition, three *Myosotis* species differ in their clonal potential and their clonal spread should be influenced by type of microsite.

Our third aim was to compare germination of several populations of experimental species in several field localities. *M. caespitosa* is a short-lived species with sensitivity to competition, restricted on temporary habitats and vitally dependent on successful seedling establishment, therefore we expected highest overall germination with small inter-population variability in our experiment.

### **Studied species**

Individual species of *Myosotis palustris* complex are very similar, with the species within this group often not being correctly distinguished. The taxonomic concept of the *Myosotis palustris* group has been changed several times in the last decades and is presented differently in different floras. Here we adopt the classification and nomenclature used in both the Czech Flora (Štěpánková 2000) and in the recent key to the Czech Flora (Štěpánková 2002). For our study, we have selected the species *M. palustris* subsp. *laxiflora*, *M. nemorosa* and *M. caespitosa* (other (sub)species in the Czech Republic are *Myosotis palustris* subsp. *palustris* and *M. brevisetacea*). The species were selected because they are known to differ in their habitat preferences, but also because they are sufficiently common in the studied area. Species of this group are considered to be annual or perennial with variable ability of forming stolons, rhizomes or daughter rosettes. The three species studied differ from each other in their ploidy level, and with some experience may be safely

identified. In addition, all characteristics vary both among and within populations of the same species. Although all of the species grow in more or less wet sites (wet meadows, springs, river banks, swampy soils, etc.), they prefer different habitats and it is rare to meet two species growing together in one locality.

Ecological studies of individual species are rare and their interpretation is complicated by the changing taxonomy and nomenclature within the *Myosotis palustris* group; it differs among individual taxonomic classifications in various countries and times (e. g. Hegi 1979, Schuster 1967, Štěpánková 2000). No comparative ecological study of more species within the *Myosotis palustris* group is available.

There are ecological studies investigating ecological determinants of *M. palustris* (*M. scorpioides*) germination (e. g. Albrecht et al. 1997, Lenssen et al. 2003). Unfortunately, identity of species is not completely clear there.

Phylogenetic study of the complex based on molecular data is not available. However, differences in morphological characteristics separate *M. caespitosa* species as the most different from the rest of *M. palustris* group (Štěpánková 2002, Štěpánková 2000) and in some floras it is separated into *Caespitosae* group (e. g. Adler et al. 1994).

## Materials and methods

### *Reciprocal transplant experiment design*

Seeds for the reciprocal transplant experiment were collected from six natural populations (two populations of each investigated *Myosotis* species) during the 2002 season. The locality characteristics of each population are in the Appendix 1. In each population, seeds were collected once, from hundreds of mother plants. Fruits in each helicoids cyme mature gradually, therefore only a very low number of seeds were collected from each individual mother plant. Only visually matured, dark seeds, falling spontaneously from the calyces, were collected. Seeds were stored under dry conditions and room temperature (about 20°C) during the winter. Plants for experiment were pre-planted in a greenhouse in starter (Jiffy) pots. Young *Myosotis* plants were planted into field when they contained about 4 to 6 leaves.

The field experiment was established in May 2003, when young *Myosotis* plants were transplanted into the field within one-week period. Five experimental localities were chosen as typical habitats with natural occurrence of one of the three experimental *Myosotis* species (two localities of *M. palustris* subsp. *laxiflora* and *M. nemorosa*, one locality of *M. caespitosa*). Localities are referred further by the first letter of the specific name, i.e. L1, L2 for *M. palustris* subsp. *laxiflora* etc.. Characteristics of experimental localities are summarized in Appendix 2.

Young *Myosotis* plants of all six populations were transplanted to each from the five experimental localities in the following design. Each locality contained five 4 m<sup>2</sup> randomized blocks in homogenous vegetation. Each block contained microsites of three types (treatments with three competition levels), each type in six replicates (one replicate for each experimental population). One young experimental plant was transplanted per one microsite, so each block contained 18 transplants (6 populations x 3 microsite types). The microsite types were: 1) Gap in the vegetation (hereafter Gap) of at least 15 cm in diameter (natural or artificially cleared free space in the vegetation) represented a treatment with the lowest above-ground competition. 2) Less dense vegetation in the site (hereafter Middle competition) represented treatment with normal competition from surrounding vegetation, and 3) planting into dense vegetation or thick tussock (hereafter High competition). Vegetation on experimental localities was left to spontaneous dynamics and treatments were not re-established during the experiment. After transplanting on localities, plants were watered just ones and their following survival was influenced just by natural conditions – spontaneous precipitation, fluctuations of temperature and radiance, predations from herbivores.

Survival and selected growth characteristics were recorded four times over the 2003 growing season (May, 3-4 weeks after planting, June, July/August and September), three times over the season 2004 (May, June and July) and survival was observed ones in 2005 (July). The following vegetative and reproductive characteristics were recorded: number of shoots (stolons or rhizomes) or secondary rosettes (type of clonal organs differed between *Myosotis* species), height of the standing above-ground stems representing the height of plant or clone (mm) and number of flowers per clone.

The habitat conditions on individual experimental localities were characterized by their above-ground biomass, selected soil characteristics, and seed bank.

The biomass was collected ones, on June 2004, in four localities (L1, L2, N1 and N2; C1 locality was flooded by water, therefore it was not possible to collect biomass here). On each locality, the aboveground biomass was cut at surface from five quadrants 20 cm x 20 cm each. Litter was present on N1 locality only and was collected separately. The biomass was dried at 80°C for 24 hours, and weighted. The amount of dry biomass on four experimental localities was following: the highest and most dense herb vegetation was on locality L1, followed by N1, than L2 and lowest vegetation was on N2 locality. (Appendix 3).

The soil samples were collected on November, 2005. One compound sample composed of five cores at each locality. Cores were 5cm in diameter, from surface 5cm soil layer, and, where the soil depth permitted, also 5-10 cm. Sub-samples were dried and percentages of nitrogen and carbon were determined (results are summarised in Appendix 4). N1 locality, species rich

meadow, is the most nutrient rich, followed by *M. palustris* subsp. *laxiflora* localities (L1 and L2), which the both are on the bank of flowing water, and the most nutrient poor is N2 locality, woody path with weak and skeletal soil profile.

### *Germination experiment design*

Seeds for the germination experiment were collected from twelve natural populations (four populations of each investigated *Myosotis* species) during the 2005 season (in the same manner as for the transplant experiment, locality characteristics are in Appendix 1. Seeds were stored at temperature 4 – 6 °C for four months before sowing, which should break seed dormancy, if there is any.

The germination experiment was established in May, 2006, on six experimental localities, which were chosen as typical habitats where studied species grow, with natural occurrence of one from three experimental *Myosotis* species on each locality. These localities were the same, close or similar to localities, where reciprocal transplanting experiment was done. Characteristics of experimental localities are summarized in Appendix 2. On each of the six experimental localities seeds of twelve populations of three *Myosotis* species were sown in following design: each population was represented by 30 seeds, which were sown into natural 20 x 20 cm gap in homogenous vegetation on locality. Gaps were chosen, because they are natural microsites suitable for establishment of seeds. Vegetation on experimental localities was left to spontaneous succession and gaps were not re-established during the experiment. Numbers of established seedlings were counted in June and July 2006. Established seedlings were left in situ, to avoid any soil surface damage. Total number of recruited seedlings was used for statistical analysis.

In these localities, we have estimated the natural seed bank of a *Myosotis* species original at the locality. At each experimental locality, three sub-samples of soil were taken by soil corer, one sub-sample was mixture of three cores from soil surface (5 cm in diameter and 5 cm from surface of the soil). Collected soil was displayed in thin layer into dishes with sand substrate, each sub-sample per one dish. Dishes were placed into greenhouse and watered regularly. Spontaneous germination of the *Myosotis* seedlings from seed bank was observed for two months.

### *Statistical analyses*

The data were evaluated using various ANOVA models, using the Statistica package (StatSoft, Inc. 1998; StatSoft, Inc. 2005), taking into account the repeated observations of individual plants (repeated measurements ANOVA) and the hierarchical nature of the experiments. In reciprocal transplant experiment individual source populations are considered as a random factor, nested in the planted species, while the locality and competition are fixed



factors, not nested; in the sowing experiment individual populations are considered as a random factor, nested within the species, and locality are considered as a random factor, nested within the original species. After ANOVA, specific hypotheses were tested using contrasts. Specifically, contrasts defined on interaction Locality\*Planted species were used to test whether the individual *Myosotis* species grow better in localities where they are native than in localities of the other two species.

We were able to compute repeated measures ANOVA for all experimental localities during the first season (calculated using Statistica ver. 5) and for four localities during the first and second season (C1 locality was flooded and therefore excluded from the analysis), because of balanced design of experiment. In the analysis of number of shoots and rosettes, dead plants were considered in two ways; either as missing observations (to individual dates), or as zeroes (in repeated measures). In the first case (missing observations), we compared the state of surviving plants. Assigning zero to the dead plants was for comparing all plants. We used this approach when considering, e.g. the clonal potential of a plant: if we ask, how many shoots originating from a single seedling are alive on a particular date, then zero is the correct answer for a dead plant, and inclusion of dead individuals characterized by zero shoots leads to a correct estimate of the average number of surviving shoots per single planted seedling. In this case, our design was balanced and complete, and enabled the use of repeated measurement ANOVA, with individual populations being a random factor, nested within the planted species, while locality and competition were fixed factors, not nested. We used this analogical approach to also evaluate survival. In this case, live individuals were assigned a value of 1, and the dead individuals a value of 0. We are aware that the Bernoulli distribution of ones and zeroes does differ from normality. Nevertheless, the tests that are of interest are those on the averages of survival of individual populations and particularly about individual species. For individual populations, the estimates of  $p$  (proportion of surviving individuals) are closer to normality (thanks to the Central Limit Theorem); further averaging of population means within a species leads to further improvement of normality (and tests on species averages are the most important ones in the experiment). Consequently, we believe that the results of the test can be considered as a reasonable approximation in this case. (We are not aware of software which would enable the proper testing of complicated hierarchical mixed effect designs explicitly for zero/one data.)

In the case where we were interested in the properties of surviving plants (height of above-ground stem, number of flowers, number of produced shoots or rosettes) we conducted tests for (selected) individual observational dates, and all surviving individuals were included in the analyses. In this case, the design was necessarily unbalanced, and were evaluated using Statistica 7. Note that Statistica 7 uses a method which finds the linear combinations of

sources of random variation that serve as appropriate error terms for testing the significance of the respective effect of interest in mixed-model ANOVA designs (accounting for varying variability of means calculated from differing numbers of observations in unbalanced hierarchical mixed models). As a consequence of this approach, the “Denominator synthetic degrees of freedom” (Den.Syn.DF) need not necessarily be an integer. If the main effects were significant, the Tukey test at  $\alpha = 0.05$  (with the mean square corresponding to the denominator MS for the test of corresponding effect used for s.e. estimation) was used for post-hoc comparisons of species. The numbers of shoots was subjected to square root transformation ( $\sqrt{\text{variable} + 0.5}$ ) for analyses, but all figures show the original non-transformed values. The percentages of established seedlings in seed sowing experiment were subjected to angular transformation ( $\arcsin \sqrt{\text{count}/30}$ ) for analyses. Further, we used planned contrast (on the locality \* species effect), testing the hypothesis that individuals will perform better on a locality where the species is resident in comparison with other two *Myosotis* species.

## Results

### *Reciprocal transplant experiment*

Plants of both *M. caespitosa* populations had the highest mortality during the experiment, whereas plants of other two species survived significantly better. Survival of both *M. palustris* subsp. *laxiflora* populations was similar, but we observed large differences between the two populations of *M. nemorosa* (Fig. 1, Table 1 and 2). Some individuals of all the species, including the *M. caespitosa*, survived till the end of the third season.

There were (not surprisingly) large differences in survival also between experimental localities. Competition treatments affected consistently plant survival (i.e. Competition \* Time effect is significant, i.e. there is some consistent but weak effect across the localities and species). Significant interactions show that relative performance of individual *Myosotis* species differed according to the locality (particularly the highly significant interaction Locality\*Planted Species\*Time) (Fig. 2). This signifies that the relative success in survival differed among the species, but the differences were dependent on the locality. The contrast analysis for the end of 2003 (September) shows that on average the *Myosotis* species survived better on locality(-ies) where they were resident in comparison with other two species ( $F_{(1,402)} = 24.01$ ;  $p < 0.001$ ). *M. caespitosa* was the most successful on its original locality C1, and the worst in surviving on other localities. *M. palustris* subsp. *laxiflora* was surviving best on its original L2 locality and *M. nemorosa* survived the best on the N1 in the end. Both species *M. nemorosa* and *M. palustris* subsp. *laxiflora* were equally

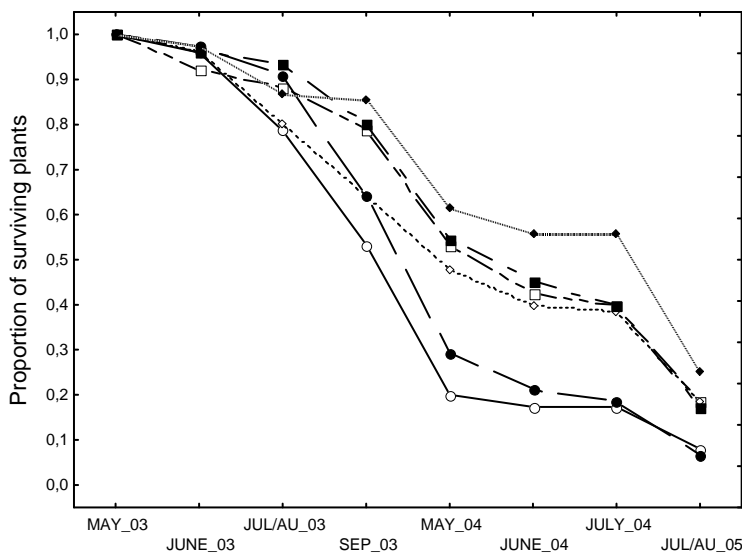


Fig. 1. Proportion of surviving plants of six populations used in reciprocal transplant experiment during the three seasons. Abbreviations of species: C – *M. caespitosa*; L – *M. palustris* subsp. *laxiflora*; N – *M. nemorosa*. Population numbers and localities: 1C-Dářko; 2C-Munický rybník; 3L-Český Krumlov; 4L-Trocnov; 5N-Mladějovice; 6N-Střemily.

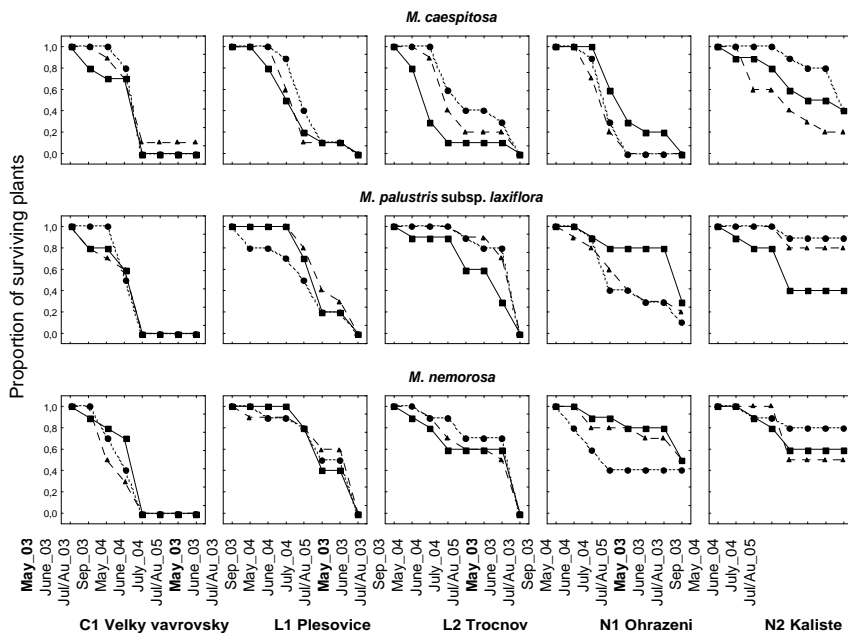


Fig. 2.: The proportion of surviving plants of three *Myosotis* species on five experimental sites and in three competitive treatments: High competition, Middle competition, Low competition, during the three seasons in reciprocal transplant experiment. Interaction: \*LOCALITY\*PLANTED SPECIES\*COMPETITION; Weighted Means.



Table 1.: Significance of effects and their interactions for variables: survival of plants and number of secondary shoots or rosettes of clones on five localities during the 2003 season (3 dates) and on four localities during 2003+2004 seasons (6 dates), Repeated measures. Dead plants are counted as clones with 0 shoots. Summary of all Effects; abbreviations of design of experiment: Loc- LOCALITY, Spe-PLANTED SPECIES, Pop-POPULATION, Comp-COMPETITION, Time-TIME, \* means interaction. The POPULATION factor was nested in the PLANTED SPECIES factor. The POPULATION factor was random factor. Statistically significant results ( $p < 0.05$ ) are in bold.

	Survival 3 dates 2003						Survival 6 dates 2003+ 2004						Shoots or rosettes 6 dates 2003 + 2004	
	Effect t d.f.	Den.Syn. d.f.	F	p-level	F	p-level	Effect d.f.	Den.Syn. d.f.	F	p-level	F	p-level		
Loc	4	12	8.527	<b>0.002</b>	29.621	<b>&lt;0.001</b>	3	9	7.466	<b>0.008</b>	20.848	<b>&lt;0.001</b>		
Spe	2	3	1.133	0.430	1.550	0.345	2	3	7.832	0.064	3.294	0.175		
Pop	3	360	3.248	<b>0.022</b>	1.659	0.175	3	288	3.294	<b>0.021</b>	2.549	0.056		
Comp	2	6	1.477	0.301	36.645	<b>&lt;0.001</b>	2	6	2.896	0.132	29.663	<b>0.001</b>		
Time	2	6	39.090	<b>&lt;0.001</b>	11.291	<b>0.009</b>	5	15	156.101	<b>&lt;0.001</b>	22.825	<b>&lt;0.001</b>		
Loc * Spe	8	12	3.379	<b>0.029</b>	1.879	0.157	6	9	2.706	0.087	2.274	0.129		
Loc * Pop	12	360	0.780	0.671	1.039	0.412	9	288	0.843	0.577	0.912	0.515		
Loc * Comp	8	24	3.690	<b>0.006</b>	3.248	<b>0.012</b>	6	18	5.763	<b>0.002</b>	6.398	<b>0.001</b>		
Spe * Comp	4	6	5.194	<b>0.037</b>	5.003	<b>0.041</b>	4	6	7.295	<b>0.017</b>	6.211	<b>0.025</b>		
Pop * Comp	6	360	0.577	0.748	0.484	0.820	6	288	0.263	0.954	0.396	0.881		
Loc * Time	8	24	8.728	<b>&lt;0.001</b>	6.850	<b>&lt;0.001</b>	15	45	11.586	<b>&lt;0.001</b>	25.031	<b>&lt;0.001</b>		
Spe * Time	4	6	3.567	0.081	5.475	<b>0.033</b>	10	15	10.162	<b>&lt;0.001</b>	10.417	<b>&lt;0.001</b>		
Pop * Time	6	720	3.267	<b>0.004</b>	4.913	<b>&lt;0.001</b>	15	1440	1.565	0.076	2.069	<b>0.009</b>		
Comp * Time	4	12	3.644	<b>0.036</b>	3.950	<b>0.029</b>	10	30	1.877	0.089	3.494	<b>0.004</b>		
Loc * Spe * Comp	16	24	1.333	0.256	0.796	0.677	12	18	0.939	0.533	1.403	0.250		
Loc * Pop * Comp	24	360	0.959	0.521	0.716	0.836	18	288	1.034	0.421	0.867	0.619		
Loc * Spe * Time	16	24	4.947	<b>&lt;0.001</b>	4.805	<b>&lt;0.001</b>	30	45	3.265	<b>&lt;0.001</b>	4.116	<b>&lt;0.001</b>		
Loc * Pop * Time	24	720	0.883	0.626	0.715	0.839	45	1440	0.839	0.768	0.574	0.990		
Loc * Comp * Time	16	48	2.300	<b>0.013</b>	3.833	<b>&lt;0.001</b>	30	90	1.918	<b>0.010</b>	2.810	<b>&lt;0.001</b>		
Spe * Comp * Time	8	12	4.938	<b>0.007</b>	3.649	<b>0.022</b>	20	30	3.867	<b>&lt;0.001</b>	2.761	<b>0.006</b>		
Pop * Comp * Time	12	720	0.487	0.923	0.734	0.718	30	1440	0.298	1.000	0.554	0.976		
Loc * Spe * Comp * Time	32	48	0.919	0.594	1.421	0.133	60	90	1.111	0.322	1.851	<b>0.004</b>		
Loc * Pop * Comp * Time	48	720	1.028	0.423	0.768	0.873	90	1440	0.938	0.643	0.733	0.970		

Table 2.: Significance of effects and their interactions for variables: survival of plants on five localities in the end of 2003 season (July/August + September), on four localities in the end of 2004 (July) and on two localities in the end of 2005 (July/August). Summary of all Effects; abbreviations of design of experiment: Loc- LOCALITY, Spe-PLANTED SPECIES, Pop-POPULATION, Comp-COMPETITION, \* means interaction. The POPULATION factor was nested in the PLANTED SPECIES factor. The POPULATION factor was random factor. Statistically significant results ( $p < 0.05$ ) are in bold.

	Survival July/August 2003						Survival July 2004				Survival July/August 2005			
	Effect d.f.	Den.Syn. d.f.	F	p-level	F	p-level	Effect d.f.	Den.Syn. d.f.	F	p-level	Effect d.f.	Den.Syn. d.f.	F	p-level
<b>Loc</b>	4	12	3.739	<b>0.034</b>	11.340	<b>&lt;0.001</b>	3	9	11.699	<b>0.002</b>	1	3	150.000	<b>0.001</b>
<b>Spe</b>	2	3	0.844	0.512	2.470	0.232	2	3	9.769	<b>0.049</b>	2	3	14.233	<b>0.029</b>
<b>Pop</b>	3	360	2.542	0.056	4.367	<b>0.005</b>	3	288	2.364	0.071	3	144	0.896	0.445
<b>Comp</b>	2	6	3.219	0.112	0.619	0.570	2	6	5.615	<b>0.042</b>	2	6	0.667	0.548
<b>Loc * Spe</b>	8	12	2.370	0.086	4.871	<b>0.007</b>	6	9	2.460	0.109	2	3	12.500	<b>0.035</b>
<b>Loc * Pop</b>	12	360	0.719	0.733	1.000	0.448	9	288	0.760	0.654	3	144	0.179	0.910
<b>Loc * Comp</b>	8	24	2.864	<b>0.022</b>	3.573	<b>0.007</b>	6	18	5.000	<b>0.004</b>	2	6	1.750	0.252
<b>Spe * Comp</b>	4	6	4.578	<b>0.049</b>	10.619	<b>0.007</b>	4	6	4.000	0.065	4	6	0.667	0.638
<b>Pop * Comp</b>	6	360	0.667	0.677	0.286	0.944	6	288	0.182	0.982	6	144	0.716	0.637
<b>Loc * Spe * Comp</b>	16	24	1.659	0.127	0.885	0.592	12	18	1.134	0.393	4	6	0.875	0.530
<b>Loc * Pop * Comp</b>	24	360	1.031	0.424	0.949	0.535	18	288	0.872	0.613	6	144	1.433	0.206

Table. 3.: Significance of effects and their interactions for variables: Number of secondary shoots or rosettes for living plants (dead plants are omitted from analysis, therefore the design is incomplete) on five localities in 2003 (July/August and September) and on four localities in 2004 season (July). Summary of all Effects; abbreviations of design of experiment: Loc- LOCALITY, Spe-PLANTED SPECIES, Pop-POPULATION, Comp-COMPETITION, \* means interaction. The POPULATION factor was nested in the PLANTED SPECIES factor. The POPULATION factor was random factor. Statistically significant results ( $p < 0.05$ ) are in bold.

	July/August 2003				September 2003				July 2004			
	Effect d.f.	Den.Syn. d.f.	F	p	Effect d.f.	Den.Syn. d.f.	F	p	Effect d.f.	Den.Syn. d.f.	F	p
<b>Loc</b>	4	333.00	18.818	<b>&lt;0.001</b>	4	239.00	10.455	<b>&lt;0.001</b>	3	120.00	4.848	<b>0.003</b>
<b>Spe</b>	2	3.20	6.680	0.072	2	8.69	1.602	0.256	2	15.09	9.259	<b>0.002</b>
<b>Pop</b>	3	333.00	1.201	0.310	3	239.00	0.315	0.814	3	120.00	0.222	0.881
<b>Comp</b>	2	333.00	16.688	<b>&lt;0.001</b>	2	239.00	4.392	<b>0.013</b>	2	120.00	3.207	<b>0.044</b>
<b>Loc * Spe</b>	8	333.00	1.501	0.155	8	239.00	1.701	0.099	6	120.00	1.147	0.340
<b>Loc * Pop</b>	8	333.00	0.751	0.646	8	239.00	0.544	0.823	6	120.00	1.727	0.120
<b>Loc * Comp</b>	4	333.00	1.212	0.306	4	239.00	2.589	<b>0.038</b>	4	120.00	1.696	0.155
<b>Spe * Comp</b>	16	333.00	0.520	0.937	14	239.00	1.151	0.315	10	120.00	1.551	0.130

Table 4.: Significance of effects and their interactions for variable: The mean height of clones on five localities in three dates of 2003 season and on four localities in three dates of 2004 season. Dead plants are omitted from analysis. Summary of all Effects; abbreviations of design of experiment: Loc- LOCALITY, Spe-PLANTED SPECIES, Pop-POPULATION, Comp-COMPETITION, \* means interaction. The POPULATION factor was nested in the PLANTED SPECIES factor. The POPULATION factor was random factor. Statistically significant results ( $p < 0.05$ ) are in bold.

	Effect d.f.	Den.Syn. d.f.	May 2003		Den.Syn. d.f.	June 2003		Den.Syn. d.f.	July/August 2003	
			F	p		F	p		F	p
<b>Loc</b>	4	402.00	31.040	<b>&lt;0.001</b>	378.00	24.235	<b>&lt;0.001</b>	333.00	35.881	<b>&lt;0.001</b>
<b>Spe</b>	2	3.00	0.576	0.614	3.00	0.531	0.635	3.02	0.568	0.617
<b>Pop</b>	3	402.00	109.269	<b>&lt;0.001</b>	378.00	20.839	<b>&lt;0.001</b>	333.00	10.215	<b>&lt;0.001</b>
<b>Comp</b>	2	402.00	0.521	0.594	378.00	2.323	0.099	333.00	11.352	<b>&lt;0.001</b>
<b>Loc * Spe</b>	8	402.00	5.387	<b>&lt;0.001</b>	378.00	4.903	<b>&lt;0.001</b>	333.00	4.357	<b>&lt;0.001</b>
<b>Loc * Pop</b>	8	402.00	0.559	0.812	378.00	3.879	<b>&lt;0.001</b>	333.00	4.987	<b>&lt;0.001</b>
<b>Loc * Comp</b>	4	402.00	2.529	<b>0.040</b>	378.00	3.397	<b>0.010</b>	333.00	1.389	0.237
<b>Spe * Comp</b>	16	402.00	0.479	0.957	378.00	1.097	0.356	333.00	1.046	0.407

	Effect d.f.	Den.Syn. d.f.	May 2004		Den.Syn. d.f.	June 2004		Den.Syn. d.f.	July 2004	
			F	p		F	p		F	p
<b>Loc</b>	3	161.00	38.538	<b>&lt;0.001</b>	130.00	12.362	<b>&lt;0.001</b>	120.00	6.331	<b>0.001</b>
<b>Spe</b>	2	3.53	4.462	0.108	3.35	1.852	0.287	3.68	1.275	0.380
<b>Pop</b>	3	161.00	2.371	0.073	130.00	5.181	<b>0.002</b>	120.00	2.673	<b>0.050</b>
<b>Comp</b>	2	161.00	0.422	0.657	130.00	0.292	0.747	120.00	0.249	0.780
<b>Loc * Spe</b>	6	161.00	0.611	0.722	130.00	1.809	0.102	120.00	4.818	<b>&lt;0.001</b>
<b>Loc * Pop</b>	6	161.00	0.866	0.521	130.00	0.784	0.584	120.00	1.669	0.134
<b>Loc * Comp</b>	4	161.00	0.361	0.836	130.00	0.871	0.483	120.00	2.551	<b>0.043</b>
<b>Spe * Comp</b>	10	161.00	0.709	0.715	130.00	0.682	0.739	120.00	1.197	0.300



Table 5.:

Significance of effects and their interactions for variable: Mean number of flowers in the 2003 and in the 2004 seasons. Summary of all Effects; abbreviations of design of experiment: Loc- LOCALITY, Spe-PLANTED SPECIES, Pop-POPULATION, Comp-COMPETITION, \* means interaction. The POPULATION factor was nested in the PLANTED SPECIES factor. The POPULATION factor was random factor. Statistically significant results ( $p < 0.05$ ) are in bold.

	Effect d.f.	Den.Syn. d.f.	2003 F	2003 p	Effect d.f.	Den.Syn. d.f.	2004 F	2004 p
<b>Loc</b>	4	402.00	6.795	<b>&lt;0.001</b>	3	130.00	1.596	0.194
<b>Spe</b>	2	3.00	1.017	0.460	2	3.63	0.279	0.771
<b>Pop</b>	3	402.00	6.803	<b>&lt;0.001</b>	3	130.00	2.942	<b>0.036</b>
<b>Comp</b>	2	402.00	6.203	<b>0.002</b>	2	130.00	1.263	0.286
<b>Loc * Spe</b>	8	402.00	1.544	0.140	6	130.00	0.484	0.819
<b>Loc * Pop</b>	8	402.00	1.680	0.101	6	130.00	0.857	0.528
<b>Loc * Comp</b>	4	402.00	0.737	0.567	4	130.00	1.854	0.122
<b>Spe * Comp</b>	16	402.00	0.994	0.462	10	130.00	0.886	0.548

Table 6.: Significance of effects and their interactions for variables: Suma of germinated seeds of twelve experimental populations of three *Myosotis* species on five experimental sowing localities. Summary of all Effects. The LOCALITY factor was nested in the ORIGINAL SPECIES factor, and POP\_NUMBER factor was nested in the SPECIES factor. The LOCALITY and POP\_NUMBER factors were random factors. Statistically significant results ( $p < 0.05$ ) are in bold.

	Effect d.f.	Den.Syn. d.f.	F	p
ORIGINAL_SPECIES	2	3	0.688	0.568
LOCALITY(ORIGINAL_SPECIES)	3	51	9.147	<b>&lt;0.001</b>
SPECIES	2	9	1.922	0.202
POP_NUMBER(SPECIES)	9	51	2.557	<b>0.017</b>
ORIGIN_S*SPECIES	4	51	0.660	0.623



successful on L1 and on N2 localities. Also significant interaction PlantedSpecies\*Competition\*Time demonstrates that *Myosotis* species reacted differently to competitive treatments (Fig. 2). *M. caespitosa* plants survived better in gaps without competition, while *M. palustris* subsp. *laxiflora* and *M. nemorosa* preferred different competitive treatments on each of experimental localities, no matter if original or not. Moreover, suitability of the three competitive treatments differed between experimental localities (interactions Locality\*Competition and Locality\*Competition\*Time):

In the second season, C1 locality was destroyed (flooded by water), so that it was not possible to carry out the regular recording. Surprisingly, one surviving clone of *M. caespitosa* was found on the C1 locality in the third season, even though it had been flooded by at least 30 cm of water for two seasons (nevertheless, as this locality was not surveyed completely, it is not included in the statistical analyses). The differences among the four persisting localities and also among experimental populations continued. Close to the significance were differences in survival of individual species, which was more pronounced in time between localities (see results to the July 2004, Fig. 2). Contrasts analysis was also significant (June 2004:  $F_{(1,321)} = 12.06$ ;  $p < 0.001$ ; July 2004:  $F_{(1,321)} = 7.38$ ;  $p = 0.007$ ), showing that on average, survival is better on the home-species localities, but we can not say, that original *Myosotis* species survived the best on its original locality in all cases. Almost at all localities (with exception of N2) *M. nemorosa* survived the best. Then followed *M. laxiflora* plants, which survived equally on L2 and N2 localities and was second most successful at L1 and N1 localities. *M. caespitosa* species survived the worst on all four undestroyed localities. Differences in surviving of plants among experimental localities and among individual competition levels changed in time. Advantage of gaps for survival was obvious on L2 (sandy deposit of brook) and N2 (woody path) localities, which both are localities with good moisture conditions and with lower biomass production (see Appendix 3). On the contrary, survival increased with increasing competition level on the wet meadow (N1 locality), and no differences among competition levels was found on the river bank (L1 locality). Comparing the species, reaction of *M. caespitosa* to gaps was the most positive one, whereas survival of the other two species was affected less.

Only two localities, both home localities of *M. nemorosa* (N1 and N2) persisted till the third season, whereas both the *M. palustris* subsp. *laxiflora* localities (L1 and L2) were destroyed by flooding and subsequently overgrown by dense vegetation (mostly *Phragmitoides arundinacea*). Data about plant survival 2005 were analysed only for the two persisting localities (to July/August date, Table 2). There were differences between localities (more surviving plants were on N2), between planted species (the most successful in surviving was *M. nemorosa*, followed by *M. palustris* subsp. *laxiflora* and with only few surviving *M. caespitosa* individuals). For example all plants of

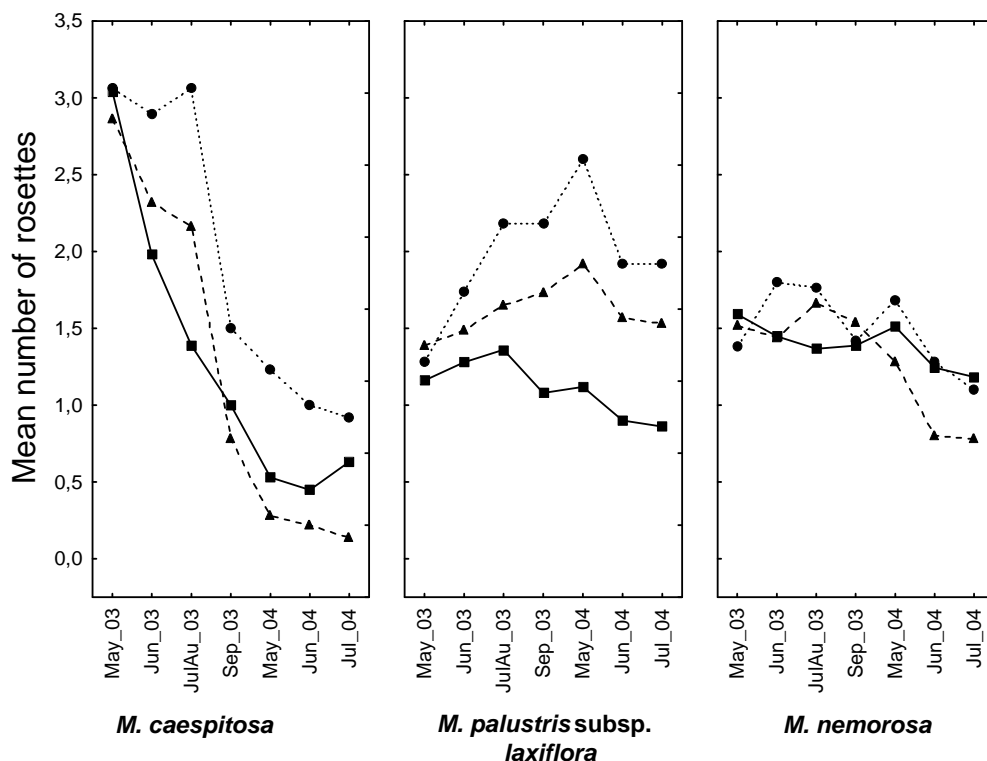


Fig. 3: Mean number of shoots or secondary rosettes of three *Myosotis* species in three competitive treatments: High competition, Middle competition, Gap, during 2003 and 2004 seasons. Average over all localities. Dead plants are counted as clones with 0 shoots. Weighted means.

*M. caespitosa* died on N1 locality, whereas *M. nemorosa* – original species – was the most successful there (cca 47% of surviving plants); on the other site, on N2 locality was *M. palustris* subsp. *laxiflora* a little more successful (cca 70% of surviving plants) than *M. nemorosa* (cca 63% of surviving plants).

The number of shoots/rosettes formed per planted individual is naturally affected also by survival (dead individuals form zero shoots), but also reflects the clonal behaviour of survivors. Its dynamics (i.e. interaction with Time) differed significantly among localities, among species, and there was particularly pronounced differences among the competition treatments (Table 1, Fig. 3).

*M. caespitosa* formed the highest number of secondary rosettes immediately after planting, but they started to die off rather fast on all experimental localities (with exception of gaps, which were suitable for both, forming new rosettes, and also for survival). *M. palustris* subsp. *laxiflora* exhibited the most pronounced effect of competition treatment, which increased toward the second season. Gaps were the most suitable microsites, followed by

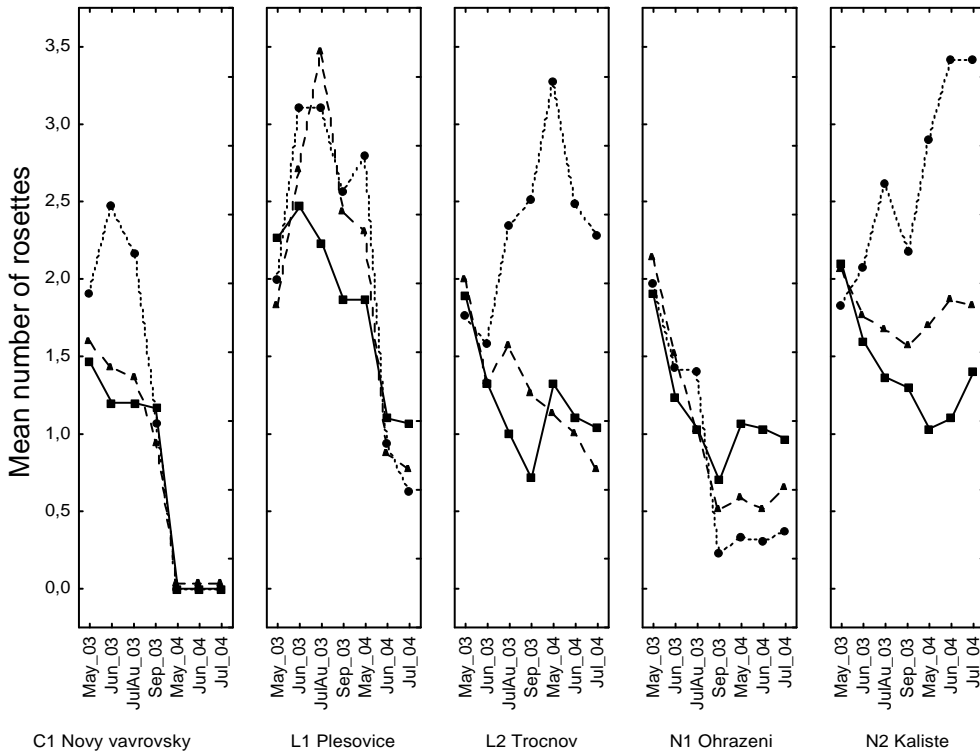


Fig. 4: Mean number of shoots or secondary rosettes in three competitive treatments: High competition, Middle competition, Gap, on five experimental localities during 2003 and 2004 seasons. Average over all three species. Dead plants are counted as clones with 0 shoots. Weighted means.

Middle competition and the least number of shoots was formed in Height competition. *M. nemorosa* clones had relatively stable and comparable mean number of shoots during the entire experiment.

Similarly as for survival, the effect of competition differed considerably among the experimental localities. While on C1 (only the first season), L2 and N2 localities, the clones produced on average most secondary shoots in Gaps, on N1 it was in High competitive treatment, and on L1 locality the suitability of microsities changed between years (Fig. 4). Corresponding effects can be found also for shoots / secondary rosettes per living plant (Table 3). In particular, the surviving plants of *M. nemorosa* produced less shoots in comparison with the other two species.

Contrasts analysis was not significant in any date of experiment, which means, that individual *Myosotis* species did not produce more secondary shoots or rosettes on their original locality(-ies) in comparison with other two species.

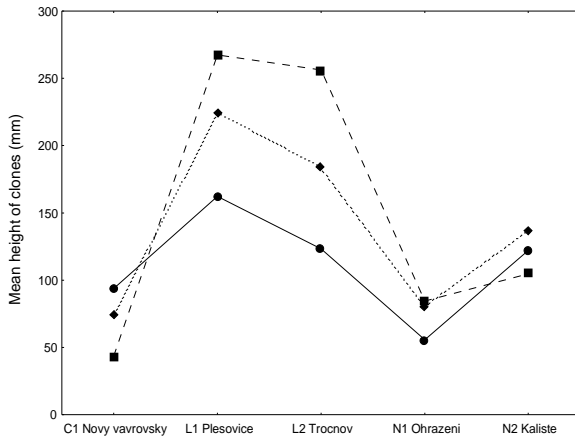


Fig. 5: Mean height of clones of three *Myosotis* species: *M. caespitosa*; *M. palustris* subsp. *laxiflora*; *M. nemorosa*, on five experimental localities in July/August 2003. Average over all treatments. Dead plants are omitted. Weighted means.

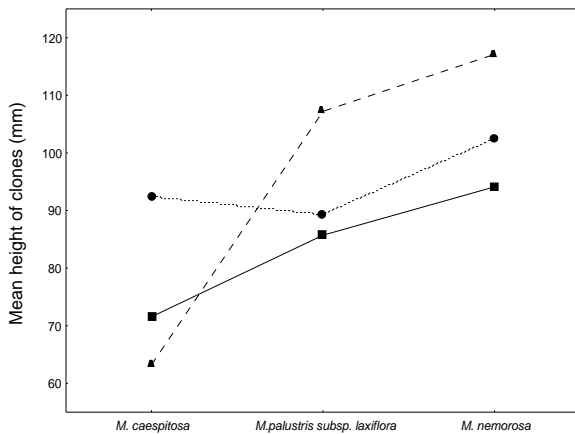


Fig. 6: Mean height of clones of three *Myosotis* species in three competitive microsites: High competition; Middle competition; Gap, in June 2003. Average over all localities. Dead plants are omitted. Weighted means.

The height of living clones differed between populations (clones of *M. caespitosa* from Munice population were the lowest, whereas other populations of all the species were comparable, so that there are no consistent differences between species) and localities (with the highest clones on L1 and L2 localities, and the lowest on C1 and than N1 localities, Fig. 5). These differences were more obvious during the first, 2003 season, and gradually disappeared in the second year. The negative effect of competition on height was found in the middle of 2003 season, when plants were the smallest in High competitive microsites.

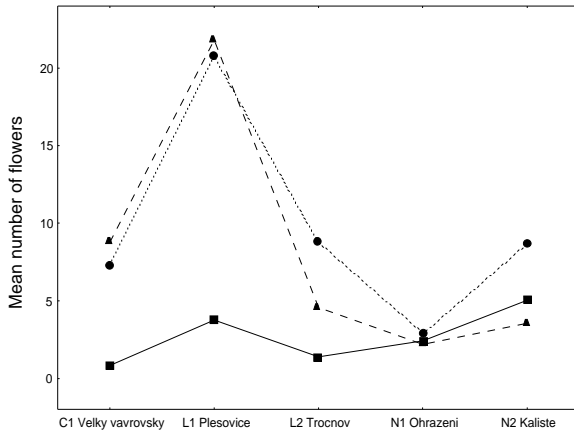


Fig. 7: The mean number of flowers of all experimental *Myosotis* plants in three competitive microsites: High competition; Middle competition; Gap, on five experimental localities in 2003 season. Average over all species. Dead plants are omitted. Weighted means.

The differences in height of individual *Myosotis* species clones changed according to the experimental localities (significant interaction Locality\*Planted species in Table 4, Fig. 5). The Contrasts analysis suggests that height is positively affected for individuals in localities where the species is resident (June 2003:  $F_{(1,378)} = 13.98$ ;  $p < 0.001$ ; July/August 2003:  $F_{(1,333)} = 21.20$ ;  $p < 0.001$ ; June 2004:  $F_{(1,130)} = 10.39$ ;  $p = 0.002$ ; July 2004:  $F_{(1,120)} = 7.05$ ;  $p = 0.020$ ).

Similarly as for the clonal growth characteristics, the effect of competitive treatment on the height of clones differed among localities, and the height of clones was differently affected by competitive treatments, (Fig. 6). In 2003 season, *M. caespitosa* clones were highest in Gaps, but other two species in Middle competition. All three species were smallest in High competitive treatment. In the end of 2004 season, clones of all species were highest in Gaps, in comparison with both competitive treatments.

The flowering in 2003 differed between localities and competitive treatments. Plants flowered the most on L1 locality, i.e. in the locality with highest shoot height. Interestingly, there were significant differences between populations within species, but not between species. In particular, plants of *M. caespitosa* from the Dářko population (Appendix 1) flowered most intensively in comparison with all other populations (of different species). Despite differences among individual localities in flowering, the intensity of flowering decreased with competition similarly in all the localities (Fig. 7) and in all the species. Contrasts analysis was not significant, so there seem not to be home advantage for flowering. Small differences between populations persisted

till the 2004 season, but many experimental plants did not flower during this season, and lot of them died.

### *Germination experiment:*

Not surprisingly, large differences were found between localities, with the highest germination and seedling establishment on C2 locality. There were also significant differences between individual *Myosotis* populations, with the highest seedling establishment in three *M. caespitosa* populations (the fourth *M. caespitosa* population, however, exhibited low establishment, causing the species difference to be non-significant). Nevertheless, the germination and seedling establishment of *M. caespitosa* species was more successful on all experimental localities in comparison with other two species. All three *Myosotis* species has shown best germination and seedling establishment on experimental localities, where *M. caespitosa* was original, than followed localities with *M. palustris* subsp. *laxiflora*, and they were the worst on localities with *M. nemorosa* origin (however, the differences were not significant). The contrasts analysis of interaction of effects Origin species \* Species was not significant ( $p = 0.52$ ;  $F_{(1,51)} = 0.424$ ). So, it seems that localities of *M. caespitosa* are suitable for germination of all the studied species, and *M. caespitosa* itself germinates best of all the species, nevertheless, there are large differences among individual localities, and also, among individual populations within species.

### *Seed bank at localities:*

Even after two months of watering, germination of the *Myosotis* seedlings from seed bank sub-samples was poor and dishes without germination prevailed. Total numbers of germinated seeds from each locality are summarized in Appendix 5. Maximal number of total seedlings was found in *M. nemorosa* localities N2 and than N1, although numbers are low, 10 and 4 seedlings. Nevertheless, with exception of the C1 locality with zero seedlings, germination of seedlings from soil from other localities confirms presence of *Myosotis* seeds in the seed bank.

## **Discussion**

The three *Myosotis* species, although all wetland plants, differ in their habitat preferences, and particularly in disturbance regime most often encountered in their typical habitats. *M. caespitosa* is typical for rather short-term habitats, as emerged fishpond bottoms, *M. palustris* subsp. *laxiflora* typically occupies disturbed plots on river banks, *M. nemorosa* encounters a wide range of habitats, where it often faces strong competition from perennial plants of the community matrix. Interestingly, the fate of our experimental localities confirmed the typical habitat duration of the species: our only locality of *M.*



*caespitosa* vanished being flooded after the first season, whereas the two localities of *M. palustris* subsp. *laxiflora* were disturbed by flowing water and then overgrown by thick bed of tall *Phragmitoides arundinacea*. Our previous, laboratory and pot studies (Koutecká & Lepš 2009, 2011) have generally demonstrated adaptive values of individual species traits for their preferred habitats. In particular, *M. caespitosa* is crucially dependent on the seed regeneration, and accordingly, its seeds exhibit the highest, and the most stable germinability (low interpopulation variability, no decrease of germinability within two years). *M. palustris* subsp. *laxiflora* is probably dependent on vegetative propagation, and demonstrated the highest clonal growth. Its aboveground stolons are typically broken by flood water and severed parts can root in large distances downstream. *Myosotis nemorosa* clones are able to persist in dense meadow vegetation for years, however they spread mainly by short rhizomes only for distances of few cm. In addition, presence in seed bank and good germination enable this species recruitment on suitable sites with lower competition. The highest among-population variability in all recorded characteristics should be due to its local adaptation to a wide spectrum of habitats.

Nevertheless, these two experiments were done under controlled, but rather unnatural conditions. Consequently, we were interested how will the species compare under natural conditions of their field localities.

*The first aim: to compare the differences between closely related species with the variability among populations within species*

As expected, the three *Myosotis* species differed in their survival and growth. The differences correspond to species habitat preferences. Nevertheless, there were also pronounced differences between individual populations within a species.

*M. caespitosa* is a species of temporary habitats, typically fishpond bottoms. It is the species with shortest life span among the studied species, sometimes considered to be annual or short-lived perennial with no clonal potential (Grime et al. 1981, Klimešová & Klimeš 1998, Štěpánková 2000). Our experiment confirmed that mortality of *M. caespitosa* clones was the highest, especially in competitive treatments. Indeed, every shoot died after the flowering. On the other hand, in the first season *M. caespitosa* produced the highest number of secondary rosettes and stolons in gaps in comparison with the other two species, and some individuals survived for several seasons, particularly in gaps. Our gaps resembled best habitats of its natural occurrence (pond margins and exposed pond bottoms, alluvia of flowing waters, wet ditches and spring areas, reed and sedge margins; Grime et al. 1981, Štěpánková 2000). Accordingly, this species was most survived better than other two species on exposed pond bottom with high radiance and poor

vegetation (locality C1) and worst on other localities in comparison with other two species. Still, in our experiment some plants of this species survived even in permanent habitats (species rich meadow and woody path), which are not their typical, and even spread clonally from lateral rosettes at least for three seasons there. Potential of this short-lived species for clonal persistence was also proved in our previous pot study (Koutecká & Lepš 2011). Moreover, after flooding of C1 locality, one clone of *M. caespitosa* survived and flowered other two seasons, even 30 cm under water!

Among the experimental species, *M. palustris* subsp. *laxiflora* is undoubtedly species with best developed clonal spreading (confirmed also by our pot experiment, Koutecká & Lepš 2011), forming two types of shoots (stolons and rhizomes), and is long-lived perennial (Klotz et al. 2002; Štěpánková 2000). It occurs in marchlands and alluvia of rivers and streams, is able to grow even in waterlogged sites, and can form floating mats at the edge of water (Grime et al. 1987; Klotz et al. 2002; Lenssen et al. 2003; Štěpánková 2000). Clonal fragments of *M. palustris* subsp. *laxiflora* (even very small modules) are able to disperse downstream for long distances, and colonise and vegetatively expand on flooded banks without competitive vegetation. It often colonizes open places on banks where vegetation was damaged by torrential waters during floods (personal observation). In our field experiment, *M. palustris* subsp. *laxiflora* survived the best on their original localities (L1 – there was equally successful with *M. nemorosa*; and L2), and its clones were highest there during the first season. Clonal propagation of this species was most affected by the level of competition – in gaps with reduced competition it spreads really vigorously and fast, which is much reduced with increasing competition. It corresponds with its strategy in the field - to colonize quickly the open places with initial stages of succession (where it loses later in succession to taller vegetation, like beds of *Phragmitoides arundinacea*).

From the three *Myosotis* species, *M. nemorosa* occurred in the widest range of habitats, from wet to drying and from young successional stages to relatively stable communities (e.g. wet meadows, alluvia of streams, spring areas, wet woods, wet ditches; Štěpánková 2000). In our experiment *M. nemorosa* species showed the best adaptability to different habitats too. While in the first season plants of *M. nemorosa* survived the best on three localities from five (both *M. nemorosa* original N1 and N2; on L1 locality was equally successful as resident species), in the second and the third seasons it the most successful survivor on all persisting localities. Moreover, *M. nemorosa* clones were highest on their original localities (N1 and N2).

Data about life history and clonality of *M. nemorosa* are various, from annual to biennial with no or only low clonal potential (Klimešová & Klimeš 1998) to long-lived perennial hemicryptophyte, which clonally propagates by short below-ground shoots of stem origin (Klotz et al. 2002; Štěpánková 2000; Chaloupecká & Lepš 2004). In our experiment surviving plants of *M. nemorosa*

created a few shoots spreading underground only for shorter distances (till about 5 cm) in the start of season, and number of shoots stayed relatively stable till the end season at all localities and in all types of competitive treatments. Although being competitively weak species, once established, *M. nemorosa* is able to persist on various habitats.

*The second aim: the role of microsite type*

Plant competition suppresses the growth of experimental plants in a wide range of productivities and other environmental conditions (e.g. the intercontinental multisite *Poa pratensis* transplant study, Reader et al. 1994). But the intensity of competition depended on plant community and differed between localities. In our experiment, survival of experimental plants was negatively correlated with biomass production on individual experimental localities (Appendix 3. shows biomass production at four localities at the beginning of second season).

The effect of competition treatment (as the main effect) was rather weak in our experiment. On the contrary, we have found strong interaction of competition treatment with locality: the suitability of microsite types for survival and growth was influenced by natural conditions at individual localities. The gaps were not always the most suitable places, particularly for survival. As already noted (e.g. Kotorová & Lepš 1999), the gaps are not just competition free space, but also place with the most pronounced environmental fluctuation. In our case, gaps are much more prone to desiccation than undisturbed places. The effect of gaps was mostly positive for experimental plants, particularly for *M. caespitosa* survival and for *M. palustris* subsp. *laxiflora* clonal spread; while *M. nemorosa* faced better up to competition. But effect of microsites differed above all between localities. In addition, persistence of microsites, especially gaps, was influenced also by density and dynamics of surrounding vegetation cover. Large differences between effects of microsites on individual localities were found especially in the second season. The survival was better in gaps at two of localities (L2 and N2), which both are localities with good moisture conditions and with lower biomass production. All three competitive treatments had equal effect on survival on riverbank locality (L1), probably because of equal shading of treatments, high biomass production and fast succession of surrounding vegetation, which caused disappearing of differences between competitive treatments. On the wet meadow (N1; locality with stable biomass production, large variation of water table during a season, with no shading by surrounding trees), gaps were unsuitable microsites for the survival. On this locality, experimental plants were better protected from herbivores and desiccation outside the gaps.

*The third aim: germination of several populations of experimental species in several field localities*

Our sowing experiment demonstrated large differences among individual localities – this is not surprising, the localities differ in their suitability for seedling regeneration. We have also found pronounced differences among populations within a species. Differences between species were not significant, because low number of populations per each species and high inter-population variability. Still, there was an obvious tendency, that *M. caespitosa* species germination and seedling establishment was the most successful in comparison with other two species: three most successful populations were of those of *M. caespitosa*. Seedling establishment almost of all experimental populations of *M. caespitosa* was the highest on all of six experimental localities, which correspond with the best germinability of this species in a greenhouse experiment (Koutecká & Lepš 2009). Concordantly with the field results, also the greenhouse demonstrated high inter-population variability in germination in all the three species, especially at *M. nemorosa*. Similar result was obtained in a germination experiment with four closely related *Lamium* species (Karlsson & Milberg 2008). All this shows again, how important it is to include the intra-species variability as important factor in experiments comparing more species.

Reciprocal transplant experiments usually investigate the adaptation of local populations to a locality. Here, we have a more complicated situation. We were primarily interested in species adaptation to a locality, where the species is resident. Moreover, we were not able to find suitable localities for long-term experiments. There were several problems – two of the three species – *M. palustris* subsp. *laxiflora* and *M. caespitosa* grow typically on short term habitats. We were interested in an experiment lasting for three seasons (because the survival over the seasons is an important factor of population persistence). Moreover, we needed strong source populations (because the seeds mature over longer period, so we needed large population to get enough seeds for the experiment), and these populations were often in sites not suitable for establishment of long term experiment. Particularly for *M. caespitosa* we were able to find just one locality where we believed that it might last for several seasons, but even this one locality vanished before the end of experiment.

The individuals of the resident species populations were not always superior – e.g. *M. caespitosa* has best germination on all the localities, or *M. nemorosa* has shown the longest survival on most of the localities. Nevertheless, for many characteristics studied, the contrast analysis has shown, that, although not always best on the “home species” locality, on average the species are doing better there. The final fitness is result of several processes, in our case survival, generative reproduction, and clonal spreading. When one focuses on a single process, we can not expect that a species will always demonstrate the home site advantage. When we summarize the results of our

previous experiments (Koutecká & Lepš 2009, 2011) with the species and this field experiment, we can conclude that it is combination of traits, which determines the species ecological behaviour. It seems that the strategy of *M. nemorosa* is persistence in a site, and probably also in a spot within a site, by long term survival of individuals (where the flowering stem dies off, but the genet survives by clonal growth), together with regeneration by seeds. The strategy of *M. palustris* subsp. *laxiflora* is fast colonization of gaps by clonal growth, supported by long-term dispersal by flooding water along river banks. And finally, the strategy of *M. caespitosa* is based on production of well germinable seeds with persistent seed bank.

## Acknowledgements

The study was supported by grants GAČR 206/09/1471, MSMT 6007665801 and LC 06073.

## References

- Adler W., Oswald K., Fischer R. (1994): *Exkursionsflora von Österreich*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart & Wien.
- Albrecht G., Biemelt S., Baumgartner S. (1997): Accumulation of fructans following oxygen deficiency stress in related plant species with different flooding tolerances. *New Phytol* 136:137–144.
- Aarssen L. W. & Epp G. A. (1990): Neighbour manipulations in natural vegetation: a review. *J. Veg. Sci.* 1: 13-30.
- Becker U., Colling G., Dostal P., Jakobsson A. & Matthies D. (2006): Local adaptation in the monocarpic perennial *Carlina vulgaris* at different spatial scales across Europe. *Oecologia* 150, 506–518.
- Becker U., Dostal P., Jorritsma-Wienk L. D. & Matthies D. (2008): The spatial scale of adaptive population differentiation in a wide-spread, well-dispersed plant species. *Oikos* 117: 1865-1873.
- Bischoff A., Crémieux L., Smilauerova M., Lawson C. S., Mortimer S. R., Dolezal J., Lanta V., Edwards A. R., Brook A. J., Macel M., Leps J., Steinger T. & Müller-Schärer H. (2006): Detecting local adaptation in widespread grassland species – the importance of scale and local plant community. *J. Ecol.* 94: 1130-1142.
- Boscaiu M., Marhold K. & Ehrendorfer F. (1997): The *Cerastium alpinum* group (*Caryophyllaceae*) in the high mountains of Poland and Slovakia. *PHYTON-ANNALES REI BOTANICAE* 37: 1-17.
- Bowman G., Perret C., Hoehn S., Galeuchet D.J. & Fischer M. (2008): Habitat fragmentation and adaptation: a reciprocal replant–transplant experiment among 15 populations of *Lychnis flos-cuculi*. *Journal of Ecology* 96: 1056–1064.
- Chaloupecká E. & Lepš J. (2004): Equivalence of competitor effects and tradeoff between vegetative multiplication and generative reproduction: case study with *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa*. *Flora* 199: 157–167.
- Dakskobler I., Seliškar A. & Vreš B. (1999): *Stellaria nemorum* L. and *S. montana* Pierrat (*Caryophyllaceae*) in the Forest Communities of Slovenia. *Folia Geobot.* 34: 115-125.
- Diekmann M. & Lawesson J. E. (1999): Shifts in ecological behaviour of herbaceous forest species along a transect from northern central to north Europe. *Folia Geobot.* 34: 127-141.
- Dorman M., Sapir Y. & Volis S. (2009): Local adaptation in four *Iris* species tested in a common-garden experiment. – *Biol. J. Lin. Soc.* 98: 267–277.

- Duchoslav M., Šafařová L. & Krahulec F. (2010): Complex distribution patterns, ecology and coexistence of ploidy levels of *Allium oleraceum* (Alliaceae) in the Czech Republic. *Annals of Botany* 105: 719–735.
- Eckstein R. L., Danihelka J., Hölzel N. & Otte A. (2004): The effects of management and environmental variation on population stage structure in three river-corridor violets. *Acta Oecologica - International Journal of Ecology* 25: 83-91.
- Eckstein R. L., Hölzel N. & Danihelka J. (2006): Biological Flora of Central Europe: *Viola elatior*, *V. pumila* and *V. stagnina*. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 8: 45-66.
- Ekrt L. & Štech M. (2008): A morphometric study and revision of the *Asplenium trichomanes* group in the Czech Republic. *Preslia* 80: 325–347.
- Flegrová M. & Krahulec F. (1999): *Anthoxanthum odoratum* and *A. alpinum*: life history parameters at two different altitudes. *Folia Geobot.* 34: 19-31.
- Gauthier P., Lumaret R. & Bedecarrats A. (1998): Ecotype differentiation and coexistence of two parapatric tetraploid subspecies of cocksfoot (*Dactylis glomerata*) in the Alps. *New Phytol.* 139: 741-750.
- Grime J. P., Hodgson J. G. & Hunt R. (1987): Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman, London.
- Grime J. P., Mason G., Curtis A. V., Rodman J., Band S. R., Mowforth M. A. G., Neal A. M. & Shaw S. (1981): A comparative study of germination characteristics in a local flora. *J. Ecol.* 69: 1017-1059.
- Grøndahl E. & Ehlers B. K. (2008): Local adaptation to biotic factors: reciprocal transplants of four species associated with aromatic *Thymus pulegioides* and *T. serpyllum*. *Journal of Ecology* 96: 981–992.
- Harper J. L. & Chancellor A. P. (1959): The comparative biology of closely related species living in the same area. IV. *Rumex*: Interference between individuals in populations of one and two species. *J. Ecol.* 47: 679-695.
- Hegi G. (1979): *Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Band III, Teil 2*. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Hölzel N (2003): Re-assessing the ecology of rare flood-meadow violets (*Viola elatior*, *V. pumila*, *V. persicifolia*) with large phytosociological data sets. *Folia Geobotanica* 38: 281-298.
- Hroudová Z., Zákravský P. & Frantík T. (1999): Ecological differentiation of central European *Bolboschoenus* taxa and their relationship to plant communities. *Folia geobotanica* 34: 77-96.
- Joshi J., Schmid B., Caldeira M. C., Dimitrakopoulos P. G., Good J., Harris R., Hector A., Huss-Danell K., Jumpponen A., Minns A., Mulder C. P. H., Pereira J. S., Prinz A., Scherer-Lorenzen M., Siamantziouras A.-S. D., Terry A. C., Troumbis A. Y. & Lawton J. H. (2001): Local adaptation enhances performance of common plant species. *Ecol. Lett.* 4: 536-544.
- Karlsson L. M. & Milberg P. (2008): Variation within species and inter-species comparison of seed dormancy and germination of four annual *Lamium* species. *Flora* 203: 409-420.
- Kindell C., Winn A. A. & Miller T. E. (1996): The effects of surrounding vegetation and transplant age on the detection of local adaptation in the perennial grass *Aristida stricta*. *Journal of Ecology* 84: 745–754.
- Klimešová J. & Klimeš L. (1998): CLOPLA1 (CLOnal PLAnts, version 1) - a database of clonal growth in plants of central Europe. Published at <http://www.butbn.cas.cz/klimes/>
- Klotz S., Kühn I. & Durka W. (2002): BIOLFLOR – Eine Datenbank mit biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland. Landwirtschaftsverlag, Bonn - Bad Godesberg.
- Knight T. M. & Miller T. E. (2004): Local adaptation within a population of *Hydrocotyle bonariensis*. *Evolutionary Ecology Research* 6:103–114.

- Kotorová I. & Lepš J. (1999): Comparative ecology of seedling recruitment in an oligotrophic wet meadow. *J. Veg. Sci.* 10: 175-186.
- Koutecká E. & Lepš J. (2011): Performance of three closely related *Myosotis* species in an experiment in which substrate quality and competition were manipulated. – *Preslia* 83: xx–xx.
- Koutecká E. & Lepš J. (2009): Effect of light and moisture conditions and seed age on germination of three closely related *Myosotis* species. *Folia Geobot* 44: 109-130.
- Koutecký P. (2007): Morphological and ploidy level variation of *Centaurea phrygia* agg. (*Asteraceae*) in the Czech republic, Slovakia and Ukraine. *Folia Geobot.* 42: 77–102.
- Krahulec F. (1994): Clonal behaviour in closely related plants. – *Folia Geobot. Phytotax.* 29: 277–289.
- Krahulec F., Marhold K. & Schmid B. (1999): Ecology of closely related plant species: An introduction. *Folia Geobot.* 34: 1-5.
- Lenssen J. P. M., Menting F. B. J. & Van der Putten W. H. (2003): Plant responses to simultaneous stress of waterlogging and shade: amplified or hierarchical effects? *New Phytol.* 157: 281-290.
- Lenssen J. P. M., van Kleunen M., Fischer M. & de Kroon H. (2004): Local adaptation of the clonal plant *Ranunculus reptans* to flooding along a small-scale gradient. *Journal of Ecology* 92: 696-706.
- Linhart Y.B. (1988): Intrapopulation differentiation in annual plants. III. The contrasting effects of intra- and interspecific competition. *Evolution* 42: 1047–1062.
- Linhart Y.B. & Grant M.C. (1996): Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 237–277.
- Mehrhoff, L. A. & Turkington, R. (1996): Growth and survival of white clover (*Trifolium repens*) transplanted into patches of different grass species. *Canad. J. Bot.* 74: 1243-1247.
- Montalvo A.M. & Ellstrand N.C. (2000): Transplantation of the subshrub *Lotus scoparius*: testing the home-site advantage hypothesis. *Conservation Biology* 14: 1034–1045.
- Moora M., Söber V. & Zobel M. (2003): Responses of a rare (*Viola elatior*) and a common (*V. mirabilis*) congeneric species to different management condition in grassland—is different light competition ability responsible for different abundances? *Acta Oecol.* 24, 169–174.
- Moravcová, L., Zákravský, P. & Hroudová Z. (2001): Germination and seedling establishment in *Alisma gramineum*, *A. plantago-aquatica* and *A. lanceolatum* under different environmental conditions. *Folia geobotanica* 36: 131-146.
- Morgan, J. W. (1997): The effect of gap size on establishment, growth and flowering of the endangered *Rutidosia leptorrhynchoides* (Asteraceae). *J. Appl. Ecol.* 34: 566-576.
- Nagy S.E. & Rice K.J. (1997): Local adaptation in two subspecies of an annual plant: implications for migration and gene flow. *Evolution* 51: 1079–1089.
- Perglová I., Pergl J., Skálová H., Moravcová L., Jarošík V. & Pyšek P. (2009): Differences in germination and seedling establishment of alien and native *Impatiens* species. *Preslia* 81: 357–375.
- Platenkamp G. A. J. (1990): Phenotypic plasticity and genetic differentiation in the demography of the grass *Anthoxanthum odoratum*. *Journal of Ecology* 78: 772-788.
- Prati D. & Schmid B. (2000): Genetic differentiation of life-history traits within populations of the clonal plant *Ranunculus reptans*. *Oikos* 90: 442–456.
- Reader R. J. et al. (1994): Plant competition in relation to neighbor biomass: an intercontinental study with *Poa pratensis*. *Ecology* 75: 1753-1760.
- Rice K.J. & Knapp E.E. (2008): Effects of competition and life history stage on the expression of local adaptation in two native bunchgrasses. *Restoration Ecology* 16:12–23.
- Rice K.J. & Mack R.N. (1991): Ecological genetics of *Bromus tectorum*. III. The demography of reciprocally sown populations. *Oecologia* 88: 91–101.

- Rünk K., Moora M. & Zobel M. (2004): Do different competitive abilities of three fern species explain their different regional abundances? – *J. Veg. Sci.* 15: 351–356.
- Rünk K. & Zobel M. (2009): Differences in post-emergence growth of three fern species could help explain their varying local abundance. – *Am. Fern J.* 99: 307–322.
- Rünk K., Zobel M. & Zobel K. (2010): Different factors govern the performance of three closely related and ecologically similar *Dryopteris* species with contrastingly different abundance in a transplant experiment. – *Botany-Botanique* 88: 961–969.
- Schuster R. (1967): Taxonomische Untersuchungen über die Serie *Palustres* M. Pop. der Gattung *Myosotis* L. Feddes Repert 74:39–98.
- Silvertown J. & Charlesworth D. (2001): Introduction to plant population biology. Blackwell pub.
- StatSoft, Inc. (1998): STATISTICA 5. Electronic manual. Tulsa, Oklahoma. Available at: <http://www.statsoft.com>
- StatSoft, Inc. (2005): STATISTICA 7. Electronic manual. Tulsa, Oklahoma. Available at: <http://www.statsoft.com>
- Stöcklin J. & Zoller H. (1992): Vergleich von Lebenszyklus und Populationsstruktur bei Hohenvikariantender Gattung *Epilobium*. – In: Schmid B. & Stöcklin J. (eds), Populationsbiologie der Pflanzen, p. 147–164, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- Stöcklin J. (1999): Differences in life history traits of related *Epilobium* species: clonality, seed size and seed number. *Folia Geobot* 34: 7-18.
- Špačková I., Kotorová I. & Lepš J. (1998): Sensitivity of seedling recruitment to moss, litter and dominant removal in an oligotrophic wet meadow. *Folia Geobot.* 33: 17-30.
- Štěpánková J. (2000): 16. *Myosotis* L. – pomněnka. In: Slavík B. (ed.), Květena ČR 6 (Flora of the Czech Republic, vol. 6, in Czech), Academia, Praha, pp. 216-234.
- Štěpánková J. (2002): 14. *Myosotis* L. – pomněnka (Boraginaceae Juss.). In Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J., Štěpánek J. (eds) Klíč ke květeně České republiky (Key to the flora of the Czech Republic). Academia, Praha, pp 526–530 (in Czech).
- Urbanska-Worytkiewicz K. (1980): Reproductive strategies in a hybridogenous population of *Cardamine* L. – *Acta Oecol., Oecol. Plant.* 1: 137–150.
- van Tienderen P. H. & van der Toorn J. (1991): Genetic differentiation between populations of *Plantago lanceolata*. I. Local adaptation in three contrasting habitats. *J. Ecol.* 79: 17-42.
- Walck J. L., Baskin J. M. & Baskin C. C. (2001): Why is *Solidago shortii* narrowly endemic and *S. altissima* geographically widespread? A comprehensive comparative study of biological traits. *Journal of Biogeography* 28: 1221-1237.
- Wallossek C. (1999): The acidophilous taxa of the *Festuca varia* group in the Alps: new studies on taxonomy and phytosociology. *Folia Geobot* 34: 47-75.
- van Tienderen P. H. & van der Toorn J. (1991): Genetic differentiation between populations of *Plantago lanceolata*. I. Local adaptation in three contrasting habitats. *J. Ecol.* 79: 17-42.
- Wilson, S. & Tilman, D. (1991): Components of plant competition along an experimental gradient of nitrogen availability. *Ecology* 72: 1050-1065.
- Wu C. A., Lowry D. B., Nutter L. I. & Willis J. H. (2010): Natural variation for drought-response traits in the *Mimulus guttatus* species komplex. – *Oecologia* 162: 23–33.



## Appendix 1.

Localities at which seeds were collected for reciprocal transplant experiment (pre-planted young plants were used in reciprocal transplant experiment) and for sowing experiment. Abbreviations of species: C - *M. caespitosa*, L - *M. palustris* subsp. *laxiflora*, N - *M. nemorosa*.

Species	Pop. nr. in reciprocal transplant exp.	Pop. nr. in sowing exp.	Coordinates	Altitude (m a.s.l.)	Locality	Habitat type
C	1	1	49°38' N, 15°54' E	610	Dářko	growth of herbaceous plants at the margins of the Nový rybník pond
C	-	2	49°23' N, 15°33' E	570	Rybník Lukáš	margins of the Lukáš rybník pond
C	-	3	48°46' N, 14°48' E	550	Veveřský rybník	margins of the Vevěřský rybník pond
C	2	4	49°04' N, 14°24' E	380	Munický rybník	margins of the Munický rybník pond
L	3	-	48°49' N, 14°20' E	460	Český Krumlov	alluvial deposit of the Vltava river
L	-	5	49°00' N, 14°50' E	430	Stará řeka	alder carr near the Dušákovský rybník pond
L	4	6	48°54' N, 14°36' E	480	Trocnov	sandy deposit of a brook
L	-	7	49°22' N, 15°35' E	520	Rančňov	margin of the meadow near the Jihlava river
L	-	8	48°52' N, 14°22' E	440	Plešovice	bank of the Vltava river
N	5	-	49°13' N, 14°04' E	430	Mladějovice	a ditch along a small road
N	6	-	48°52' N, 14°11' E	590	Střemily	a wet meadow between ponds
N	-	9	48°58' N, 14°35' E	495	Kaliště-louka	a wet meadow
N	-	10	48°57' N, 14°35' E	510	Kaliště-cesta	a woody path
N	-	11	49°19' N, 15°28' E	580	Ježdkovické rašeliniště	a small pond in the Ježdkovické rašeliniště mire
N	-	12	49°22' N, 15°33' E	580	Vysoká	overgrown wet meadow along a brook

## Appendix 2.

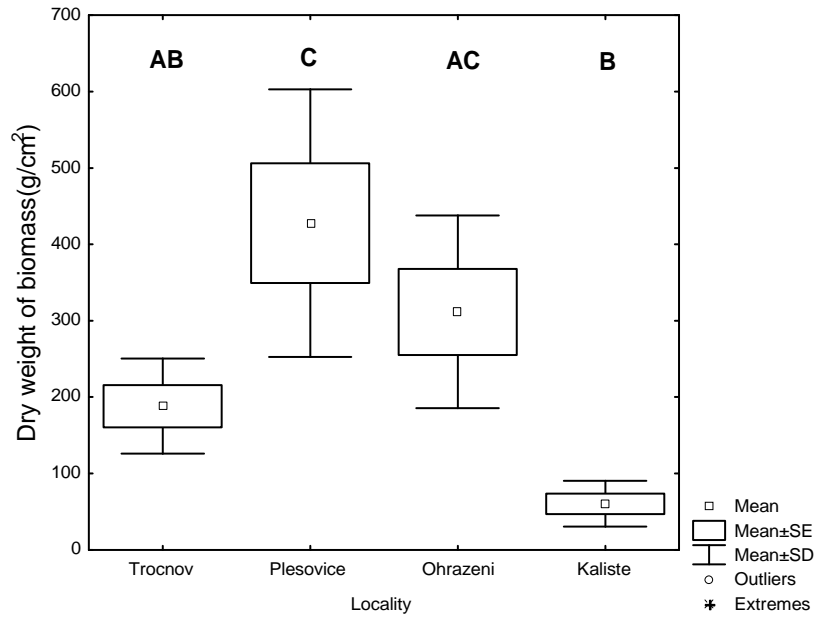
Experimental field localities for reciprocal transplant experiment and for germination experiment.

Abbreviations of species resident on each locality: C (C1; C2) - *M. caespitosa*, L (L1; L2) - *M. laxiflora*, N (N1; N2) - *M. nemorosa*.

Resident species	Locality nr. for reciprocal transplant exp.	Locality nr. for germination exp.	Coordinates	Altitude (m a.s.l.)	Locality	Habitat type	nr. of seedlings germinated from the seed bank
C	1	1	48°59' N, 14°26' E	390	C1 – Velký Vávrovský	margins of the Velký Vávrovský pond	0
C	-	2	49°00' N, 14°50' E	430	C2 – Nový spálený	margins of the Nový spálený pond	3
L	2	-	48°52' N, 14°22' E	440	L1 – Plešovice	bank of the Vltava river	-
L	-	3	48°59' N, 14°51'	430	L1 – Stará řeka	alder carr	1
L	3	4	48°54' N, 14°36' E	480	L2 - Trocnov	sandy deposit of a brook	4
N	4	5	48°57' N, 14°36' E	515	N1 - Ohrazení	a wet oligotrophic species-rich meadow	4
N	5	6	48°57' N, 14°35' E	510	N2 - Kaliště	a woody path	10

### Appendix 3.

Biomass production on field experiment localities collected in June 2004 ( $F_{3,16} = 9,74$ ;  $p < 0,001$ ).



**Appendix 4.**

Supplementary table of nutrients on experimental localities for reciprocal transplant experiment

<b>Locality nr. for reciprocal transplant experiment</b>	<b>Locality</b>	<b>Layer</b>	<b>Nitrogen %</b>	<b>Carbon %</b>
2	L1 Plešovice	surface 5 cm	0,22	3,02
2	L1 Plešovice	deaper 5 cm	0,18	2,64
3	L2 Trocnov	surface 5 cm	0,10	0,42
4	N1 Ohrazení	surface 5 cm	0,41	7,51
4	N1 Ohrazení	deaper 5 cm	0,36	5,21
5	N2 Kaliště	surface 5 cm	0,26	3,75

# CHAPTER VI

## **Comparison of community composition and site conditions between three closely related *Myosotis* species**

Eva Koutecká, Petr Koutecký & Jan Lepš  
manuscript



# Comparison of community composition and site conditions between three closely related *Myosotis* species

Eva Koutecká, Petr Koutecký & Jan Lepš

## Abstract:

The phytosociological affinities of three closely related *Myosotis* species from *M. palustris* group were compared using relevés from southern part of the Czech Republic, each of which contained at least one species from this group. Besides the basic characteristics recorded at each site, the individual sites were characterized by mean Ellenberg indicator values. Although all three species occupied wet habitats, they rarely grew together on one locality and their relevés differed considerably also in their species composition. When we compare the habitat preferences with results of our previous three experiments (germination, pot and reciprocal transplant field experiments), we can show that affinities to plant communities and some ecological characteristics of typical habitats corresponded well to important functional traits of *Myosotis* species.

*M. caespitosa* grew on exposed pond bottoms and edges and its occurrence was positively correlated with light and negatively with dense vegetation cover, which correspond to initial successional stadia of vegetation and temporality of these habitat types. It corresponds well to the fact that in our previous experiments, *M. caespitosa* was the weakest in competition and long-term survival, but the best in germinability (which was high, fast and stable over several years across various populations).

*M. palustris* subsp. *laxiflora* species was positively correlated with nutrients, negatively with light, and slightly negatively with  $E_1$  cover. It corresponds to habitat characteristics, where this species occurred: nutrient rich and soaked banks of flowing water and eutrophic alder carrs (the both shaded by tree layer but with less dense vegetation cover). This is again in accordance with our previous experiment: the species is strongly clonal, with ability to spread by aboveground stolons and belowground rhizomes, but primarily in competition free space. Germination of this species was quite high. *M. palustris* subsp. *laxiflora* probably depends mainly on fast vegetative colonization of disturbed or initial habitats. In comparison with other two species, occurrence of *M. nemorosa* was positively correlated with plant cover and negatively with moisture. Their typical habitats were meadows, mires and ditches with various moisture level and certainly denser and stable vegetation cover. It corresponds well with its traits: relatively good survival and clonal persistence even in competition (both, in the pot experiment and in the field), relatively low and slow germinability (which was slowed down by long-term flooding) and high interspecies variability in all characteristics. It seems that safe persistence of clones in a site is combined with regeneration by seeds at *M. nemorosa*.

## Keywords:

clonality, competition, experiments, intraspecific variability, traits of species

## Introduction

Understanding the relationship between the traits of species and their habitat preferences is one of the more important goals of present ecological research (Lavorel & Garnier 2002). Nevertheless, some plant species traits just come from species' "phylogenetic past" and have no or very limited direct significance for their present ecology (Silvertown & Charlesworth 2001). Closely related (sub)species are suitable objects for comparative studies and experiments in plant ecology (Krahulec 1994, Krahulec et al. 1999): because they share majority of their evolutionary history, differences in their traits are more likely caused by ecological adaptation to different habitats and environmental conditions. Comparison of habitat preferences and traits (and ecophysiology) of related species helps us to understand processes that led to their speciation.

Closely related species have been studied from various aspects, with regard to their taxonomy, (eco)physiology, ecology and phytosociology. But for full understanding of adaptation mechanisms, we need to combine field observations of species habitat and phytosociological preferences with experimental studies of their ecology. Unfortunately, such complex studies of related species are not common. There are some examples of phytosociological studies, which are combined with taxonomical and ecological research. In the morphological and phytosociological study of *Festuca varia* group (Wallossek 1999) are included also some ecological characteristics. Several comparative studies of three rare *Viola* species contain review of their taxonomy, morphology, habitat requirements, life cycle and ecology (Eckstein et al. 2004, 2006). Study of related species from *Centaurea phrygia* group (Koutecký 2007) is focused on morphology and cytology of species and is completed by phytosociological relevés and distribution data. Distribution and other ecological characteristics are mapped at two *Cerastium* species (Boscaiu et al. 1997). Other example includes comparative studies of morphology, phytosociology and distribution of two *Stellaria* species in Slovenia (Daskobler et al. 1999), which are separated on altitudinal gradient. The existing vegetation records (often stored in various vegetation databases) provide useful material for comparative studies of species phytosociology and traits, as demonstrated by Hölzel (2003) for three related *Viola* species, which were separated according to species affinities, moisture gradient and soil chemistry. Study of Hroudová et al. (1999) demonstrated for four *Bolboschoenus* species that even morphologically very similar species are considerably differentiated by their phytosociological affinities and ecological requirements. Study of Diekmann & Lawesson (1999) compared breath of niches at four pairs of closely related species with the help of phytosociological data and Ellenberg indicator values, and they found, that plants from the north Europe had widest niche in



comparison with central Europe, probably because of lower species richness and therefore lower competition.

Some comparative studies focused on pairs or group of closely related species to try to explain species' commonness/rarity. Study of two *Solidago* species (Walck et al. 2001) showed that common *S. altissima* is superior in many traits (clonality, seed production, seed bank) in comparison with rare *S. shortii*. Comparison of two *Viola* species (Moora et al. 2003) explained rarity of *V. elatior* by dependence of germination and persistence on management of grassland. Rarity of one of the pair of *Banksia* species, possessing similar ecological traits was explained by habitat specialization to a declining habitat type (Witkowski & Lamont 1997). Similarly, Rünk & Zobel (2009) demonstrated, that various growth characteristic of three closely related *Dryopteris* species help to explain their local abundance.

Closely related species have been shown to differ in reproductive strategy (Karlsson & Milberg 2008; Moravcová et al. 2001), or effects of some factor on survival, growth and reproduction (e.g. Stöcklin 1999). Special attention is also paid to plant polyploid complexes (e.g. Duchoslav et al. 2010; Flegrová & Krahulec 1999).

In the present study we focus on three taxa from *Myosotis palustris* group: *M. caespitosa* C.F.Schultz, *M. palustris* subsp. *laxiflora* (Rchb.) Schübl & Mart. and *M. nemorosa* Besser. Our previous experimental studies have shown that the three taxa differ in many traits that could influence their occurrence in natural conditions. The taxa differ in the course of germination (Koutecká & Lepš 2009), clonal growth and sensitivity to competition (Koutecká & Lepš 2011) and preference of particular micro-habitats and survival of an individual in natural communities (Koutecká & Lepš, unpublished data). In our experiments, *M. caespitosa* had the highest and fastest germination. Survival and growth of its plants were the most sensitive to competition, but some plants survived clonally till the third season with the help of daughter rosettes, although this species is considered to be annual to biennial (Grime et al. 1981; Klimešová & Klimeš 1998; Štěpánková 2000; Klotz et al. 2002). *M. palustris* subsp. *laxiflora* was obviously the most clonal species, forming rhizomes and rooting stolons and spreading for longer distances, especially in no-competitive treatments. *M. nemorosa* had relatively the best tolerance to competition: their clones survived the best at different types of localities and at all types of competitive treatments, however they spread for short distances (cca 5cm per year) mainly by short rhizomes. This species showed the highest inter-populations variability at majority characteristics at all experiments.

**The main aim of the present study** is to quantify, if ecological differences between the three closely related *Myosotis* taxa revealed by the previous experiments are reflected in their habitat preferences and phytosociological

affinity, characterized by plant community composition of their respective habitats.

## Material and methods

### *Study taxa*

In our study we focused on three taxa from *Myosotis palustris* group. In the taxonomic concept adopted in the Flora of the Czech Republic (Štěpánková 2000) they are classified as *M. caespitosa*, *M. palustris* subsp. *laxiflora* and *M. nemorosa*. They all are sufficiently common in the study area of southern Bohemia. They all prefer wet habitats (various types of wet meadows and forests and banks of running and standing waters), but rarely share a locality. Moreover, they differ in their traits such as life span, intensity of clonal growth, or seed germination.

### *Field sampling and environmental variables*

In total, 106 phytosociological relevés of the vegetation where at least one of investigated *Myosotis* species occurred were recorded in 2000–2005. There relevés were recorded in southern part of the Czech Republic in the area of ca 150 x 100 km, the altitude ranged from 340 to 650 m a. s. l.. The area of the majority of relevés was 10 m<sup>2</sup>, but some relevés at river banks or ditches had to be of smaller size 3 to 7 m<sup>2</sup> to be homogenous (i.e., to include only one vegetation type) and some relevés of species-rich meadow were recorded on larger area up to 25 m<sup>2</sup> to include the whole spectrum of plant species at a locality. Following variables were recorded at each plot: cover of individual layers, cover of open water, altitude, aspect, slope, moisture, and shading (the later two variables were estimated using 5-grade semiquantitative scale, Table 1). The species abundances were recorded using modified Braun-Blanquet scale (Westhoff & van der Maarel 1973).

The relevés are currently stored in TURBOVEG format (Hennekens & Schaminée 2001) in the Czech National Phytosociological Database (Chytrý & Rafajová 2003) under numbers 555501- 555606. The nomenclature of vascular

Table 1. Scales for variables moisture and shading used in the analyses

Variable / scale	1	2	3	4	5
Moisture	dry substrate	moderately wet substrate	very wet substrate (ground water table about at the soil surface)	partly flooded	flooded (littoral, plants growing from water)
Shading	no	less than 25%	25 - 50%	50 - 75%	more than 75%

plants follows Kubát et al. (2002).

### *Data analysis*

Mean Ellenberg indicator values (Ellenberg et al. 1992) were calculated for each relevé using Juice 7.0 software (Tichý 2002) as an unweighted average of the indicator values of the taxa present in the relevé; the three *Myosotis* taxa and taxa with undefined values were omitted from the calculation. For multivariate analyses, the covers were converted to percentages and log-transformed. Aspect was recoded so that north-facing aspects (NW – N – NE) got the value of -1, the south-facing aspects (SW – S – SE) the value of +1 and the others value of 0. From 411 taxa recorded, only those that occurred at least in 3 relevés (i.e., ca 10%) of an individual *Myosotis* species were selected. The final matrix contained 106 relevés and 211 species. All multivariate analyses were computed in CANOCO for Windows 4.5 software (ter Braak & Šmilauer 2003).

Main gradients in floristic composition were analysed using the Detrended Correspondence Analysis (DCA). For interpretation of the ordination axes, environmental variables and mean Ellenberg values were plotted into the DCA ordination diagram as supplementary variables. The direct effect of site conditions on individual *Myosotis* taxa was tested by Canonical correspondence analysis (CCA) with log-transformed covers of the *Myosotis* taxa were used as a response variables and environmental variables recorded at each site and Ellenberg indicator values (as indirect indicators of site conditions) as explanatory variables. The variables were selected by forward stepwise selection and their significance was tested using Monte Carlo permutation test (999 permutations); Bonferroni correction was applied to adjust the significance levels. Finally, the association between the three *Myosotis* taxa and other species was studied by two approaches. First, CCA was computed in which occurrence of the *Myosotis* taxa served as response variables (one variable for each taxon, the presence / absence coded as 0 / 1, in two samples with co-occurrence of two taxa the value of 0.5 was used for each of them) and log-transformed covers of all other taxa as explanatory variables. The taxa with significant relation to the occurrence of the *Myosotis* taxa were selected by forward stepwise selection, the significance was tested using Monte Carlo permutation test (999 permutations). (In fact, this analysis is a form of Linear Discriminant Analysis.) Second, the association of the accompanying species and the *Myosotis* taxa was tested using phi coefficient of fidelity; only the species for which occurrence in the particular cluster was significant at  $\alpha = 0.01$  were considered (Fisher's exact test; Chytrý et al. 2002) and the group size was standardized to equal size (Tichý & Chytrý 2006). The two relevés with occurrence of more *Myosotis* taxa were omitted. This analysis was computed using Juice 7.0.

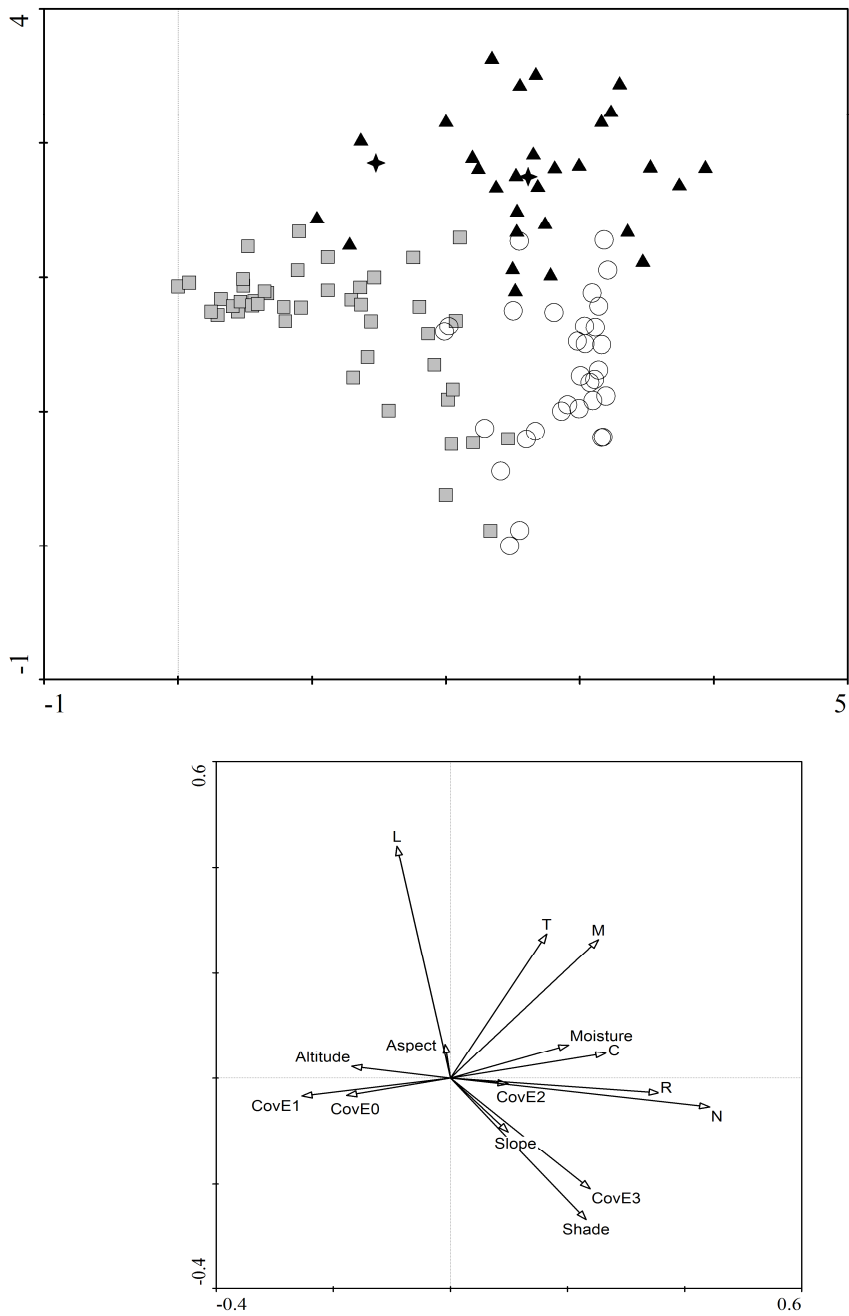


Fig. 1a: DCA analysis of 106 phytosociological relevés – position of samples (up) and supplementary environmental variables (down). The first and the second ordination axis are depicted, they explain 7.6% and 5% of variation, respectively. The relevés are marked according occurrence of the *Myosotis* taxa: triangles: *M. caespitosa*, squares: *M. nemorosa*, crosses: *M. caespitosa* + *M. nemorosa*, circles: *M. palustris* subsp. *laxiflora*.

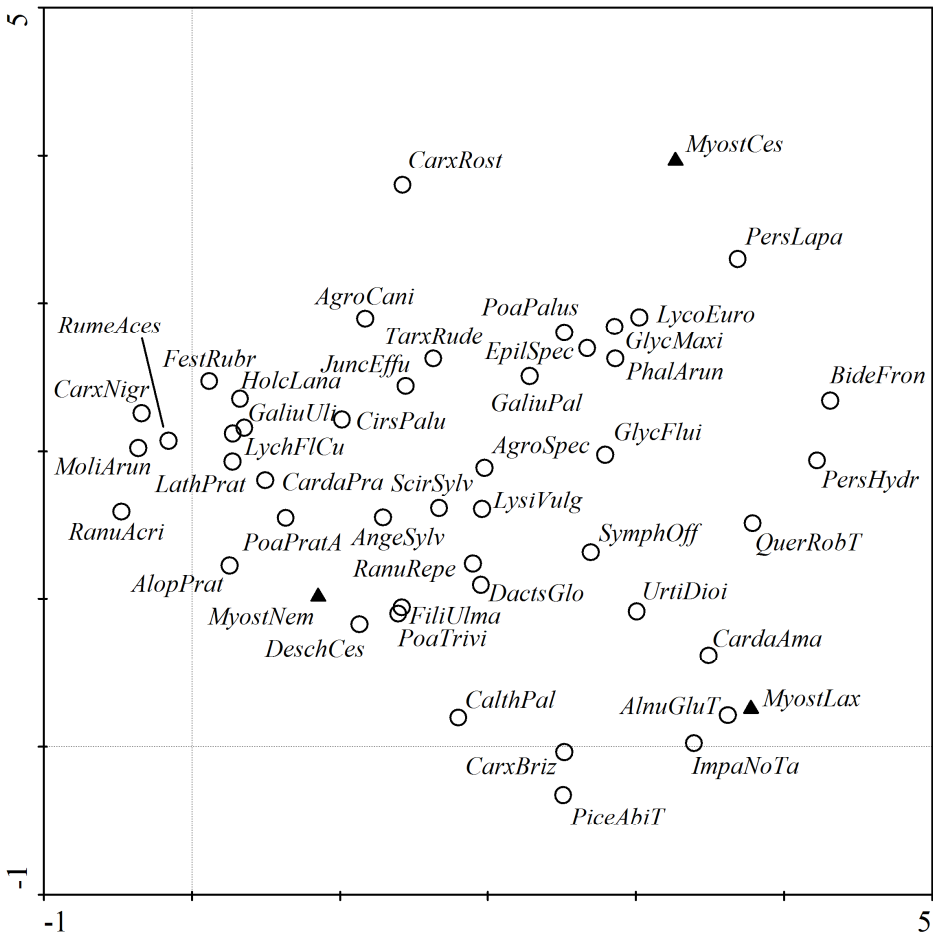


Fig. 1b: DCA analysis of 106 phytosociological relevés – position diagnostic species. The first and the second ordination axis are depicted, they explain 7.6% and 5% of variation, respectively.

## Results

Habitat differentiation of the studied species is obvious from the virtual absence of relevés with more than one of the three *Myosotis* species – only 2 relevés out of 106. Clear differentiation between the *Myosotis* species was also revealed with DCA. Samples with the individual species formed more or less distinct groups in the ordination space (Fig. 1a, 1b). The first ordination axis differentiates mainly between *M. nemorosa* and other two taxa and is correlated with variables such as altitude, moisture and cover of herb and moss layer and Ellenberg values for soil reaction and nutrients, which indicates that the main gradient leads from the nutrient poor submontane meadows (left) to various communities occupying banks of water bodies, spring areas, etc. The second

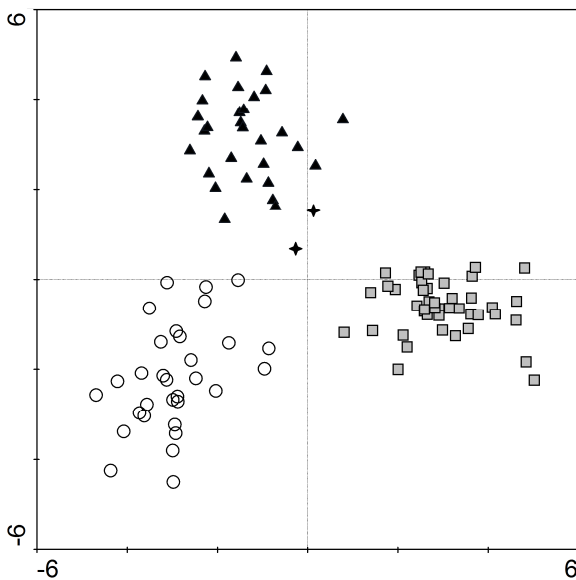


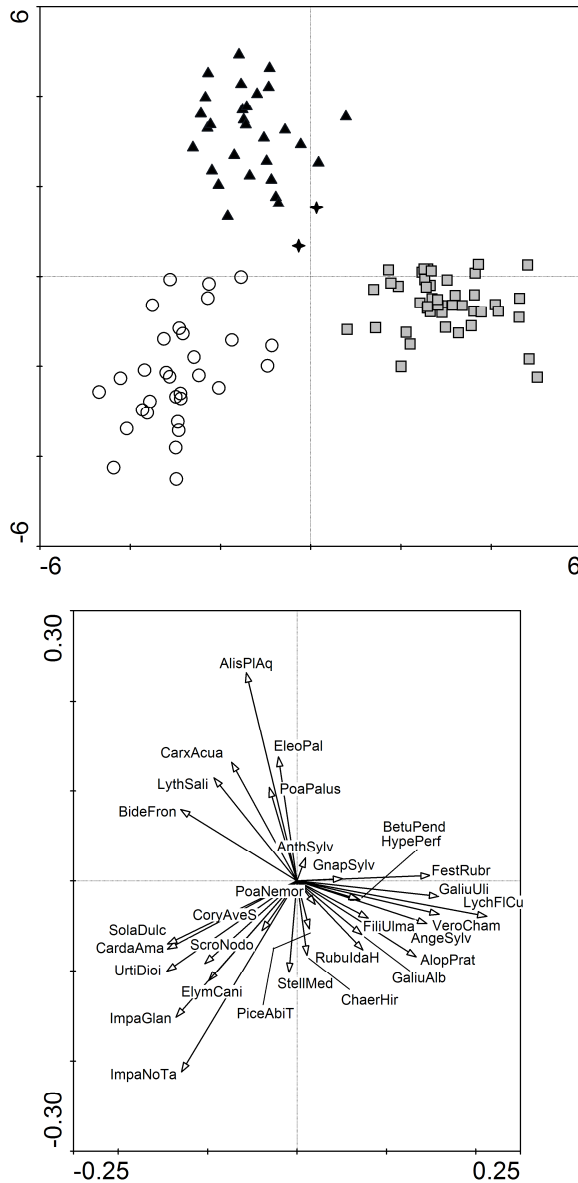
Fig. 2: CCA analysis of 106

phytosociological relevés. Cover of *Myosotis* taxa was used as the response variables, only five significant explanatory variables selected by forward selection procedure are included. The first and the second ordination axis are depicted; they explain 31.9% and 21.2% of variation, respectively. The centroids of each of *Myosotis* taxa are depicted. L – Ellenberg value for light, M – Ellenberg value for moisture, N – Ellenberg value for nutrients, CovE1 – cover of the herb layer.

axis is mainly correlated with gradient of light, from opened communities as exposed pond bottoms and banks of larger ponds (top) to alder forests (bottom).

CCA with forward selection revealed five variables, which have significant effect on abundance (i.e., cover) of the *Myosotis* taxa. They are (in descending explanatory power): Ellenberg value for nutrients, Ellenberg value for light, Ellenberg value for moisture, altitude, and cover of the herb layer. The abundance of *M. nemorosa* is positively associated with altitude and cover of the herb layer and negatively with nutrient content and moisture; the abundance of *M. palustris* subsp. *laxiflora* is positively associated with nutrients and negatively with altitude and light; the abundance of *M. caespitosa* is markedly positively associated with moisture and light and negatively with cover of the herb layer (Fig. 2).

31 species that significantly predict occurrence of the individual *Myosotis* taxa were revealed with CCA, in which the presence of the *Myosotis* taxa served as response variables and cover of other species as the explanatory variables (Fig. 3). The relevés with individual *Myosotis* taxa are well separated in the ordination space. The occurrence of *M. nemorosa* is connected mainly with meadow species, the occurrence of *M. palustris* subsp. *laxiflora* is correlated with species of eutrophic forested spring areas and stream banks, and



CCA analysis of 106 phytosociological relevés – position of samples (left) and explanatory variables (right). Presence of *Myosotis* taxa was used as the response variables and cover of other taxa as explanatory variables. The first and the second ordination axis are depicted; they explain 44.7% and 42.4% of variation, respectively. The relevés are marked according occurrence of the *Myosotis* taxa: triangles: *M. caespitosa*, squares: *M. nemorosa*, crosses: *M. caespitosa* + *M. nemorosa*, circles: *M. palustris* subsp. *laxiflora*.

the occurrence of *M. caespitosa* is predicted with an array of species occurring frequently on pond banks.

The species with highest fidelity (“diagnostic”) to the individual *Myosotis* taxa and with the highest constancy in relevés with individual

Table 2: Lists of species with phi coefficient significant at  $\alpha = 0.01$  (i.e., “diagnostic” species, shaded) and 30 species with highest constancy (i.e., occurrence in % of all relevés of the particular group) for groups of relevés defined according the occurrence of *Myosotis* taxa. Taxa that occur in more than one list are printed in bold.

<i>Myosotis caespitosa</i>			<i>Myosotis nemorosa</i>			<i>Myosotis palustris</i> subsp. <i>laxiflora</i>		
taxon	phi	constancy (%)	taxon	phi	constancy (%)	taxon	phi	constancy (%)
<i>Agrostis canina</i>		26	<b>Agrostis sp.</b>		41	<b>Agrostis sp.</b>		39
<i>Alisma plantago-aquatica</i>	0.57	45	<i>Achillea millefolium</i> agg.	0.49	41	<i>Alnus glutinosa</i>		35
<i>Alopecurus aequalis</i>	0.28	32	<i>Ajuga reptans</i>	0.28		<i>Athyrium filix-femina</i>		29
<b><i>Bidens frondosa</i></b>		32	<i>Alchemilla</i> sp.	0.36		<b><i>Bidens frondosa</i></b>		32
<i>Bidens tripartita</i>	0.27		<i>Alopecurus pratensis</i>	0.34	41	<i>Caltha palustris</i>		26
<i>Carex acuta</i>	0.35	32	<i>Angelica sylvestris</i>	0.36	52	<i>Calystegia sepium</i>	0.40	
<i>Carex bohemica</i>	0.28		<i>Anthoxanthum odoratum</i>	0.44	32	<i>Cardamine amara</i>	0.33	45
<i>Carex hirta</i>		29	<i>Betonica officinalis</i>	0.41		<i>Carex brizoides</i>	0.35	29
<i>Cirsium arvense</i>		29	<i>Bistorta major</i>	0.36		<i>Elymus caninus</i>	0.40	
<b><i>Cirsium palustre</i></b>		35	<i>Briza media</i>	0.31		<b><i>Epilobium</i> sp.</b>		52
<b><i>Deschampsia caespitosa</i></b>		32	<i>Cardamine pratensis</i>	0.46	48	<i>Festuca gigantea</i>	0.37	
<i>Echinochloa crus-galli</i>	0.34		<i>Carex nigra</i>	0.45	41	<i>Galeopsis</i> sp.		32
<i>Eleocharis acicularis</i>	0.43		<i>Carex ovalis</i>	0.34		<b><i>Galium palustre</i> s.l.</b>		55
<i>Eleocharis palustris</i> agg.	0.37		<i>Carex pallescens</i>	0.34		<i>Glyceria fluitans</i>		29
<b><i>Epilobium</i> sp.</b>	0.26	71	<i>Carex panicea</i>	0.31		<b><i>Glyceria maxima</i></b>		26
<b><i>Galium palustre</i> s.l.</b>		71	<i>Cerastium holosteoides</i> subsp. <i>triviale</i>	0.28	30	<i>Chaerophyllum hirsutum</i>	0.32	32
<b><i>Glyceria maxima</i></b>	0.28	45	<b><i>Cirsium palustre</i></b>	0.46	70	<i>Impatiens glandulifera</i>	0.52	35
<i>Iris pseudacorus</i>	0.34	29	<b><i>Deschampsia caespitosa</i></b>	0.33	61	<i>Impatiens noli-tangere</i>	0.65	68
<i>Juncus articulatus</i>	0.37	29	<b><i>Epilobium</i> sp.</b>		36	<i>Impatiens parviflora</i>	0.32	
<b><i>Juncus effusus</i></b>		42	<i>Festuca rubra</i>	0.39	45	<b><i>Juncus effusus</i></b>		42
<i>Lemna minor</i>	0.39	35	<i>Filipendula ulmaria</i>		34	<b><i>Lycopus europaeus</i></b>		58
<i>Lolium perenn</i>	0.34		<b><i>Galium boreale</i></b>	0.38		<b><i>Lysimachia vulgaris</i></b>		55
<b><i>Lycopus europaeus</i></b>	0.46	87	<b><i>Galium palustre</i> s.l.</b>		45	<i>Myosoton aquaticum</i>		29
<b><i>Lysimachia vulgaris</i></b>		58	<i>Galium uliginosum</i>	0.43	39	<i>Persicaria hydropiper</i>		35
<i>Lythrum salicaria</i>	0.29	42	<i>Hieracium</i> sp.	0.28		<b><i>Phalaris arundinacea</i></b>	0.24	58
<i>Oenanthe aquatica</i>	0.44	35	<i>Holcus lanatus</i>	0.44	55	<b><i>Poa palustris</i></b>		26
<i>Peplis portula</i>	0.30		<b><i>Juncus effusus</i></b>		66	<b><i>Ranunculus repens</i></b>		84
<i>Persicaria lapathifolia</i>	0.36	45	<i>Lathyrus pratensis</i>	0.32	45	<b><i>Rumex aquaticus</i></b>	0.40	
<b><i>Phalaris arundinacea</i></b>		48	<i>Luzula campestris</i>	0.38		<i>Rumex obtusifolius</i>		32
<b><i>Phragmites australis</i></b>	0.40		<i>Lychnis flos-cuculi</i>	0.57	66	<b><i>Scirpus sylvaticus</i></b>		39
<i>Plantago major</i>		29	<b><i>Lysimachia vulgaris</i></b>		45	<i>Scrophularia nodosa</i>	0.33	39
<b><i>Poa palustris</i></b>	0.26	52	<i>Molinia arundinacea</i>	0.34		<i>Silene dioica</i>	0.30	
<i>Polygonum aviculare</i> agg.	0.30		<i>Plantago lanceolata</i>	0.38		<i>Solanum dulcamara</i>	0.32	35
<b><i>Ranunculus repens</i></b>		52	<i>Poa pratensis</i> s.l.	0.31	30	<i>Symphytum officinale</i>	0.48	52
<i>Ranunculus sceleratus</i>	0.35		<i>Potentilla erecta</i>	0.53	45	<b><i>Urtica dioica</i></b>	0.41	42
<i>Rumex maritimus</i>	0.32		<i>Prunella vulgaris</i>	0.36		<i>Veronica beccabunga</i>	0.39	32
<i>Scutellaria galericulata</i>	0.42	45	<i>Ranunculus acris</i>	0.60	55			
<b><i>Taraxacum</i> sect.</b>		39	<i>Ranunculus auricomus</i> agg.	0.42				
<b><i>Ruderalia</i></b>			<b><i>Ranunculus repens</i></b>		68			
<i>Trifolium repens</i>		35	<i>Rumex acetosa</i>	0.59	57			
<i>Typha latifolia</i>	0.49	32	<i>Sanguisorba officinalis</i>	0.40	32			
<b><i>Urtica dioica</i></b>		42	<b><i>Scirpus sylvaticus</i></b>		36			
<i>Veronica scutellata</i>	0.34		<b><i>Taraxacum</i> sect.</b>		45			
			<b><i>Ruderalia</i></b>					
			<i>Tephrosia crispa</i>	0.34				
			<i>Trifolium pratense</i>	0.31				
			<b><i>Urtica dioica</i></b>		32			
			<i>Veronica arvensis</i>	0.33				
			<i>Veronica chamaedrys</i>	0.48	36			
			<i>Veronica serpyllifolia</i>	0.33				



*Myosotis* taxa are listed in Table 2. Similarly to other analyses, *M. caespitosa* is associated mainly with taxa of eutrophic banks of fish-ponds or of exposed pond bottoms, *M. nemorosa* is associated mainly with meadow taxa and *M. palustris* subsp. *laxiflora* with taxa of river banks or spring areas, including forested ones (*Alnus glutinosa* present).

## Discussion

Results of our phytosociological research clearly separated three investigated *Myosotis* species from *Myosotis palustris* group into different types of habitats and plant communities. We found only two localities with simultaneous occurrence of two *Myosotis* species: both the habitats were marginal parts of plant communities (edges of ponds) with *M. caespitosa* and *M. nemorosa* growing together. Affinities of individual *Myosotis* species to plant communities correspond well to their traits and ecological behaviour, ascertained by our previous experimental studies. Positive association of *M. caespitosa* with light and negative with vegetation cover corresponds well with its most pronounced negative reaction to competition, demonstrated both in the pot experiment (Koutecká & Lepš 2011) and in the field transplant experiment (Koutecká & Lepš in prep.). Moreover, the species is well adapted to the temporary habitats (fishpond bottoms) with its excellent germinability, invariably high in various populations, fast and stable over several years (Koutecká & Lepš 2009). *M. nemorosa* is positively correlated with plant cover and negatively with moisture. This corresponds to its longest life span (both, in the pot experiment and in the field, Koutecká & Lepš 2011, in prep.) and relatively low germinability and slow germination (Koutecká & Lepš 2009): in closed communities, survival of individual in vegetative state is safer strategy than regeneration from seeds. Also, its negative correlation with moisture corresponds to the fact, that this species was the only one, germination of which was slowed down by prolonged submersion. *M. palustris* subsp. *laxiflora* is positively correlated with nutrients (typically high at brook and river banks) and negatively correlated with light – the species is able to grow also in banks shaded by trees, but not in dense cover of other herbs (slight negative correlation with  $E_1$  cover). The negative reaction of this species to competition was demonstrated both, in the pot experiment (Koutecká & Lepš 2011) and in the field transplant experiment (Koutecká & Lepš in prep.). In fact, neither the Ellenberg indicator values, nor the recorded environmental characteristics capture the probably most important feature of this species – ability to colonize quickly empty space by aboveground stolons and belowground rhizomes, and also, the ability to root from small fragments of shoots that are scoured by flowing water.

In our area, the species are also differentiated along the altitudinal gradient, however, we have no traits available or experimental response that can be interpreted in the light of this differentiation. Moreover, it seems that this altitudinal differentiation is partially peculiar to the small size of study area.

*Comparison with other complex studies, where phytosociology and some traits of species were studied and compared together.*

As a matter of fact, the studies, where the differing phytosociological preferences of closely related species are directly compared with their traits are rather rare. Morphological and caryological study of *Festuca varia* group was combined with phytosociological research with supplemental recording of soil nutrients on characteristic sites of occurrence in the Alpine range (Wallossek 1999). Individual taxons were separated well morphologically, and their phytosociological affinities also differed (the syntaxonomic synthesis showed clear existence of five vicariating regional associations and one edaphically determined association, growing on ecologically different sites). Nevertheless, the relationship between the traits and habitat preferences is not straightforward here. Study of four *Bolboschoenus* taxa (Hroudová et al. 1999) demonstrated, that they are morphologically very similar, but they differ in their phytosociological affinities and ecology – have strong requirement on habitat type, especially soil chemistry. The authors expect that the ecological differentiation is connected with physiological traits.

Quite a few studies were devoted to comparative ecology of *Viola* species. Several complex comparative studies of rare *Viola* species (Eckstein & Otte 2004, Eckstein et al. 2004, 2006;) interested also in population biology of these species and influence of surrounding plant communities on them in time. Results of research demonstrated the importance of good management of habitats, which has positive effect mainly on generative traits of rare species (germination and young plants recruitment and fecundity). Another comparative study of three related *Viola* species combined their phytosociology, and environmental characteristics and traits of surrounding species using records from vegetation databases (Hölzel 2003). Study shows importance of complex studies: *Viola* species separated according to species affinities to moisture gradient and soil chemistry there, but suitability of some habitats for *Viola* survival was probably done by their disturbance (by management or flooding events), because these *Viola* species are weak competitors. Stability of habitats was estimated according to occurrence of species with individual strategy types (C-S-R) in relevés. Another group (Moora et al. 2003) compared one rare and one common *Viola* species in Estonia and they have found significant differences in some traits. They concluded that it is probably the differential sensitivity to light competition, what determined the differences in their distribution, nevertheless, they suggest also some historical reasons.

*Ecological and phytosociological differences between the three closely related Myosotis taxa based on previous experiments and on comparison of community composition and site conditions*

Among the compared species, *M. caespitosa* is a species with the shortest life span. This species is considered to be annual to biennial (Grime et al. 1981; Klimešová & Klimeš 1998; Štěpánková 2000; Klotz et al. 2002), but we have demonstrated its ability to survive longer. Persistence of this species is connected above all with generative reproduction (the highest and fastest of all the species, final percentage of germinated seeds little increased with age of seeds, Koutecká & Lepš 2009). In our three years pot experiment (Koutecká & Lepš 2011), *M. caespitosa* was the species most sensitive to competition, but few plants were able survive clonally till the third season (as daughter rosettes). In our reciprocal transplant experiment (Koutecká & Lepš in prep.) *M. caespitosa* was species with highest mortality, the most sensitive to competition, but this species produced the highest amount of secondary rosettes and shoots in gaps (in comparison with other two species) in the first season, and some clones persisted successful till the third season. Previous results correspond to *M. caespitosa* life history (annual to biennial) and habitat preferences (disturbed and short-term sites). Type of plant communities and habitat characteristics of our phytosociological relevés with *M. caespitosa* correspond well with its traits. This species occurred mainly on eutrophic pond banks and exposed pond bottoms, saturated by moisture, and with poor vegetation cover, which represent habitats with low competition and opened to light. The same sites are characterised by species, with them *M. caespitosa* occurred the most often (Table 1.): e.g. *Alisma plantago-aquatica*, *Carex acuta*, *Glyceria maxima*, *Iris pseudacorus*, *Juncus articulatus*, *Lemna minor*, *Lycopus europaeus*, *Lythrum salicaria*, *Oenanthe aquatica*, *Persicaria lapathifolia*, *Scutellaria galericulata*, *Typha latifolia*. Because these habitats have temporal character (often flooded after one season), investments into vegetative growth is useless on them. On the other site, investments into seed bank and good germination ensure to *M. caespitosa* species successfully survive.

*M. palustris* subsp. *laxiflora* is a species with strong vegetative propagation (Štěpánková 2000, Klotz et al. 2002). In our experiments (pot and transplant field) this species easily spread clonally for long distances by rhizomes and rooting stolons (Koutecká & Lepš 2011, in prep.), especially in no-competitive treatments. *M. palustris* subsp. *laxiflora* was the best survivor in pot experiment, and was very successful at different localities also in transplant experiment. Despite its fast vegetative growth, *M. palustris* subsp. *laxiflora* reacted by their clonal growth the most sensitive to competition, therefore it successfully spread in gaps, but was suppressed in competitive treatments (Koutecká & Lepš in prep.). Results of our germination experiment showed, that *M. palustris* subsp. *laxiflora* has simultaneously good germinability

(Koutecká & Lepš 2009). Strong traits of *M. palustris* subsp. *laxiflora* are connected with fast vegetative growth and clonal propagation, even for longer distances, although germinability of species is also good. Despite of clonal spreading, this species is competitively weak and looses in dense vegetation of later successional stages. It showed also our phytosociological relevés with occurrence of *M. palustris* subsp. *laxiflora*, which represented typical habitats of this species – nutrient rich banks of flowing water (saturated by moisture) with lower vegetation cover, or nutrient rich and wet soils of alder carrs. Typical species co-occurring with *M. palustris* subsp. *laxiflora* on our localities were: *Cardamine amara*, *Carex brizoides*, *Chaerophyllum hirsutum*, *Impatiens glandulifera*, *Impatiens noli-tangere*, *Phalaris arundinacea*, *Scrophularia nodosa*, *Solanum dulcamara*, *Symphytum officinale*, *Urtica dioica*, *Veronica beccabunga*. Habitats of *M. palustris* subsp. *laxiflora* species are influenced of different kind of disturbance in comparison with *M. caespitosa*, they should be splashed by flowing water and flooded for shorter period or overgrew by successional vegetation, which is a fast process in this type of nutrient rich habitats. Fragmentation of clones and regeneration from only small parts of shoots of *M. palustris* subsp. *laxiflora* is a great adaptation to spread for the long distances by flowing water.

*M. nemorosa* showed the highest among-populations variability both in germination and majority characteristics at all experiments (Koutecká & Lepš 2009, 2011, in prep.). In our germination experiment, germinability of *M. nemorosa* was variable, lowest and slowest from the three *Myosotis* species, and speed of germination slowed down by long flooding (Koutecká & Lepš 2009). In the pot experiment, *M. nemorosa* was the second most successful survivor, same as in clonal growth characteristics, and spread mainly by short rhizomes (Koutecká & Lepš 2011). In the reciprocal transplant field experiment (Koutecká & Lepš, in prep.) *M. nemorosa* was the most successful survivor. It had relatively the best tolerance to competition and adaptability to all types of competitive treatments at different types of localities, however they spread only for short distances (cca 5cm per year) mainly by short rhizomes. Results of our previous study (Chaloupecká & Lepš 2004) showed, that growth and clonality of *M. nemorosa* were suppressed by competition, whereas effect of gaps in vegetation was positive and increased with gap size. Investments into generative and vegetative reproduction were positively correlated in all treatment types. On the contrary, gaps were disadvantageous and competitive microsites safer for surviving and growth of *Myosotis* plants in chronologically later reciprocal transplant experiment (Koutecká & Lepš, in prep.) in the same locality. It demonstrates, that in consequence of temporal variability effect of microsites can vary even at the same locality. In our phytosociological relevés occurred mainly with following species: *Achillea millefolium* agg., *Alopecurus pratensis*, *Angelica sylvestris*, *Anthoxanthum odoratum*, *Cardamine pratensis*, *Carex nigra*, *Cirsium palustre*, *Deschampsia caespitosa*, *Festuca rubra*,

*Galium uliginosum*, *Holcus lanatus*, *Lathyrus pratensis*, *Lychnis flos-cuculi*, *Potentilla erecta*, *Ranunculus acris*, *Rumex acetosa*, *Sanguisorba officinalis*, *Veronica chamaedrys*. Wet meadows, mires and wet ditches prevailed as typical habitats of *M. nemorosa*, all with variable moisture level (but often dryer in comparison with habitats of the two other *Myosotis* species) and with denser and more stablee vegetation cover, probably the most competitive conditions of the three species. Good survival and clonal persistence even in competition recorded in our manipulative experiments correspond well to these types of habitat. High intraspecies variability in all characteristics studied in manipulative experiments (inclusive germination) enable to *M. nemorosa* species survive and occupy wide range of habitat types. The species is able to persist even in dense vegetation, where generative recruitment from seeds depends on occurrence of suitable microsities (influenced by spatial and temporal variability).

### Acknowledgements

The study was supported by grants GAČR 206/09/1471, MSMT 6007665801 and LC 06073.

### References

- Boscaiu M., Marhold K. & Ehrendorfer F. (1997): The *Cerastium alpinum* group (*Caryophyllaceae*) in the high mountains of Poland and Slovakia. *PHYTON-ANNALES REI BOTANICAE* 37: 1-17.
- Chaloupecká E. & Lepš J. (2004): Equivalence of competitor effects and tradeoff between vegetative multiplication and generative reproduction: case study with *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa*. *Flora* 199: 157–167.
- Chytrý & Rafajová (2003): Czech National Phytosociological database: basic statistics of the available vegetation-plot data. - *Preslia*, 75: 1-15.
- Chytrý M., Tichý L., Holt J. & Botta-Dukát J. (2002): Determination of diagnostic species with statistical fidelity measures. – *J. Veg. Sci.* 13: 79–90.
- Dakskobler I., Seliškar A. & Vreš B. (1999): *Stellaria nemorum* L. and *S. montana* Pierrat (*Caryophyllaceae*) in the Forest Communities of Slovenia. *Folia Geobot.* 34: 115-125.
- Diekmann M. & Lawesson J. E. (1999): Shifts in ecological behaviour of herbaceous forest species along a transect from northern central to north Europe. *Folia Geobot.* 34: 127-141.
- Duchoslav M., Šafářová L. & Krahulec F. (2010): Complex distribution patterns, ecology and coexistence of ploidy levels of *Allium oleraceum* (Alliaceae) in the Czech Republic. *Annals of Botany* 105: 719–735.
- Eckstein R. L., Danihelka J., Hölzel N. & Otte A. (2004): The effects of management and environmental variation on population stage structure in three river-corridor violets. *Acta Oecologica - International Journal of Ecology* 25: 83-91.
- Eckstein R. L., Hölzel N. & Danihelka J. (2006): Biological Flora of Central Europe: *Viola elatior*, *V. pumila* and *V. stagnina*. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 8: 45-66.
- Eckstein R.L. & Otte A. (2004): Evidence for consistent trait-habitat relations in two closely related violets of contiguous habitat types from a fertilisation experiment. *Flora* 199: 234-246.
- Ellenberg H., Düll R., Wirth V., Werner W. & Paulißen D. (1992). *Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa*, second ed. *Scripta Geobot.* 18, 1–258.

- Grime J. P., Mason G., Curtis A. V., Rodman J., Band S. R., Mowforth M. A. G., Neal A. M. & Shaw S. (1981): A comparative study of germination characteristics in a local flora. - J. Ecol. 69: 1017-1059.
- Hennekens & Schaminée 2001, Journal of Vegetation Science 12: 589-591.
- Hölzel N (2003): Re-assessing the ecology of rare flood-meadow violets (*Viola elatior*, *V. pumila*, *V. persicifolia*) with large phytosociological data sets. Folia Geobotanica 38: 281-298.
- Hroudová Z., Zákravský P. & Frantík T. (1999): Ecological differentiation of central European *Bolboschoenus* taxa and their relationship to plant communities. Folia geobotanica 34: 77-96.
- Klimešová J. & Klimeš L. (1998): CLOPLA1 (CLOnal PLAnts, version 1) - a database of clonal growth in plants of central Europe. –URL: [http://www.butbn.cas.cz/klimes/].
- Klotz S., Kühn I. & Durka W. (2002): BIOLFLOR – Eine Datenbank mit biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland. Bonn-Bad, Godesberg.
- Koutecká E. & Lepš J. (2009): Effect of light and moisture conditions and seed age on germination of three closely related *Myosotis* species. Folia Geobot 44: 109-130.
- Koutecká E. & Lepš J. (2011): Performance of three closely related *Myosotis* species in an experiment in which substrate quality and competition were manipulated. Preslia 83: xx–xx.
- Koutecká E. & Lepš J. in prep.: Growth and survival of three closely related *Myosotis* species in a three years transplant experiment. - [manuscript]
- Krahulec F. (1994): Clonal behaviour in closely related plants. – Folia Geobot. Phytotax. 29: 277-289.
- Krahulec F., Marhold K. & Schmid B. (1999): Ecology of closely related plant species: An introduction. Folia Geobot. 34: 1-5.
- Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner, J. & Štěpánek J. (eds.), Klíč ke květeně České republiky (Key to the flora of the Czech Republic, in Czech). Academia, Praha.
- Lavorel S. & Garnier E. (2002): Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. Funct. Ecol. 16: 545-556.
- Moora M., Söber V. & Zobel M. (2003): Responses of a rare (*Viola elatior*) and a common (*V. mirabilis*) congeneric species to different management condition in grassland—is different light competition ability responsible for different abundances? Acta Oecol. 24, 169–174.
- Rünk K. & Zobel M. (2009): Differences in post-emergence growth of three fern species could help explain their varying local abundance. – Am. Fern J. 99: 307–322.
- Silvertown J. W. & Charlesworth D. (2001): Introduction to plant population biology. Blackwell, Oxford.
- Štěpánková J. (2000): 16. *Myosotis* L. – pomněnka. - In: Slavík B. (ed.), Květena ČR 6. [Flora of the Czech Republic, vol. 6], p. 216-234, Academia, Praha.
- Štěpánková J. (2002): 14. *Myosotis* L. – pomněnka (Boraginaceae Juss.). In: Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner, J. & Štěpánek J. (eds.), Klíč ke květeně České republiky, p. 526-530. (Key to the flora of the Czech Republic, in Czech). Academia, Praha.
- ter Braak C.J.F. & Šmilauer P. (1998): CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows: Software for canonical community ordination (version 4). Microcomputer Power, Ithaca.
- Tichý L. (2002): JUICE, software for vegetation classification. – J. Veg. Sci. 13: 451–453.
- Tichý L. & Chytrý M. (2006): Statistical determination of diagnostic species for site groups of unequal size. – J. Veg. Sci. 17: 809–818.

- Walck J. L., Baskin J. M. & Baskin C. C. (2001): Why is *Solidago shortii* narrowly endemic and *S. altissima* geographically widespread? A comprehensive comparative study of biological traits. *Journal of Biogeography* 28: 1221-1237.
- Wallossek, C. 1999. The acidophilous taxa of the *Festuca varia* group in the Alps: new studies on taxonomy and phytosociology. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* 34: 47-75.
- Westhoff V. & van der Maarel E. (1973): The Braun-Blanquet approach. – In: Whittaker R. H. (ed.), *Ordination and classification of communities*, pp. 617-727, Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- Windows: Software for canonical community ordination (version 4). Microcomputer Power, Ithaca.
- Wallossek, C. 1999. The acidophilous taxa of the *Festuca varia* group in the Alps: new studies on taxonomy and phytosociology. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* 34: 47-75.
- Witkowski E. T. F. & Lamont B. B. (1997): Does the rare *Banksia goodii* have inferior vegetative, reproductive or ecological attributes compared with its widespread co-occurring relative *B. gardneri*? *Journal of Biogeography* 24: 469-482.





# **CHAPTER VII**

## **Conclusions**



## Conclusions

When we compare results of our manipulative experiments with phytosociological behaviour of the three closely related *Myosotis* species, we can conclude that the combination of species traits clearly correspond to their ecological behaviour.

In our experiments, *M. caespitosa* was the species with the shortest lifespan, highly sensitive to competition. But its germination was excellent - invariably high in various populations, fast and stable over several years. Surprisingly, in our experiment some plants of this species survived even in permanent habitats (species rich meadow and woody path), which are not their typical habitats, and even spread clonally from lateral rosettes or short stolons at least for three seasons there. Typical habitats of this species were rather short-term, opened to light and saturated by moisture, as emerged fishpond bottoms and ponds edges. All our results show, that strategy of survival of *M. caespitosa* is primarily based on production of well germinable seeds with persistent seed bank.

Our experiments confirmed that *M. palustris* subsp. *laxiflora* is species with the best developed clonal spreading forming two types of long shoots (stolons and rhizomes). Clonal propagation of this species was the most affected by the level of competition – in gaps with reduced competition it spreads really vigorously and fast, but the spreading is much reduced by competition. Simultaneously, this species has relatively good seed germinability. Typical habitats of this species were nutrient rich, saturated by moisture and with lower vegetation cover, as banks of flowing waters or alder carrs. The main strategy of *M. palustris* subsp. *laxiflora* is probably fast vegetative colonization of gaps at disturbed or initial habitats, supported by long-term dispersal by flooding water along river and brook banks, supplemented by generative propagation from seeds.

In our experiments, *M. nemorosa* was very successful in survival, especially in field localities. It had high tolerance to competition and adaptability to all types of competitive treatments at different types of localities, however the species is able to spread only for short distances (cca 5cm per year) mainly by short rhizomes. Germinability of *M. nemorosa* was the most variable, lowest and slowest from the three *Myosotis* species, and speed of germination slowed down by long flooding. Typical habitats, where *M. nemorosa* occurred, were wet meadows, mires and wet ditches, all with variable moisture level (but often dryer in comparison with habitats of the two other *Myosotis* species) and with denser and more stable vegetation cover. It seems that the strategy of *M. nemorosa* is mainly persistence in a site, even in dense vegetation, and probably also in a spot within a site, by long term survival of individuals (where the

flowering stem dies off, but the genet survives by clonal growth), together with regeneration by seeds, which depends on occurrence of suitable microsites (influenced by spatial and temporal variability).

In all our experiments we found high differences between populations within a species, which shows the importance of taking into account the intraspecific variability effect in all comparative ecological studies!

# APPENDIX

**Equivalence of competitor effects and tradeoff between vegetative multiplication and generative reproduction: case study with *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa***

Eva Chaloupecká & Jan Lepš  
Flora 199: 157–167, 2004



# Equivalence of competitor effects and trade-off between vegetative multiplication and generative reproduction: case study with *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa*

Eva Chaloupecká & Jan Lepš

## Abstract

Effects of graminoid competition and gap size on clonal growth and reproduction of two meadow species, *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa*, were studied in an oligotrophic wet meadow and in a pot experiment. In the field experiment, plant height, lateral spread, number of leaves and flowers, and clonal growth characteristics (number of secondary rosettes or shoots produced) were repeatedly measured over three seasons. In the field experiment, young plants of investigated species were transplanted into tussocks of three graminoids: *Molinia caerulea*, *Juncus effusus* and *Nardus stricta*; and into small and large gaps. The effect of all competitive tussock graminoids on the growth of both target species was negative, but not equivalent, and differed between *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa*. The species responded to graminoid competition also by changing their geometry and phenology. The positive effect of gaps on both species' clonal growth increased with gap size. Investments into generative and vegetative reproduction were negatively correlated among treatments in *Lychnis flos-cuculi* and positively correlated in *Myosotis nemorosa*. In the greenhouse experiment seedlings of *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa* were transplanted into pots with different amounts and spatial patterns of the competitive grass *Holcus lanatus*. Total density but not spatial arrangement of *Holcus lanatus* seedlings had the main competitive effect on the growth of *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa*. Vegetative growth of both species was negatively correlated with increasing competitor's density.

This chapter was published in Flora, Volume 199, Pages: 157–167.  
Published: 2004

## **Zkoumání vlivu různé intenzity konkurence a investic mezi vegetativním a generativním rozmnožováním: pokusná studie s druhy *Lychnis flos-cuculi* and *Myosotis nemorosa***

### **Abstrakt**

Bylo studováno, jaký vliv na klonální růst a reprodukci dvou lučních druhů: *Lychnis flos-cuculi* a *Myosotis nemorosa* mají různé konkurenční traviny a různě velká volná místa v porostu (se sníženou konkurencí od okolníchrostlin). V terénním pokusu byly u pokusných rostlin po tři roky opakovaně měřeny následující charakteristiky: výška rostlin, velikost jejich rozrůstání do stran, počet listů a květů, a klonální růstové charakteristiky (počet sekundárních růžic nebo výhonů). V terénním pokusu byly mladé rostliny zkoumaných druhů přesazeny do pěti různých typů mikrostanoivišť v porostu: do tří různých typů travin (druhy *Molinia caerulea*, *Juncus effusus* a *Nardus stricta*) a do menších a větších volných míst (se sníženou konkurencí) v lučním porostu. Vliv všech konkurenčních travin na sledované druhy byl negativní, ale přesto se lišil mezi druhy travin, a byly zaznamenány i rozdíly mezi reakcemi rostlin druhů *Lychnis flos-cuculi* a *Myosotis nemorosa*. Pokusné rostliny reagovaly na konkurenci také změnami ve své růstové geometrii a ve fenologii. Vliv volných prostorů v porostu na cílové rostliny byl jednoznačně pozitivní, a vzrůstal s velikostí. U druhu *Lychnis flos-cuculi* byly investice do vegetativní a generativní reprodukce mezi jednotlivými zásahy negativně korelované, zatímco u druhu *M. nemorosa* byly tyto investice korelované pozitivně. Ve skleníkovém pokusu byly semenáčky druhů *Lychnis flos-cuculi* a *Myosotis nemorosa* zasazeny do květináčů s různým množstvím a uspořádáním konkurenčního druhu *Holcus lanatus*. Na oba dva pokusné druhy měl konkurenční druh *Holcus lanatus* negativní vliv, který narůstal s jeho hustotou, ale ne s jeho uspořádáním. Vegetativní růst obou pokusných druhů byl negativně korelován s rostoucí početností rostlin konkurenta.

Zbytek této kapitoly byl uveřejněn v časopise: *Flora*, Volume 199, Pages: 157–167.  
Publikováno online: červen 2010