

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Morfologie a karyologie okruhu *Crocus heuffelianus* ve východní části střední Evropy

Bakalářská práce

Dušan Řezáč

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Forma studia: prezenční

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Bohumil Trávníček, Ph.D.

Konzultanti: RNDr. Michal Hroneš, Ph.D.; Mgr. David Horák

Olomouc

Červenec 2022

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Dušan Řezáč

Název práce: Morfologie a karyologie okruhu *Crocus heuffelianus* ve východní části střední Evropy

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Bohumil Trávníček, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2022

Abstrakt: V rodu *Crocus* hrají karyologické změny v procesu speciace velmi významnou roli. *Crocus heuffelianus* agg. zahrnuje největší množství cytotypů ze všech taxonů *Crocus* ser. *Verni*. Na našem území rostou populace dnes řazené k alotetraploidnímu cytotypu *C. discolor* ($2n = 18$), který se přirozeně vyskytuje v západní části Karpat. Na mnohých lokalitách na západním okraji areálu byl však prokazatelně vysazený a u dalších se vedou dlouholeté spory o jeho původnosti. Kromě toho se na území ČR vyskytují i další zplanělé populace náležící k této problematické sérii druhů, s nimiž může být zaměňován. Nejčastěji se jedná o *C. vernus* a *C. tommasinianus*. Cílem této práce bylo jednak zpracovat rešerši literárních zdrojů k dané tematice a dále zaznamenat morfologickou a cytologickou variabilitu známých populací a porovnat ji s dalšími druhy série *Verni* a alespoň z části tak objasnit původ zástupců okruhu *C. heuffelianus* v ČR. Výzkum probíhal celkem na deseti populacích. U všech studovaných jedinců jsem metodou průtokové cytometrie změnil velikost genomu. Metodou počítání chromozomů za pomoci klasického barvení jsem zjistil, že zkoumané populace lze rozdělit do tří cytotypů ($2n = 16, 18, 20$), což koreluje se zjištěnou velikostí genomu. Mezi těmito skupinami jsem statistickými analýzami zjistil signifikantní rozdíl ve většině sledovaných morfologických znaků. Podle zjištěných výsledků by se za původní populace mohly považovat ty, které nevykazují větší variabilitu ve velikosti genomu. Taxonomické zařazení i původnost populace rostoucí v PR Hořina (Opavsko), která jako jediná disponovala chromozomovým číslem $2n = 20$, však nadále zůstávají nevyřešené. Jisté však je, že se od ostatních populací *C. heuffelianus* agg. značně liší.

Klíčová slova: Česká republika, *Iridaceae*, polyploidie, šafrán karpatský

Počet stran: 46

Počet příloh: 2

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Dušan Řezáč

Title: Morphology and karyology of the *Crocus heuffelianus* group in the eastern part of Central Europe

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc

Supervisor: Doc. RNDr. Bohumil Trávníček, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Abstract: The genus *Crocus* is known for its karyological complexity. Changes in number of chromosomes play an important role in its evolution. One of the most intriguing taxa in respect to the number of known cytotypes is *Crocus heuffelianus* group which contains the largest number of cytotypes of all *Crocus* ser. *Verni* taxa. Western Carpathian populations of allotetraploid origin ($2n = 18$) are usually classified as *C. discolor*. Populations of this taxon grow also in the Czech Republic, although it has been suggested that many of them may be of planted or naturalised origin. In addition, there are several other taxa occurring in the Czech Republic which belong to the *C. ser. Verni* (*C. vernus*, *C. tommasinianus*) and may be confused with *C. discolor*. The aim of this thesis was to review the available literature, to record the extent of morphological and cytological variability of known populations and compare it with other species of *C. ser. Verni*, and to clarify at least partially the origin of representatives of the *C. heuffelianus* group in the Czech Republic. The research was conducted on a total of ten populations. In all studied individuals, I analysed the genome size using flow cytometry, counted chromosomes by classical staining method and measured selected morphological traits. The investigated populations can be divided into three cytotypes ($2n = 16, 18, 20$), which correlate with the determined genome sizes. Between these groups, I found a significant difference in most of the observed morphological traits. According to the obtained results, those populations that aren't so much variable in genome size could be considered as native. However, the taxonomic classification and origin of the population growing in Hořina Nature Reserve (Opava district), which was the only one with the chromosome number $2n = 20$, still remain unresolved. However, it is certain that it diverges considerably from the other studied populations of *C. heuffelianus* group.

Keywords: Carpathian saffron, Czech Republic, *Iridaceae*, polyploidy

Number of pages: 46

Number of appendices: 2

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Doc. RNDr. Bohumila Trávníčka, Ph.D. a uvedl jsem veškeré informační zdroje, z nichž jsem čerpal.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

V první řadě bych chtěl za odborné vedení, laskavý přístup a pomoc při terénních šetřeních poděkovat Bohumilu Trávníčkovi. Velký dík patří mému konzultantovi Michalovi Hronešovi za pomoc s technickými a metodickými záležitostmi a zejména jeho trpělivost a ochotu mi pomoci s čímkoliv, co se zrovna naskytlo. Za užitečné rady děkuji též Davidu Horákovi. Nemohu vynechat ani Františka Lamlu a Alenu Uvírovou, kterým rovněž dlužím dík za pomocnou ruku při práci v terénu. Veronice Kalníkové děkuji za poskytnutí cenné informace o jedné z lokalit, na kterou bych bez jejího přičinění vůbec nepřišel. V neposlední řadě dlužím poděkování svým skvělým rodičům, kteří mě v mém úsilí maximálně podporovali a nakonec každému, kdo mi, byť jen jediným slovem, poskytl psychickou oporu, která mě postrčila zas o kousek dál.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíle práce	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Rod <i>Crocus</i> L.	3
3.1.1 Morfologická charakteristika	3
3.1.2 Životní cyklus.....	5
3.1.3 Taxonomie.....	5
3.1.4 Karyologie a hybridizace.....	6
3.1.5 Rozšíření.....	6
3.2 <i>Crocus</i> series <i>Verni</i> B. Mathew.....	7
3.2.1 Taxonomie.....	7
3.2.2 Rozšíření.....	7
3.2.3 Karyologie.....	7
3.3 <i>Crocus heuffelianus</i> Herb.....	8
3.3.1 Taxonomie.....	8
3.3.2 Morfologie.....	8
3.3.3 Ekologie	9
3.3.4 Rozšíření.....	9
3.3.5 Výskyt v ČR.....	9
3.3.6 <i>Crocus discolor</i> Reuss.....	10
3.3.7 <i>Crocus vittatus</i> Schloesser et Vukotinović	11
3.3.8 <i>Crocus bertiscensis</i> Raca, Harpke, Shuka et Randjel.....	11
3.3.9 Jiné cytotypy	11
3.4 <i>Crocus tommasinianus</i> Herb.	11
4 Materiál a metody.....	12
4.1 Sběr dat a materiálu.....	12
4.2 Morfometrická analýza	13
4.3 Měření velikosti genomu metodou průtokové cytometrie.....	15
4.4 Stanovení počtu chromozomů	15
4.5 Statistické vyhodnocení.....	16
5 Výsledky	16
5.1 Karyologické šetření	16
5.2 Variabilita morfologických znaků.....	19
5.2.1 Analýza variance (ANOVA)	19
5.2.2 Kvalitativní znaky	29
5.2.3 Mnohorozměrné analýzy	33
6 Diskuse.....	38
6.1 Karyologie studovaných populací	38
6.2 Morfologie studovaných populací.....	39
7 Závěr	42
8 Literatura	44
Příloha 1:	47
Příloha 2	48

1 Úvod

S rozvojem moderních biosystematických metod v rodu *Crocus* L. neustále roste počet nově popsaných druhů, neboť jsou odhalovány hlubší souvislosti v jejich příbuzenských vztazích. Ukázalo se také, že zde v procesu rychlé speciace hraje podstatnou roli polyploidizace a s ní související dysploidizace (Goldblatt et Takei 1997, Harpke et al. 2014, Harpke et al. 2013, Rudall et al. 1984). Jedna z nejčastěji studovaných skupin v tomto rodu je komplex druhů *Crocus* ser. *Verni* Mathew (náleží do sect. *Crocus*), do které se podle nejnovějších studií řadí celkem 10 druhů: *C. vernus* (L.) Hill, *C. heuffelianus* Herb., *C. neglectus* Peruzzi et Carta, *C. neapolitanus* (Ker Gawl.) Loisel, *C. siculus* Tin., *C. ilvensis* Peruzzi et Carta, *C. kosanini* Pulević, *C. etruscus* Parl., *C. tommasinianus* Herb. a *C. longiflorus* Raf. (Harpke et al. 2014). Ze všech těchto druhů disponuje největší morfologickou i cytologickou variabilitou *C. heuffelianus*, který je široce rozšířený od severu Balkánského poloostrova, přes Jadran a většinu Karpat až po jižní Polsko (Rukšans 2017). Jeho taxonomické vymezení nebylo dosud plně objasněno. Někteří autoři jej stále uvádějí jako jeden variabilní druh (Harpke et al. 2014), jiní tvrdí, že by se mohlo jednat dokonce o komplex druhů (Mosolygó-I et al. 2016, Raca et al. 2019). Dosud bylo zjištěno celkem sedm cytotypů $2n = 10, 12, 18, 19, 20, 22$ a 23 (Raca et al. 2020). Nejrozšířenější jsou populace cytotypu $2n = 18$, v rámci kterého byly dosud rozlišeny dva taxony *C. discolor* Reuss a *C. vittatus* Schlosser et Vukotinović. O obou se spekuluje jako o alotetraploidech, kteří vznikli paralelně ze stejných rodičovských druhů (Mosolygó-I et al. 2016). Na území ČR se vyskytuje právě *C. discolor*, jehož areál výskytu k nám zasahuje ze Slovenska, kde se nachází jádro jeho rozšíření (Májovský et al. 1990). Nejstarší známá izolovaná populace řazená tradičně k *C. heuffelianus* (s. lat.) roste na Opavsku v PR Hořina. Těžiště výskytu tohoto kriticky ohroženého druhu naší květeny (Grulich 2017) se však nachází v CHKO Beskydy (Popelářová et al. 2011). Na mnohých místech republiky byl uměle vysazen a zplaňuje, a tak vešly v pochybnost o původu i všechny ostatní lokality (Májovský et al. 1990, Popelářová et al. 2011). Poměrně často se na našem území pěstuje a zplaňuje i velmi blízce příbuzný *C. tommasinianus* (Kulichová 2017). Studium obou těchto taxonů bylo hlavním předmětem této práce.

2 Cíle práce

- Srovnání morfologické variability mezi populacemi *Crocus heuffelianus* a některých jemu příbuzných taxonů v České republice.
- Zjištění velikosti genomu studovaných populací metodou průtokové cytometrie.
- Určení počtu chromozomů studovaných populací.
- Hledání korelací mezi morfologickými a karyologickými vlastnostmi jednotlivých studovaných populací.
- Odhad původnosti tohoto taxonu alespoň na některých lokalitách.

3 Literární rešerše

3.1 Rod *Crocus* L.

3.1.1 Morfologická charakteristika

Do rodu šafrán (*Crocus*) řadíme vytrvalé jednoděložné rostliny z čeledi kosatcovité (*Iridaceae* Juss.). Jde o rostliny malého vzrůstu s květy relativně velkými v poměru k celkové velikosti a nenápadnými listy. Obvykle bývá více než polovina délky rostliny skryta pod zemí. Klidové období přečkávají v podobě okrouhlé, zploštělé kulovité hlízy stonkového původu. Šířka tohoto orgánu bývá variabilnější než výška a tyto rozměry nezávisí na velikosti květu (Kerndorff et al. 2015). V juvenilní fázi má asymetrický tvar. Nad každou starou hlízou je již vytvořen pupen pro vytvoření nové. U některých druhů je známá tvorba odnoží z laterálních pupenů hlízy, u jiných se může hlavní pupen zmnožit a dochází tak k vegetativnímu rozmnožování. Ve spodní části hlízy je vytvořen bazální disk, z jehož obvodu vyrůstají kořeny. Ty jsou zpravidla nevětvené, ale existují výjimky (*C. veluchensis* Herb., *C. vernus*). Na každé nové hlíze vyrůstají tzv. kontraktilní kořeny. Jedná se o dočasný orgán bohatý na škrob, který se koncem vegetační sezóny smrští při transportu živin do hlízy a zatlačí ji tak hlouběji do půdy (Kerndorf et al. 2015, Rukšāns 2017).

Povrch hlízy kryje tunika tvořená základy listů a katafylů z předešlé vegetační sezóny. Podle morfologické stavby ji můžeme rozdělit na fibrózní (vláknitou) a nefibrózní. Nefibrózní typ tuniky je charakteristický pro sekci *Nudiscapus* Mathew, ale vyvinul se i paralelně v některých sériích sekce *Crocus* Mathew. U mnohých druhů lze na tunice nalézt tzv. bazální prstence, jejichž přítomnost nebo i délku jejich zoubků lze využít jako významný taxonomický znak. Fibrózní tunika může být složená z paralelně propojených vláken nebo mohou být vlákna síťnatě uspořádaná. U některých druhů tvoří většinu tuniky paralelní uspořádání vláken, které však u vrcholu může přecházet v síťnaté. Pro výzkumné účely lze měřit tloušťku vlákna nebo v případě síťnaté tuniky vzdálenost mezi vlákny (Kerndorf et al. 2015, Rukšāns 2017,).

Stonek je značně zkrácený a podzemní. Tvoří ho pouze květní stopka (pedicel). Listy jsou čárkovité se středovým bílým pruhem tvořeným parenchymatickými buňkami bez chloroplastů (Raca et al. 2019). Ve spodní části se středem táhne podélný kýl, tvořený obvykle dvěma většími cévními svazky (Rudall et Mathew 1990). Okraje listu mohou být podvinuté a mezi okrajem a kýlem v oblasti laterálních žlábků se mohou vyskytovat tenká žebra tvořená cévními svazky, jejichž počet a rozmístění se používá jako determinační znak mnohých druhů. Listy se morfologicky mezidruhově odlišují barvou, šířkou bílého pruhu nebo jeho poměrem k celkové šířce a anatomickými zvláštnostmi na příčném řezu. Mnohé taxony se mohou lišit délkou listu v době květu, kdy mohou dosahovat květenství nebo mohou vyrůstat až po odkvětu. U všech druhů bez výjimky se však po odkvětu značně prodlužují. Jejich rozšířené báze z části utváří tuniku podzemní hlízy, a proto její struktura koreluje se strukturou listů (Chrtek 2010, Kerndorff et al. 2015, Rukšāns 2017).

Listy ve spodní části obklopují šupinovité, průsvitné katafily, které také chrání vyvíjející se květ. V rámci rodu jich bývá 3–6. Jejich rozšířené báze spolu s pravými listy tvoří tuniku hlízy. Mezi druhy jsou variabilní zbarvením, některé mohou být jemně skvrnitě či s výraznými

žilkami. U některých druhů se barva katafylů mění s věkem, listy kryjí vždy v uspořádání od nejdelšího po nejkratší směrem zevnitř ven. Dalšími listovými útvary v rodu *Crocus* jsou listen a listence. Obojí představuje pouze blanité průsvitné orgány bez asimilační funkce. Listen vyrůstá z báze květní stopky a má tvar blanité trubice, která ho obklopuje. Listence, pokud jsou přítomny, vyrůstají na bázi semeníku a kryjí dolní část okvětní trubky. Druhy se dvěma listenci nazýváme difylózní a druhy, které mají pouze jeden, monofylózní (Kerndorff et al. 2015, Rukšāns 2017).

Okvětní trubka je většinou odspoda světlá a směrem k horní části nabývá barva na intenzitě. Její ústí z vnitřní strany je buďto lysé nebo pokryté jemnými chloupky při bázích nitek. Podle tohoto znaku byl rod kdysi rozdělen na sekce *Piligeri* Haworth a *Depilati* Haworth. Květy vyrůstají převážně po jednom, vzácně po dvou až třech. Jsou oboupohlavné, pravidelné, nálevkovité, okvětní cípky jsou podlouhle obkopynaté, eliptické až obvejčité eliptické, uspořádané ve dvou kruzích po třech. Vnější cípky bývají delší než vnitřní a ty zase bývají širší. Jsou tvořeny třemi vrstvami buněk, což způsobuje rozdílnou intenzitu kresby z vnější a vnitřní strany. Kresba sestává z proužků či skvrn. Z hlediska tvaru, velikosti i barvy jsou okvětní cípky někdy velice variabilní i v rámci jedné populace. Významným měřitelným znakem bývá poměr jejich šířky a délky (Chrtěk 2010, Kerndorff et al. 2015, Rukšāns 2017).

Tři tyčinky přirůstají nitkou k bázi vnějších okvětních cípů. Všechny její části se často mezi druhy liší barvou, tvarem a velikostí. Prašníky mají vždy šípovitý tvar, nicméně mohou mezi druhy být variabilní ve tvaru špičky a bazálních laloků. Většinou pukají směrem ven od středové osy květu (tj. extrorzně). Pouze u *C. banaticus* J. Gay se objevují prašníky, které se otevírají směrem dovnitř ke středové ose (introrzně). Tento znak byl dříve považován za důvod zařazovat tento taxon do vlastního podrodu *Crociris* Mathew. Pylová zrna jsou většinou kulovitá a u přibližně poloviny druhů mají pouze papilózní povrch. Zbývající druhy mají lysá neperforovaná nebo spiraperturovaná zrna (Kerndorff et al. 2015, Rukšāns 2017).

Čnělka přechází v nálevkovitá a současně vějířkovitá bliznová ramena. Podle typů jejího větvení byl kdysi rod rozdělován do tří sekcí (Maw 1886). Do sekce *Holostigma* Baker patřily druhy s čnělkou rozdělenou do tří krátkých větví. Sekce *Odontostigma* Baker sdružovala taxony se zubatou, mělce dělenou čnělkou a do sekce *Schizostigma* Baker se řadily druhy s hluboce dělenou a bohatě větvenou čnělkou. Nejčastějším typem je větvení do tří hlavních ramen. Významným taxonomickým znakem je také umístění přechodu v bliznová ramena. Tento bod se pohybuje od úrovně bází nitek a výše. Velký význam hraje také poloha vrcholů bliznových ramen vůči tyčinkám, kdy mohou dosahovat stejné úrovně jako tyčinky, mohou být kratší nebo je vysoce převyšovat. Kromě těchto morfologických znaků je tento orgán variabilní i v barvě (Rukšāns 2017).

Semeník je trojpouzdrý, v době květu obvykle podzemní. Po oplození se postupně mění v tobolku, jejíž morfologie se může mezidruhově lišit a je variabilní i v poloze vůči povrchu půdy. Většinou bývá v úrovni půdního povrchu, ale existují i druhy, jejichž plodní stopka vynese tobolku i několik centimetrů vysoko. Na druhé straně jsou druhy, u nichž zůstává plod zčásti skrytý pod zemí. Semena jsou široce vejcovitá až kulovitá s poutcem (raphe) a masíčkem (carunculus). V jednom pouzdru tobolky jsou uspořádána ve dvou řadách. Jejich počet závisí

na druhu a úspěšnosti opylení. Systematický význam mají čtyři makroskopické parametry semen, a to jejich tvar a barva, tvar a pozice poutce a přítomnost karunkuly. Významnější jsou však mikrostruktury testy (Chrtek 2010, Kerndorff et al. 2015, Rukšāns 2017).

3.1.2 Životní cyklus

Semena na podzim kvetoucích druhů klíčí v září až listopadu. V případě jarních druhů je klíčení závislé na počasí a stanovišti. Semena prodělávají jedno nebo i víceletou dormanci (Kerndorff et al. 2015). V juvenilní fázi mají rostliny protáhlou asymetrickou hlízu a pouze jeden asimilující list. Postup do generativní fáze trvá 3–5 let (Kerndorff et al. 2015). Během této doby je hlíza zanesena hlouběji pod povrch pomocí kontraktálních kořenů (viz výše). Nadzemní část setrvává každoročně asi tři měsíce (Mihaly et Cricsfalusy 1997). Nový kořenový systém spolu s obnovující se hlízou se tvoří na podzim. Výjimku představují na podzim kvetoucí druhy, které asimilují na jaře a hlízu vytváří v první polovině vegetační sezóny. Doba květu se s druhem, nadmořskou výškou i zeměpisnou šířkou mění. Některé druhy květu na jaře, jiné na podzim. U vysokohorských podzimních druhů vyrůstají listy až na jaře následujícího roku. Takové druhy nazýváme hysterantní. Opačný případ představují druhy synantní, které vyhánějí listy společně s květy. Patří sem horské rostliny kvetoucí na jaře nebo podzimní druhy rostoucí v nižších polohách. Květy se obvykle otevírají po vzrůstu teploty na 15 °C. Dalším faktorem řídícím otevírání květů je světlo. Za husté oblačnosti a v noci zůstávají květy zavřené (Kerndorff et al. 2015). Opylení probíhá entomogamicky a jeho úspěšnost závisí na velmi krátké době kvetení, které na jeden květ připadá v řádu pouhých několika dnů. Mihaly et Cricsfalusy (1997) uvádějí 5–8 dní. Tobolka se vyvíjí pod zemí a následně je prodlužující se květní stopkou vynesena nad povrch. Rozmnožování pomocí semen silně převažuje nad vzácným vegetativním množením (pomocí hlíz) a je klíčové pro zachování populace. Za optimálních podmínek činí minimální délka života 15 let (Popelářová et al. 2011)

3.1.3 Taxonomie

Mathew (1982) ve své revizi rodu pojednává o 81 druzích. Petersen et al. (2008) již uvádí 88 druhů. S příchodem molekulárních metod a úpravou druhového konceptu počet druhů v rodu *Crocus* výrazně vzrostl. Nejnovější studie hovoří o cca 160 druzích (Harpke et al. 2014) a počet neustále roste. Mathew (1982) vymezuje dva podrody *Crocus* a *Crociris* Mathew. Podrod *Crociris* zahrnuje pouze jediný druh *C. banaticus*. Od ostatních taxonů se odlišuje dovnitř se otevírajícími (introrzními) prašníky, dále pak mnohem menšími vnitřními okvětními cípy ve srovnání s vnějšími. Podrod *Crocus* se v jeho pojetí dále dělí na sekce *Crocus* a *Nudiscapus* Mathew podle prezence či absence listenu. Uvnitř obou těchto skupin dohromady popisuje celkem 15 sérií. Šest z nich (včetně ser. *Verni*) řadí pod sekci *Crocus* a devět k sekci *Nudiscapus*. Nové fylogenetické analýzy založené na molekulárních markerech chloroplastové či jaderné DNA toto rozdělení zčásti vyvrátily. Petersen et al. (2008) zjistil, že *C. banaticus* náleží do sekce *Crocus* a jeho nejbližším příbuzným je *C. malyi* Vis. Výše uvedené morfologické odlišnosti *C. banaticus* si tak autoři vysvětlují jako autapomorfie tohoto druhu. Jejich zjištění částečně potvrzují i Harpke et al. (2013). Jejich výsledky také naznačují, že by sekce *Nudiscapus* mohla mít alopolyloidní původ. Některé druhy, které autoři zařadili do

sekce *Crocus*, sice nemají listen, ale takové případy se dají vysvětlit jeho sekundární ztrátou. Pokud vezmeme v úvahu toto vymezení, jsou obě sekce sice monofyletické, ale nedají se jednoznačně morfologicky rozlišit. Ve stejné studii autoři také zaznamenali, že na podzim kvetoucí druhy ve fylogenetické analýze často spadnou do kládu jarních druhů. Typickým příkladem je *C. longiflorus* Raf., řazený nově k sérii *Verni* místo původní série *Longiflori* Mathew.

3.1.4 Karyologie a hybridizace

V rodu *Crocus* nacházíme velmi vysoké rozpětí chromozomových počtů $2n = 6-70$ (Harpke et al. 2013). Za hlavní důvod takové variability je považovaná polyploidizace a s ní související dysploidizace, což jsou také hlavní mechanismy přispívající k rychlé speciaci v rodu. V důsledku tvorby neredukovaných gamet dochází k autopolyploidizaci a často také ke sterilitě jedinců. Díky dlouhověkosti těchto rostlin se ale tyto aberace mohou uchovat a časem dochází k dysploidizaci, kterou se rostlina brání problémům při meioze vzniklých polyploidizací. Většinou se jedná o Robertsonovské fúze, ale i štěpení chromozomů, při kterém vznikají nadpočetné B-chromozomy, ale velikost genomu se nemění. B-chromozomy byly nalezeny u šesti druhů včetně *C. mathewii* Kernd. et Pasche ($2n = 70$), u něhož jich bylo zaznamenáno dokonce 11 (Rudall et al. 1984, Harpke et al. 2013).

Díky výše zmíněným mechanismům se chromozomová čísla mohou lišit i mezi blízkými příbuznými taxony nebo dokonce i uvnitř druhu. Je proto velmi obtížné určit základní chromozomové číslo pro celý rod. Goldblatt et Takei (1997) uvádí jako možné základní číslo $x = 6$, které však může být v důsledku dysploidizace sníženo až na 3.

Brighton (1976) uvádí, že hybridizace bez změny ploidie je v rámci celého rodu vzácná a jejím výsledkem bývají sterilní jedinci se zvláštními chromozomovými čísly. Ve své karyologické studii zmiňuje hybridního jedince mezi *C. vernus* ($2n = 8$) a *C. heuffelianus* ($2n = 18$) z Rakouska a severní Jugoslávie s chromozomovým číslem $2n = 13$. Ve studii Harpke et al. (2014) píší, že hybridizace probíhá pouze v komplexu druhů *C. vernus*, kam podle tohoto zdroje spadá *C. heuffelianus*, *C. neapolitanus*, *C. neglectus*, *C. siculus* a *C. vernus* s. str.

3.1.5 Rozšíření

Rod *Crocus* je rozšířen od západní Evropy a severní Afriky přes jihozápadní Asii až po západní Čínu. Za centrum druhové diverzity se považuje Turecko a Balkánský poloostrov (Petersen et al. 2008, Rukšāns 2017).

V České republice najdeme více dílčích populací druhů *C. vernus* a *C. heuffelianus* (s. lat.). O přirozenosti výskytu alespoň některých lokalit obou druhů se dodnes vedou spory (Chrtěk 2010). Kulichová (2017) uvádí také druh *C. tommasinianus* Herb., u něhož je evidována jediná lokalita v NPR Babiččino údolí u České Skalice. Tato populace je však zplaněním z pěstovaných jedinců. Tento druh se přirozeně vyskytuje v oblasti bývalé Jugoslávie a severu Balkánského poloostrova (Rukšāns 2017). Mezi další druhy, které místy zplaňují a vytvářejí větší populace, patří *C. chrysanthus* (Herb.) Herb. a *C. flavus* Weston, jejichž původní areál výskytu leží v jihovýchodní Evropě a Turecku. Dříve byl u nás pěstován

jako léčivá rostlina, koření či barvivo *C. sativus* L. a objevovaly se zplanělé populace. V současné době se v severních Čechách vyskytuje několik zplanělých populací pěstovaných kultivarů *C. vernus* agg. U těchto rostlin bylo zjištěno chromozomové číslo $2n = 4x = 32$. Pozorována byla dokonce aneuploidie (Chrtek 2010).

3.2 *Crocus* series *Verni* B. Mathew

3.2.1 Taxonomie

Tato taxonomicky komplikovaná skupina prošla mnoha intenzivními revizemi. Brighton (1976) rozlišuje pět taxonů v okruhu *C. vernus*: poddruhy *C. vernus* subsp. *vernus* a *C. vernus* subsp. *albiflorus* (Kit.) Ces., dále druhy *C. neapolitanus*, *C. heuffelianus* a *C. scopusiensis* Rehman et Wołoszczak. Zmiňuje také *C. siculus*, který však ztotožňuje s *C. vernus* subsp. *vernus*. Změnu v taxonomickém chápání skupiny přinesli až Peruzzi et al. (2013), kteří provedli lektotypifikaci jmen rostlin dříve označovaných jako *C. sativus* var. *vernus* L. a *C. albiflorus*. Ta shrnuje pod jednotné označení *C. vernus*. Autoři dále ukazují, že rostlinám, pro které bylo do té doby chybně používáno jméno *C. vernus* (subsp. *vernus*), přísluší správně označení *C. neapolitanus*.

Karyologická studie Májovského et al. (1990) se zabývala zejména na Slovensku rostoucími populacemi rodu *Crocus*, ale ze svých výsledků došli k názoru, že by se celá série mohla dělit na dvě podskupiny podle základního chromozomového čísla. Do subseries *Verni* se základním číslem $x = 4$ řadí druhy, jejichž oblast původu leží zřejmě na Apeninském poloostrově pod Alpami. Jedná se o *C. vernus* ($2n = 8$) a *C. neapolitanus* ($2n = 16$). Řadí sem však i údajné hypotetraploidy z okruhu *C. heuffelianus* ($2n = 18$ a 22) z oblasti Balkánského poloostrova. Subseries *Carpathicolae* Májovský se základním číslem $x = 5$ zahrnuje pouze dva druhy – starší diploidní *C. heuffelianus* s. str. ($2n = 10$) a hypotetraploida *C. discolor* ($2n = 18$). Tyto dvě subsérie se podle uvedených autorů liší i v morfologické struktuře testy.

Jedna z posledních prací (Harpke et al. 2014) zahrnuje do série *Verni* celkem deset druhů včetně nově popsaného alotetraploidního druhu *C. neglectus*. Jako další druhy uvádí *C. vernus*, *C. heuffelianus* s. lat., *C. neapolitanus*, *C. siculus*, *C. tommasinianus*, *C. etruscus*, *C. ilvensis* a *C. kosanini*. Po analýze fylogenetického stromu zjistili, že pod tuto sérii spadá i na podzim kvetoucí *C. longiflorus*, který byl dříve řazen do samostatné série *Longiflori*. Zároveň byl ze ser. *Verni* vyřazený dříve uváděný *C. baytopiorum* B. Mathew.

3.2.2 Rozšíření

Série *Verni* je rozšířená od Pyrenejského poloostrova se západní hranicí v Portugalsku. Severní hranici výskytu tvoří Polsko a jižní hranici ostrov Sicílie s endemickým *C. siculus* (Brighton 1976). Na východ sahá areál až do západního Ruska. Za centrum diverzity se, stejně jako zčásti i pro celý rod *Crocus*, považuje Balkánský poloostrov (Raca et al. 2019).

3.2.3 Karyologie

V evoluci série *Verni* sehrála v minulosti značnou roli polyploidizace a dysploidizace (Harpke et al. 2014, Mosolygó-I et al. 2016). Svědčí o tom i široké rozpětí chromozomových čísel $2n = 8–23$. Objevuje se několik případů alopolyplodie. Například Harpke et al. (2014) na základě studia morfologie a haplotypů chloroplastové DNA popisují nový druh *C. neglectus*

($2n = 16$). Ve své studii ho zaznamenal již Brighton (1976). Ten ale píše, že je morfologicky těžce odlišitelný od *C. neapolitanus* ($2n = 8$), z něhož vzešel, a proto považoval za vhodné tyto dva taxony neoddělovat jako samostatné druhy. Harpke (2014) ale odůvodňuje klasifikaci do samostatných druhů na základě odlišnosti některých morfologických znaků, a to zejména šířky vláken na podzemních hlízách a hloubky zářezů mezi větvemi blizny. Oba tyto znaky dosahují u *C. neglectus* vyšších hodnot. Za druhý rodičovský taxon druhu *C. neglectus* považuje *C. ilvensis*, který je sice endemickým druhem ostrova Elba, avšak v minulosti mohly být areály v sympatrii. Za další alotetraploidní taxony jsou považovány *C. discolor* ($2n = 18$) a *C. vittatus* ($2n = 18$; Mosolygó-I et al. 2016). Stejní autoři vyslovili také hypotézu o alotetraploidním původu *C. tommasinianus* ($2n = 16$). Rodičovské taxony však ze svých dat nebyli schopni určit. Tento druh použili pouze jakožto sesterský taxon pro srovnání s cílovým okruhem *C. heuffelianus*.

3.3 *Crocus heuffelianus* Herb.

3.3.1 Taxonomie

V širším pojetí se jedná o morfologicky i karyologicky nejvariabilnější taxon ze série *Verni*. Dosud bylo zaznamenáno sedm cytotypů $2n = 10, 12, 18, 19, 20, 22, 23$ (Brighton 1976, Harpke et al. 2014, Mosolygó-I et al. 2016). Nejrozšířenějším je $2n = 18$ (Brighton 1976), pod který spadají alotetraploidní populace označované některými autory jako samostatné druhy *C. discolor* a *C. vittatus* (Májovský et al. 1990, Mosolygó-I et al. 2016). Velké množství cytotypů odůvodňují Mosolygó-I et al. (2016) jako možný důsledek neustále probíhající introgrese mezi alotetraploidním *C. vittatus* ($2n = 18$) a diploidním *C. vernus* ($2n = 8$). Brighton (1976) uvádí, že populace z okruhu *C. heuffelianus* rostou spíše v nižších polohách a *C. vernus* je spíše vysokohorský. V určité zóně však může docházet k překryvu a následné hybridizaci, která způsobuje vznik alopolyplodních populací.

3.3.2 Morfologie

Pro tento okruh (*C. heuffelianus* s. lat.) je typická kulovitá mírně zploštělá hlíza s fibrózní tunikou na vrcholu slabě síťnatou. Šířka hlízy se pohybuje mezi 9,8–12,0 mm a výška 7,4–11,0 mm (Mihaly et Cricsfalusy 1997). Listy jsou čárkovité s podélným bílým pruhem tvořícím 1/7–1/4 šířky listu (Raca et al. 2020, Rukšāns 2017). Spodní laterální rýhy nemají žebra. V době květu listy nepřesahují špičky okvětí a po odkvětu se prodlužují, při bázi jsou kryté 2–5 kožovitými katafyly. Šířka listů se pohybuje mezi 2–3 (–4) mm (Chrtek 2010). Okvětní trubka bývá bílá, nebo tmavě fialová v horní části. Její ústí může být zevnitř jemně chlupaté i lysé (Raca et al. 2019, Rafiński et Passakas 1976 a). Okvětní cípy jsou obkopynaté až obvejčité eliptické, konkávní, na vrcholu okrouhlé nebo mělce vykrojené, fialové. Ve špičce se většinou nachází tmavá skvrna ve tvaru srdce či velkého V. Vzácně mohou být květy celé bílé. Šířka okvětního cípu se pohybuje mezi (0,6–) 1,0–1,5 cm a délka (3,5–) 4,0–4,5 cm (Chrtek 2010). Čnělka je oranžová se třemi nálevkovitými až vějířkovitými bliznovými rameny, přesahuje vrcholy prašníků. Mihaly et Cricsfalusy (1997) pojednává o klinální variabilitě v tomto znaku. Vysokohorské populace mívají tyčinky a bliznová ramena ve stejné úrovni a s klesající nadmořskou výškou se blizna dostává výše nad úroveň špiček prašníků. Délka nitky se pohybuje okolo 12 mm (Chrtek 2010). Semeník je dlouhý 6,3–7,4 mm (Mihaly et Cricsfalusy

1997). Tobolka s krátkou ostrou špičkou je plodní stopkou v době zralosti vynesena do výšky 5–8 cm nad povrch (Rukšāns 2017). Mimo jiné se tento okruh dá od jiných taxonů ser. *Verni* odlišit i anatomickými znaky na příčném řezu listem. Typická jsou pro něj dlouhá nápadně zakřivená ramena tvořící laterální okraje listu a výrazné cévní svazky (Raca et al. 2017).

3.3.3 Ekologie

C. heuffelianus (s. lat.) je euryekní taxon schopný růst na nejrůznějších typech podloží. Preferuje měkké půdy. Edafický faktor není limitující. Je světlomilný, proto dává přednost otevřeným lučním plochám od 126 do 2000 m n. m. Disponuje však širokou ekologickou i fytoecologickou amplitudou, a proto může růst i ve světlých lesích. S rostoucí nadmořskou výškou se opožďuje jeho doba květu (Mihaly et Cricsfalusy 1997). V našich podmínkách roste většinou na mezotrofních loukách svazu *Arrhenatherion* a vzácně i ve fytoceenózách podsvazu *Alnenion glutinoso-incanae* (Chrtek 2010).

3.3.4 Rozšíření

Celkové rozšíření tohoto problematického okruhu (tj. všech sedmi známých cytotypů) se pohybuje od jižního Polska přes východ Česka, Slovensko, západní Ukrajinu, Maďarsko, Rumunsko, sever Balkánského poloostrova, země bývalé Jugoslávie, až po východní Rakousko (Rukšāns 2017, Brighton 1976, Chrtek 2010). Mosolygó-l et al. (2016) uvádí, že ke druhu *C. heuffelianus* s. str. patří pouze populace z transylvánských Karpat, tedy v Rumunsku, Maďarsku, Ukrajině a východním Slovensku.

3.3.5 Výskyt v ČR

Ač je tento druh zařazen mezi kriticky ohrožené druhy naší flóry (Grulich 2017) vedou se dodnes o jeho původnosti na našem území spory. Jako o nejpravděpodobnějším původním výskytu se hovoří o lokalitách v Beskydech. Populace v Orlických horách se považují za nepůvodní. Krkonošské lokality nejsou důkladně probádané a stále se o nich vedou spekulativní diskuze. V západnějších částech republiky, například na Šumavě, se vyskytují nepůvodní zplnělé populace. Historicky je známo více lokalit, z nichž však dlouhodobě nepotvrzují výskyt žádná pozorování ani herbářové položky (Popelářová et al. 2011, Chrtek 2010).

Nejzápadnější lokalitou považovanou obvykle v literatuře za přirozenou (Popelářová et al. 2011) je PR Hořina ležící podél stejnojmenného potoka na pomezí katastrů obcí Velké Heraltice a Brumovice na Opavsku. Zdejší populace roste výhradně na mezofilních loukách, místy však zasahuje i do přilehlého jasanovo–olšového luhu. Ze všech přirozených lokalit roste v nejnižší nadmořské výšce okolo 320 m n. m. První záznamy jsou dostupné již z roku 1820, což z ní činí nejstarší známou lokalitu tohoto druhu u nás. Přirozenost této populace někteří autoři zpochybňují, zejména Májovský et al. (1990).

V okolí i v intravilánu obce Zubří (u Valašského Meziříčí) se nachází několik dílčích mikrolokalit *C. heuffelianus* s. lat. na travnatých zahradách a březích Zuberského a Čertoryjského potoka v nadmořské výšce od 395 do 450 m. Podle sdělení místních pamětníků byly populace v minulosti mnohem početnější a zřejmě i celistvé, než je rozdělila zástavba. První zmínka pochází z herbářových sběrů z roku 1926 (Popelářová et al. 2011).

Na hřebeni Javorníků v katastru obce Nový Hrozenkov roste v blízkosti chaty Portáš populace na severně orientovaném svahu v zimě využívaném jako sjezdovka. Fytocenologicky jde o mezofilní horskou louku a okraj květnatých bučin. Nedaleko odtud těsně pod chatou Kohútka se dá nalézt i menší dílčí populace. Obě se nacházejí ve výšce okolo 900 m n. m. Poprvé byla lokalita zaznamenána v roce 1936 (Popelářová et al. 2011). Do své studie Slovenských populací rodu *Crocus* ji zahrnuli i Májovský et al. (1990).

Teprve v roce 2005 byly v Moravskoslezských Beskydech zaznamenány dvě nové lokality v okolí obce Horní Lomná. Jedna mikropopulace čítá pouze 20–50 kvetoucích jedinců a roste na okraji podmáčené smilkové pastviny. Druhá přibližně stejně velká roste na lokalitě Muřinkový vrch (Popelářová et al. 2011). V roce 2012 byla nalezena nejnovější lokalita u obce Velké Karlovice s názvem Člověčí (Chrtek 2016).

V oblasti Krkonoš je evidováno celkem osm lokalit výskytu tohoto druhu. Tři z nich mají první záznam již z roku 1975 a zbylých pět bylo objeveno v letech 2011–2012 (Chrtek 2016).

Z CHKO Orlické hory jsou známé dvě lokality. Populace rostoucí v Luisině údolí je známá od roku 1997 a populace u Zdobnické seče od roku 2004. Jedna populace je od roku 2012 evidovaná také ze Žďárských vrchů (Chrtek 2016).

3.3.6 *Crocus discolor* Reuss

Jedná se o západokarpatský alotetraploidní taxon s $2n = 18$. Nejstarším publikovaným jménem bylo v roce 1853 *C. discolor* Reuss. K populacím ze západních Karpat se vztahují ještě jména *C. babiogorensis* Zapař. (1906) a *C. scepusiensis* Rehman et Wołoszczak (1858). Užívání nejstaršího jména obhajovali ve své práci Májovský et al. (1990). Naopak mladší označení *C. scepusiensis* použil ve své studii například Brighton (1976). V předchozích pracích byl taxon pod jménem *C. scepusiensis* uváděn jako eko-species (Skalinska 1966) nebo varieta (Mihaly et Cricsfalusy 1997) druhu *C. heuffelianus*. Jiní autoři (Májovský et al. 1990, Skalinska 1968) tvrdí, že vznikl autopolyploidizací z *C. heuffelianus* s. str. ($2n = 10$) a následnou aneuploidizací, tedy ztrátou dvou chromozomů. Těsnou příbuznost tohoto taxonu s *C. vernus* vyvrací elektroforetická studie enzymů pylových zrn a také odlišná povrchová struktura testy těchto taxonů. Výsledky nové fylogenetické studie založené na biparentálně a maternálně dědičných markerech však ukazují na alotetraploida ($2n = 18$), jehož rodičovskými druhy jsou *C. vernus* ($2n = 8$) a východokarpatská populace *C. heuffelianus* ($2n = 10$; Mosolygó-I et al. 2016). Již Brighton (1976) ve své studii zjistil, že *C. discolor* má o něco menší chromozomy než *C. heuffelianus* s. str. Podle Mosolygó-I et al. (2016) se od něj morfologicky odlišuje přítomností chlupů v ústí okvětní trubky. Raca et al. (2019) však nachází i mezi jedinci v populacích označovaných jako *C. heuffelianus* s. str. chlupaté ústí trubky a ke stejnému závěru došel již Májovský et al. (1990), který však vyzdvihuje jiné morfologické odlišnosti. *Crocus discolor* má dle tohoto zdroje v době květu kratší a méně vyvinuté listy, jeho blizna vysoce přesahuje vrcholy prašníků a disponuje o něco menšími květy. Kromě toho se odlišuje i ekologicky, jelikož roste zejména na otevřených prostranstvích v horách, zatímco *C. heuffelianus* s. str. dává přednost světlým lesním stanovištím. Autoři také zmiňují jeho geografickou izolaci vůči východním populacím. Pokud se dostane za hranice rozšíření, pak jedině působením člověka. Rukšāns (2017) o tomto taxonu ve své monografii pojednává jako

o poddruhu *C. heuffelianus*. Populace *C. discolor* rostou ve vyšších polohách na většině území Slovenska (kromě oblasti na východ od Prešova), východě České republiky a v jižním Polsku (Brighton 1976, Mosolygó-I et al. 2016). Většina českých autorů (Chrtek 2010, Popelářová et al. 2011) však nadále tradičně označují populace z ČR jako *C. heuffelianus*.

3.3.7 *Crocus vittatus* Schlosser et Vukotinović

C. vittatus ($2n = 18$) vznikl paralelně ze stejných rodičovských druhů jako *C. discolor*. Jejich totožnost vyvrací rozdílné haplotypy chloroplastové DNA a také různá geografická distribuce (Mosolygó-I et al. 2016). Májovský et al. (1990) ještě považoval tento taxon za hypertetraploidní, odvozený od druhů se základním chromozomovým číslem $x = 4$. Používal starší jméno tohoto taxonu *C. uniflorus* Schur (1852). Morfologicky se od ostatních cytotypů v tomto okruhu odlišuje pouze tyčinkami, které téměř dosahují k bliznám. Stejně jako *C. discolor*, i tento taxon má chloupky v ústí okvětní trubky. Je rozšířený ve Slovinsku, Chorvatsku a Rumunsku. Typický je pro něj výskyt v nižších polohách.

3.3.8 *Crocus bertiscensis* Raca, Harpke, Shuka et Randjel

Crocus bertiscensis ($2n = 2x = 12$) byl popsán jako poslední (Raca et al. 2020). Stejně jako předchozí taxony i tento se odlišuje jen některými variabilními morfologickými znaky. Měl by mít kratší okvětní trubku, užší středový bílý pruh na listu, který zabírá 1/7 šířky listu, světlejší a plošší okvětní cípy. Stejně jako u předchozích cytotypů má ústí trubky nápadně chlupaté. Vyskytuje se zejména v Albánii v nadmořské výšce 2000–2270 m. Byl však pozorován i v přilehlých částech Černé Hory ve výšce 1000 m n. m. Vyskytuje se na alpínských loukách s křemičitým substrátem.

3.3.9 Jiné cytotypy

Ve Slovinsku se dále vyskytují populace s chromozomovým počtem $2n = 20$, které bývají někdy označovány jako *C. exiguus* Schur. Populace na Šar planina disponuje číslem $2n = 22$ a bývá označována *Crocus „šarplaninae“* (Májovský et al. 1990, Rukšāns 2017).

3.4 *Crocus tommasinianus* Herb.

Tento druh je velmi blízce příbuzný okruhu *C. heuffelianus*. Mosolygó-I et al. (2016) jej ve své fylogenetické studii použili jako blízkou outgroup tomuto okruhu a zároveň vyslovili hypotézu o jeho alotetraploidním původu, kterou však z nedostatku dat nedokázali potvrdit. Na jedné lokalitě v Maďarsku byl kdysi popsán jako *C. heuffelianus* var. *csapodyae* Horvat et Jáv. (Mihaly et Cricsfalusy 1997).

Tento taxon roste v opadavých lesích nebo na otevřených kamenitých stanovištích, obvykle na vápencovém podloží v nadmořské výšce mezi 1000 a 1500 m. Je rozšířen v oblasti bývalé Jugoslávie a na severu Balkánského poloostrova na území Srbska, Makedonie, Černé hory, Bosny a Hercegoviny, Chorvatska, severozápadního Bulharska a jižního Maďarska (Rukšāns 2017).

Od výše popsaného *C. heuffelianus* s. lat. se odlišuje zejména absencí skvrny na okvětních cípech a světleji fialovým zbarvením okvěti. Tunika hlízy je tvořená paralelními vlákny, které v oblasti vrcholu přecházejí ve slabě síťnatou strukturu. Šířka středového bílého pruhu na listu tvoří asi 1/3 jeho šířky. Listy často dosahují vrcholu okvěti nebo jej mírně převyšují. Ústí

trubky je bílé a s jemnými chloupky. Délka nitky dosahuje hodnot mezi 5 a 7 mm a prašníky jsou dlouhé 10–15 mm. Vrcholy bliznových ramen se většinou nacházejí lehce pod úrovní vrcholů prašníků, ve stejné výšce nebo je slabě převyšují. Okvětní cípy bývají obvejčité, obkopinaté s tupými nebo špičatými konci. Jejich délka se pohybuje okolo 25–33 mm (Harpke et al. 2014, Rukšāns 2017).

Ve volné přírodě nebývá příliš variabilní. Občas se vyskytují bíle zbarvení jedinci. V zahradách se tento druh šíří téměř invazně a pěstuje v mnoha barevných formách a kultivarech od bílé přes tmavě fialovou až po načervenalé jedince (Rukšāns 2017).

4 Materiál a metody

4.1 Sběr dat a materiálu

Terénní sběr rostlinného materiálu jsem pro potřeby této práce provedl celkem na deseti lokalitách, ale pouze na osmi z nich rostou populace, které podle literatury patří k okruhu *C. heuffelianus* (s. lat.). Jde o pět lokalit v CHKO Beskydy, dvě v CHKO Orlické hory a jednu



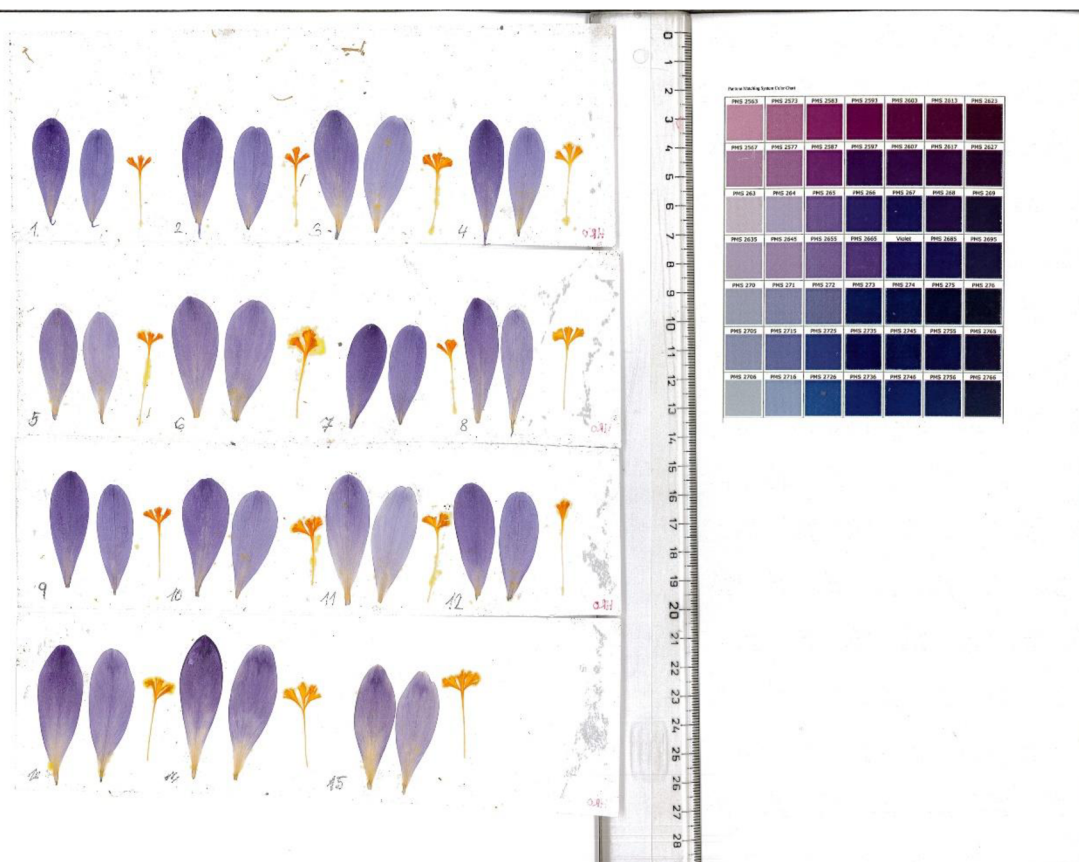
na Opavsku. Zbylé dvě populace pocházejí z umělé výsadby v intravilánech měst Olomouc a Přerov a náleží k jiným druhům *Crocus* ser. *Verni*. Jejich odběr jsem provedl pouze pro porovnání s hlavním studovaným druhem. Lokalita pod PR Úplaz je úplně nová a stále nebyla nikde zveřejněná (V. Kalníková, ústní sdělení). Přehled všech lokalit uvádím v Příloze 1.

Na každé lokalitě jsem standardně studoval 15 jedinců náhodně vybíraných rovnoměrně v celé populaci. Mnohde však podmínky neumožňovaly analyzovat takový počet, většinou z důvodu pozdní návštěvy lokality, kdy jsem nenacházel dostatek rostlin v příznivé fenologické fázi. Nikdy však počet studovaných jedinců neklesl pod 10, s výjimkou populace rostoucí v botanické zahradě PřF UP v Olomouci, na níž byla terénní metodika testována.

Obr. 1: Jedinec připravený na měření morfologických znaků v terénu

Pro změření morfologických znaků jsem každou rostlinu vykopal i s podzemní částí a po samotném měření hlízu vrátil zpět do půdy. Z každé populace jsem však odebral dvě až tři hlízy pro laboratorní zjištění počtu chromozomů. Každou rostlinu jsem vyfotografoval s měřítkem a barevnou škálou (obr. 1) Z každého jedince jsem odebral jeden vnější a jeden vnitřní okvětní cíp a nalepil je na lepicí papír spolu s horní částí čnělky. Pro uchování barev a stálých podmínek pro měření v programu ImageJ jsem tyto části rostlin oskenoval spolu s milimetrovým pravítkem (obr. 2). Dále jsem z každé rostliny odebral jeden list na analýzu velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie. Označené listy jsem vložil do vlhkého

papírového kapesníku a igelitového sáčku a po skončení terénních šetření uložil do chladničky. Pro účely molekulárních analýz plánovaných pro diplomovou práci jsem navíc odebral z celé populace listy od tří exemplářů, které jsem v papírových sáčcích nechal vysušit v silikagelu. Každý vzorek jsem označil číslem jedince a třípísmennou zkratkou lokality.



Obr. 2: Vzorčky okvětních cípů populace u Nového Hrozenkova připravené na měření morfologických znaků v programu ImageJ.

4.2 Morfometrická analýza

V terénních podmínkách přímo na lokalitě jsem měřil celkem 13 znaků a z toho byl jeden kategoriální (tab. 1). Hodnotu znaků měřených v centimetrech jsem zjišťoval pravítkem. Většinu jsem ale zaznamenával v milimetrech a zjišťoval digitálním posuvným měřidlem. Znaky na některých početnějších orgánech, jako jsou listy a tyčinky, jsem měřil třikrát a v konečné analýze jsem použil průměr těchto hodnot. Pro analýzu jsem se pokoušel volit rostliny procházející stejnou fenologickou fází kvetení. Fenologická fáze byla určena prašníky, které ještě neměly být puklé nebo dokonce zkroucené.

Pomocí programu ImageJ (Abràmoff et al. 2004, Schneider et al. 2012) jsem vyhodnocoval celkem 11 znaků na okvětních cípech a čnělce, přičemž jsem hodnotil zvláště vnější a vnitřní cípy každého jedince (tab. 2). I zde byly použity kategoriální proměnné týkající se kresby okvětních cípů, které jsou pro tento okruh tak typické.

Tab. 1: Seznam morfologických znaků měřených v terénních podmínkách; (3×) – provedeny měření 3 uvedených orgánů z daného jedince

měřený znak	jednotka nebo kategorie
celková délka jedince	cm
převyšování okvětní listy	ano/ne
výška hlízy	mm
šířka hlízy	mm
šířka listu (3×)	mm
šířka listového bílého pruhu (3×)	mm
šířka okvětní trubky v horní části	mm
délka okvětní trubky	cm
délka volné části nitky (3×)	mm
šířka nitky (3×)	mm
délka prašníku (3×)	mm
rozdíl výšky prašníku a blizny (3×)	mm
délka semeníku	mm

Tab. 2: Seznam morfologických znaků měřených v programu ImageJ. Pravé a levé rameno blizny jsou zaměnitelné a závisí pouze na nalepení tohoto orgánu v terénu.

měřený znak	jednotka nebo kategorie
délka vnějšího okvětního cípu	mm
délka vnitřního okvětního cípu	mm
šířka vnějšího okvětního cípu	mm
šířka vnitřního okvětního cípu	mm
délka pravého ramena blizny	mm
délka středního ramena blizny	mm
délka levého ramena blizny	mm
skvrna v horní části vnějšího cípu	chybí/tvaru V/ve špičce
skvrna v horní části vnitřního cípu	chybí/tvaru V/ve špičce
skvrna v dolní části vnějšího cípu	chybí/tmavá/světlá
skvrna v dolní části vnitřního cípu	chybí/tmavá/světlá

4.3 Měření velikosti genomu metodou průtokové cytometrie

Pro stanovení velikosti genomu jsem využil odebrané označené listy všech studovaných jedinců z každé populace, které zůstaly až do doby samotného měření uchovány v chladničce. Velikost genomu byla stanovena pomocí průtokové cytometrie s vnitřní standardizací (Doležel et al. 2007) za použití listů hrachu (*Pisum sativum* L. 'Ctirad' 2C = 9,09 pg).

Ze vzorku jsem použil pouze malou část, a to světlou bázi listu (cca 20 mg). Tu jsem položil na Petriho misku spolu se zhruba stejným množstvím listu hrachu. Následně jsem pomocí pipety přidal 1 ml chlazeného pufru LB01 o složení 5 mM Tris, 2 mM Na₂EDTA, 0.5 mM spermin tetrahydrochlorid, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, 1 M NaOH, β-merkaptoetanol pH 7.8 (Doležel et al. 2007) s přídávkem PVP (polyvinylpyrrolidon, 10 g na 500 ml pufru; Doležel et Bartoš 2005). Pomocí ostré žiletky jsem oba vzorky nasekal na velmi jemné kousky. Celý homogenát jsem poté přelil přes nylonový filtr s póry o šířce 4,2 μm do kyvety a pipetováním střídavě nahoru a dolů jej opatrně promíchal. Do kyvety jsem následně přidal 50 μl fluorochromu PI (propidium jodid) a zároveň také 0,5 μl RNázy (obojí o koncentraci 50 μg/ml). Připravený vzorek jsem analyzoval na průtokovém cytometru PAS (Partec, Münster, Německo) vybaveném zeleným laserem Cobolt Samba (532 nm, 100 mW; Cobolt AB, Stockholm, Švédsko). Každý vzorek byl měřen pouze jednou. Zaznamenáno bylo vždy 5000 jader. Výslednou velikost genomu jsem stanovil z lineární škály vzniklého histogramu porovnáním pozic 2C peaku vzorku a 2C peaku standardu.

4.4 Stanovení počtu chromozomů

Vzhledem k tomu, že počty chromozomů úzce souvisí s měřenou velikostí genomu (tj. u rostlin se stejnou velikostí genomu lze předpokládat stejný počet chromozomů), zjišťoval jsem je pouze u tří vybraných populací vhodně zastupujících danou velikost genomu (Přerov, Člověčí, Hořina). Pro účely laboratorního postupu jsem použil mladé kořeny s meristemickou špičkou na hlízách dospělých rostlin odebrané ve třech kusech za každou populaci. Hlízy byly do doby šetření pěstovány v květináčích.

Samotný postup stanovení karyotypu jsem částečně prováděl podle Krahulcové (1998), s určitými modifikacemi. Kořeny zbavené nečistot jsem nejprve vložil do epruvety s 8-hydroxychinolinem a nechal působit 6–8 hodin ve tmě při laboratorní teplotě (cca 20 °C). Po předpůsobení jsem kořeny propláchl vodou pro odstranění zbytků chemikálií a následně vložil do čerstvě připravené směsi 96 % ethanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1. Fixace probíhala při 4 °C alespoň přes noc nebo až do doby dalšího postupu. Macerace se odehrála ve směsi 35 % HCl a 96 % ethanolu v poměru 1:1 po 4 min při laboratorní teplotě. Po opětovném propláchnutí vodou jsem celé kořínky umístil do prachovnice s acetokarmínem, přikryl skleněnou zátkou a nechal působit cca 1 h. Nabarvenou kořenovou špičku jsem na podložním sklíčku v kapce acetokarmínu oddělil pomocí žiletky a jemným tlakem preparační jehly na krycí sklíčko zhotovil roztakový preparát. Zhotovené roztaky jsem pozoroval pod světelným mikroskopem značky Olympus BX60 (Olympus, Tokyo, Japonsko) vybaveným kamerou Olympus DP72 (Olympus, Tokyo, Japonsko).

4.5 Statistické vyhodnocení

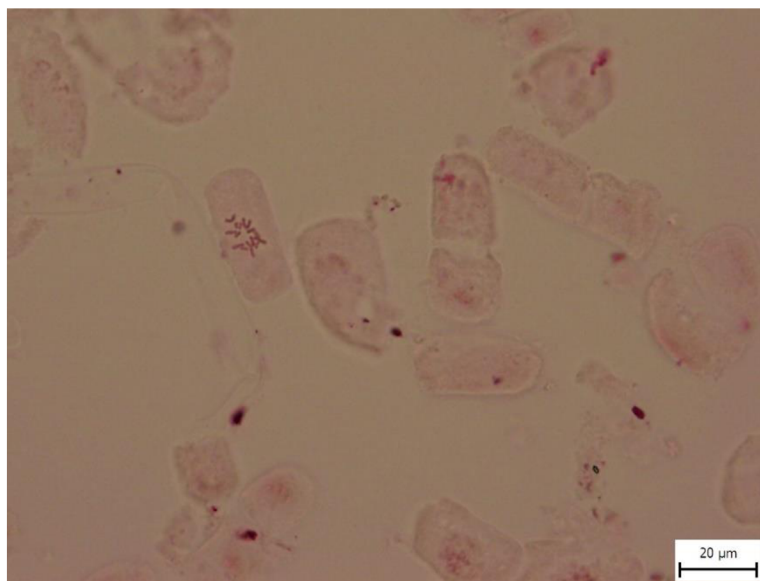
Výsledky jsem zpracovával v programu NCSS (Hintze 2013) a pomocí sady funkcí MorphoTools v prostředí .R (Koutecký 2015). S použitím MorphoTools jsem provedl explorační analýzu kvantitativních dat a výpočet popisné statistiky (průměr, směrodatná odchylka, minimum, maximum, medián a kvantily). Kvantitativní znaky jsem vizualizoval pomocí boxplotů. Spočítal jsem korelační matici pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Vysoce korelované znaky ($|r| \geq 0,90$) jsem vyřadil z následujících mnohorozměrných analýz. Následně jsem spočítal standardizovanou analýzu hlavních komponent (PCA), která ukázala rozložení jedinců v ordinačním prostoru a celkový rozsah morfologické variability studovaného souboru.

Vzhledem k tomu, že se rozdělení dat blížilo normálnímu, jsem v programu NCSS vypočítal pro kvantitativní znaky analýzu variance (ANOVA) a Tukey-Kramerův test, kterými jsem testoval rozdíly v jednom znaku mezi jednotlivými cytotypy ($2n = 16$, $2n = 18$, $2n = 20$). Pro změřené hodnoty velikosti genomu jsem spočítal stejné testy, ale srovnával jsem jednotlivé populace. Pro kvalitativní znaky jsem vypočítal proporce daného znaku v rámci cytotypu, rozdíly jsem testoval pomocí chí-kvadrát testu v kontingenčních tabulkách a data jsem vizualizoval pomocí sloupcových proporčních grafů. Rozsah morfologické odlišnosti mezi jednotlivými cytotypy byl testován pomocí kanonické diskriminační analýzy (CDA).

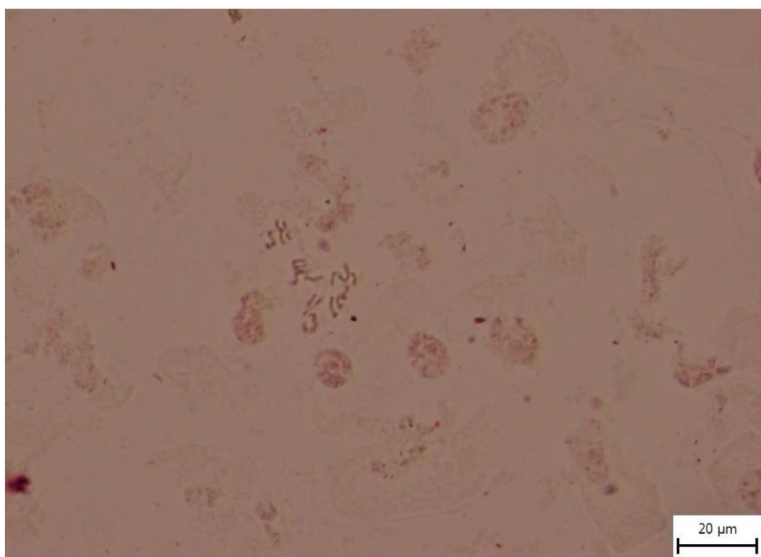
5 Výsledky

5.1 Karyologické šetření

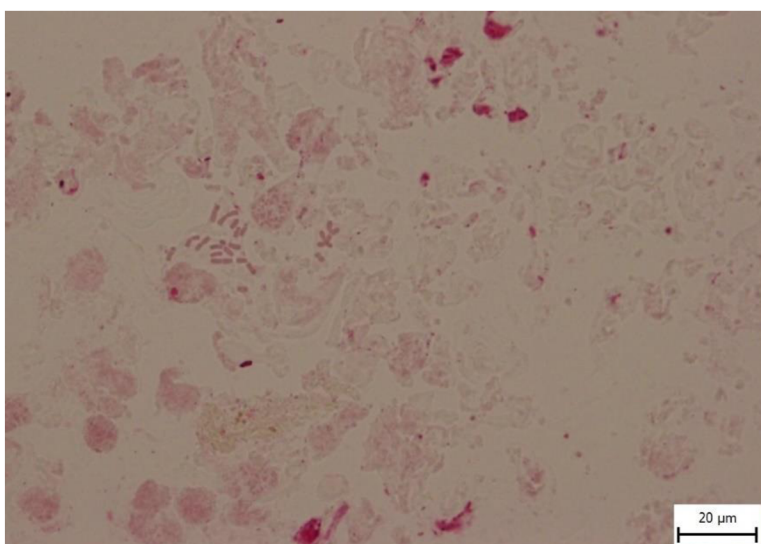
Pro většinu populací, které podle literatury patří k okruhu *C. heuffelianus*, jsem z roztlakových preparátů zjistil počet chromozomů $2n = 18$ s výjimkou populace rostoucí v PR Hořina, u níž jsem našel $2n = 20$. Populace určené jako *C. tommasinianus* měly počet $2n = 16$ (obr.3–5). Tyto tři zjištěné počty chromozomů jsem dále použil pro definici skupin při statistickém testování.



Obr. 3: Detail roztlakového preparátu kořenové špičky jedince z lokality v Přerově (*C. tommasinianus*). Počet chromozomů $2n = 16$. Zvětšení 400 ×.



Obr. 4: Detail roztlakového preparátu kořenové špičky jedince z lokality Človčiči (*C. heuffelianus* agg.). Počet chromozomů $2n = 18$. Zvětšení $400\times$.

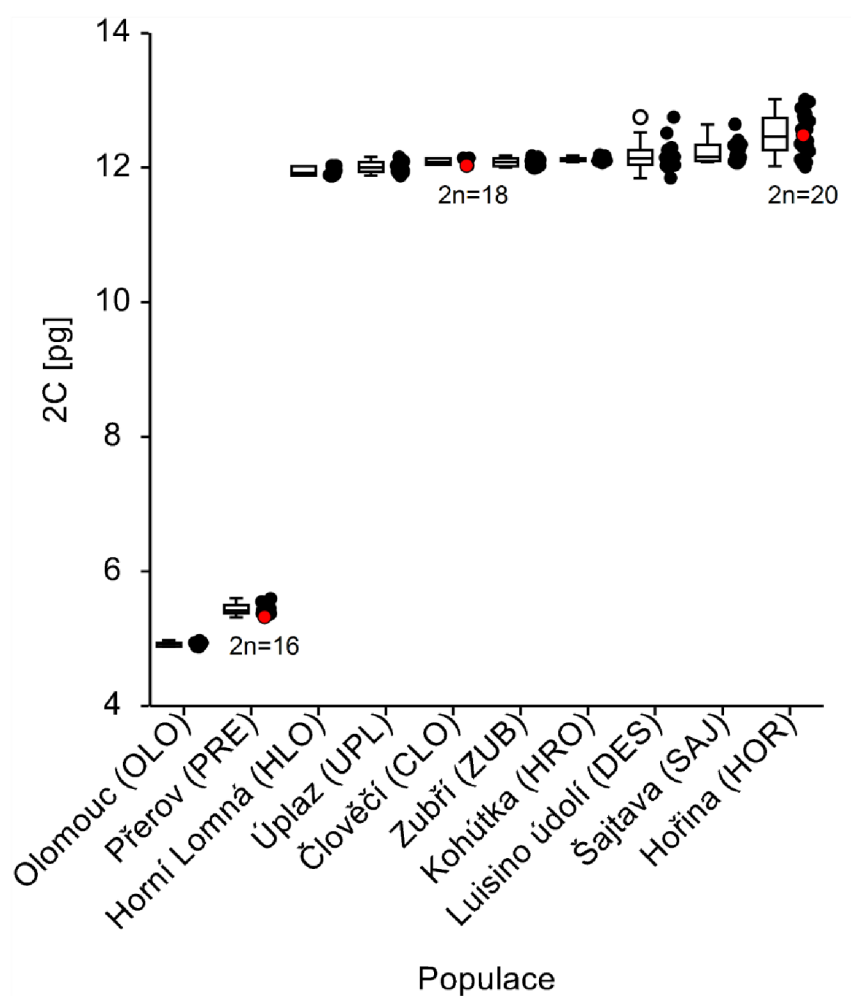


Obr. 5: Detail roztlakového preparátu kořenové špičky jedince z lokality PR Hořina (*C. heuffelianus* agg.). Počet chromozomů $2n = 20$. Zvětšení $400\times$.

Průtokovou cytometrií byly měřeny vzorky 121 jedinců pocházejících z 10 populací. Naměřenou velikost genomu jsem porovnával mezi jednotlivými populacemi. Analýza variance ukázala signifikantní rozdíly ve velikosti genomu mezi populacemi. Popisné statistiky velikosti genomu u jednotlivých populací uvádím v Tab. 3. Graficky znázorněné výsledky průtokové cytometrie lze vidět na Obr. 6. Výsledky Tukey-Kramerova testu, kterým jsem prověřoval, které populace se mezi sebou liší ve velikosti genomu shrnuji v tabulce 4.

Tab. 3: Popisná statistika velikosti genomu v pikogramech srovnávaná mezi měřenými populacemi.

Populace	velikost vzorku	průměr	SD	Minimum	Maximum
Člověčí (CLO)	4	12.09	0.06	12.03	12.14
Horní Lomná (HLO)	8	11.94	0.07	11.87	12.03
Hořina (HOR)	21	12.48	0.30	12.01	13.01
Kohútka (HRO)	14	12.12	0.03	12.07	12.19
Luisino údolí (DES)	15	12.18	0.22	11.85	12.75
Olomouc (OLO)	6	4.92	0.04	4.88	4.97
Přerov (PRE)	15	5.44	0.08	5.33	5.60
Šajtava (SAJ)	12	12.23	0.17	12.07	12.64
Úplaz (UPL)	12	12.01	0.09	11.88	12.16
Zubří (ZUB)	14	12.08	0.06	11.99	12.17



Obr. 6: Variabilita ve velikosti genomu srovnávaná mezi jednotlivými populacemi. Pro každou populaci je znázorněna jak vyznačením vlastních hodnot velikosti genomu v pg, tak pomocí boxplotů. Červené body označují jedince, u nichž byl stanoven počet chromozomů.

Tab. 4: Výsledek Tukey-Kramerova testu a průměrné velikosti genomu v pikogramech jednotlivých populací. Odlišné populace jsou zapsány pouze zkratkou.

Populace	velikost vzorku	průměrná hodnota velikosti genomu	Odlišné populace
Člověčí (CLO)	4	12.09	HOR, OLO, PRE
Horní Lomná (HLO)	8	11.94	HOR, DES, OLO, PRE, SAJ
Hořina (HOR)	21	12.48	CLO, HLO, HRO, DES, OLO, PRE, SAJ, UPL, ZUB
Kohútka (HRO)	14	12.12	HOR, OLO, PRE
Luisino údolí (DES)	15	12.18	HLO, HOR, OLO, PRE
Olomouc (OLO)	6	4.92	CLO, HLO, HOR, HRO, DES, PRE SAJ, UPL, ZUB
Přerov (PRE)	15	5.44	CLO, HLO, HOR, HRO, DES, OLO, SAJ, UPL, ZUB
Šajtava (SAJ)	12	12.23	HLO, HOR, OLO, PRE, UPL
Úplaz (UPL)	12	12.01	HOR, OLO, PRE, SAJ
Zubří (ZUB)	14	12.08	HOR, OLO, PRE

5.2 Variabilita morfologických znaků

5.2.1 Analýza variance (ANOVA)

Morfometrické šetření jsem provedl celkem na 106 jedincích *Crocus ser Verni*, z čehož 70 ex. náleží k okruhu *C. heuffelianus* (cytotyp $2n = 18$), 15 ex. k nejasnému taxonu rostoucímu v PR Hořina (cytotyp $2n = 20$) a 21 ex. k druhu *C. tommasinianus* ($2n = 16$). Jednocestná analýza variance (ANOVA), kterou jsem testoval rozdíly v morfologii mezi těmito třemi cytotypy, ukázala signifikantní rozdíly ve všech kvantitativních znacích s výjimkou výšky hlízy a šířky listu. Rozdíly v jednotlivých kvantitativních znacích jsem znázornil pomocí boxplotů (Obr. 7–13). Výsledky testu, P hodnoty a parametry deskriptivní statistiky jsou uvedeny v Tab. 5. Výsledky Tukey-Kramerova testu, kterým jsem testoval, jaké cytotypy se od sebe v jednotlivých znacích liší, shrnuji v tab. 6.

Tab. 5: Popisné statistiky všech kvantitativních znaků v milimetrech (kromě výšky rostliny a délky trubky, které jsou v centimetrech) a výsledky analýzy variance (F a P-hodnota). Velikosti vzorku jsou uvedené v závorce u jednotlivých cytotypů (2n = 16, 2n = 18, 2n = 20).

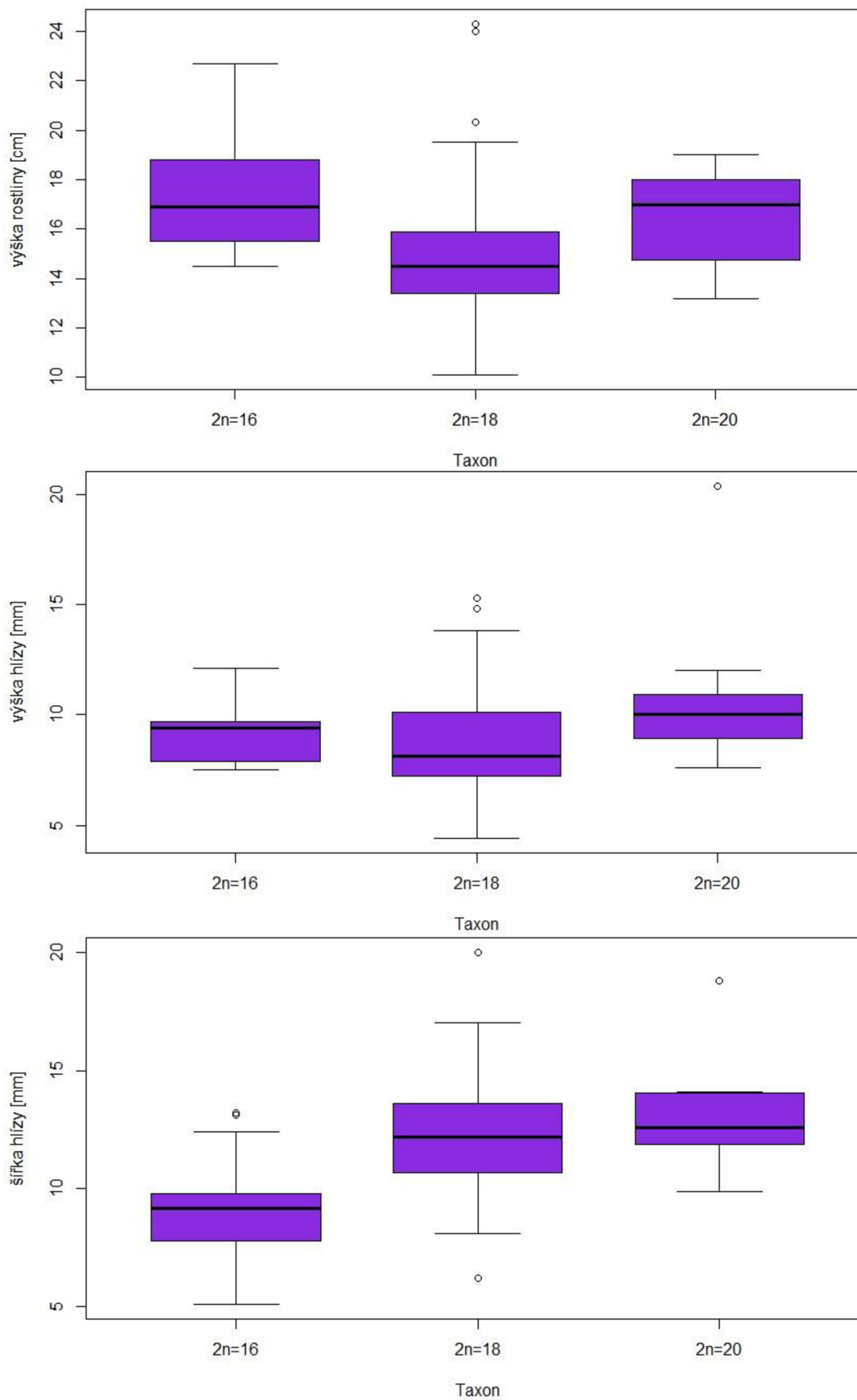
znak	zkratka	2n = 16 (21)			2n = 18 (69)			2n = 20 (15)			F	P
		průměr	SD	min-max	průměr	SD	min-max	průměr	SD	min-max		
výška	vyska	17	2	15–23	15	3	10–24	17	2	13–19	8.86	<0.001
výška hlízy	v_hlize	9	1	8–12	9	2	4–15	10	3	8–20	2.87	0.06
šířka hlízy	s_hlize	9	2	5–13	12	2	6–20	13	3	10–19	19.13	<0.001
šířka listu	s_listu	3	0	2–4	3	1	2–5	3	1	2–4	2.34	0.46
šířka pruhu	s_pruhu	1	0	1–1	1	0	1–1	1	0	1–1	20.18	<0.001
šířka trubky	s_trubky	2	0	1–3	3	1	2–6	2	0	2–3	26.81	<0.001
délka trubky	d_trubky	8	2	6–12	7	1	5–16	8	1	7–10	12.04	<0.001
délka nitky	d_nitky	10	2	6–13	10	2	7–15	8	1	7–10	9.41	<0.001
šířka nitky	s_nitky	1	0	0–1	1	0	1–2	1	0	1–1	98.94	<0.001
délka prašníku	d_prasniku	12	1	11–16	12	2	9–16	10	2	7–13	15.98	<0.001
rozdíl výšky blizny a prašníku	rozdil_bliznaprasnik	0	2	-5–7	7	2	2–13	8	2	5–11	67.99	<0.001
délka semeníku	d_semenik	6	1	5–8	6	1	4–9	7	1	5–10	3.98	0.02
délka vnějšího okvětního cípu	d_vne_seg	33	3	25–40	39	5	28–48	34	3	30–40	16.74	<0.001
délka vnitřního okvětního cípu	d_vni_seg	30	3	24–36	36	5	26–46	31	2	28–36	18.53	<0.001
šířka vnějšího okvětního cípu	s_vne_seg	11	2	8–14	13	2	10–18	12	1	9–14	15.87	<0.001
šířka vnitřního okvětního cípu	s_vni_seg	13	2	10–16	13	2	9–20	12	2	9–15	3.43	0.03
délka levého ramena blizny	lev_ram_blizny	5	2	3–11	7	1	4–11	5	2	3–9	14.73	<0.001
délka středního ramena blizny	str_ram_blizny	5	2	3–10	7	1	3–11	6	1	4–9	20.76	<0.001
délka pravého ramena blizny	pra_ram_blizny	5	2	3–11	7	1	4–12	6	2	3–9	14.84	<0.001

Tab. 6: Výsledky Tukey-Kramerova testu pro morfologické kvantitativní znaky. Výška rostliny a délka trubky jsou v centimetrech, ostatní znaky v milimetrech. 2n = 16 (21 jedinců), 2n = 18 (69 jedinců) a 2n = 20 (15 jedinců).

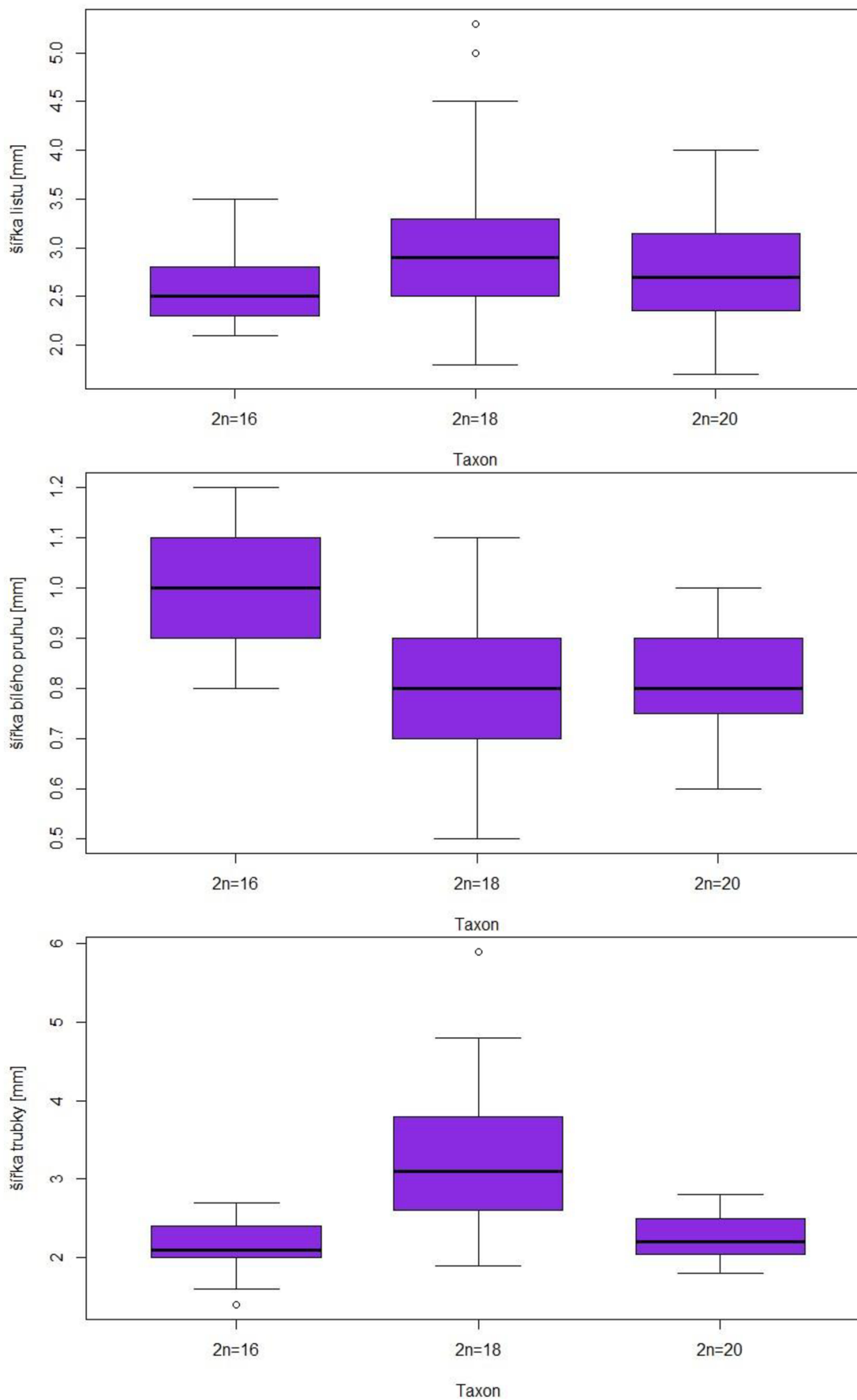
znak	cytotyp	průměrná hodnota znaku	odlišné cytotypy
výška	2n = 16	17	2n = 18
	2n = 18	15	2n = 16
	2n = 20	17	–
výška hlízy	2n = 16	9	–
	2n = 18	9	2n=20
	2n = 20	10	2n=18
šířka hlízy	2n = 16	9	2n=18, 2n=20
	2n = 18	12	2n=16
	2n = 20	13	2n=16
šířka listu	2n = 16	3	–
	2n = 18	3	–
	2n = 20	3	–
šířka bílého pruhu	2n = 16	1	2n=18, 2n=20
	2n = 18	1	2n=16
	2n = 20	1	2n=16
šířka trubky	2n = 16	2	2n=18
	2n = 18	3	2n=16, 2n=20
	2n = 20	2	2n=18
délka trubky	2n = 16	8	2n=18
	2n = 18	7	2n=16, 2n=20
	2n = 20	8	2n=18
délka nitky	2n = 16	10	2n=20
	2n = 18	10	2n=20
	2n = 20	8	2n=16, 2n=18
šířka nitky	2n = 16	1	2n=18, 2n=20
	2n = 18	1	2n=16
	2n = 20	1	2n=16

Tab. 6: Pokračování

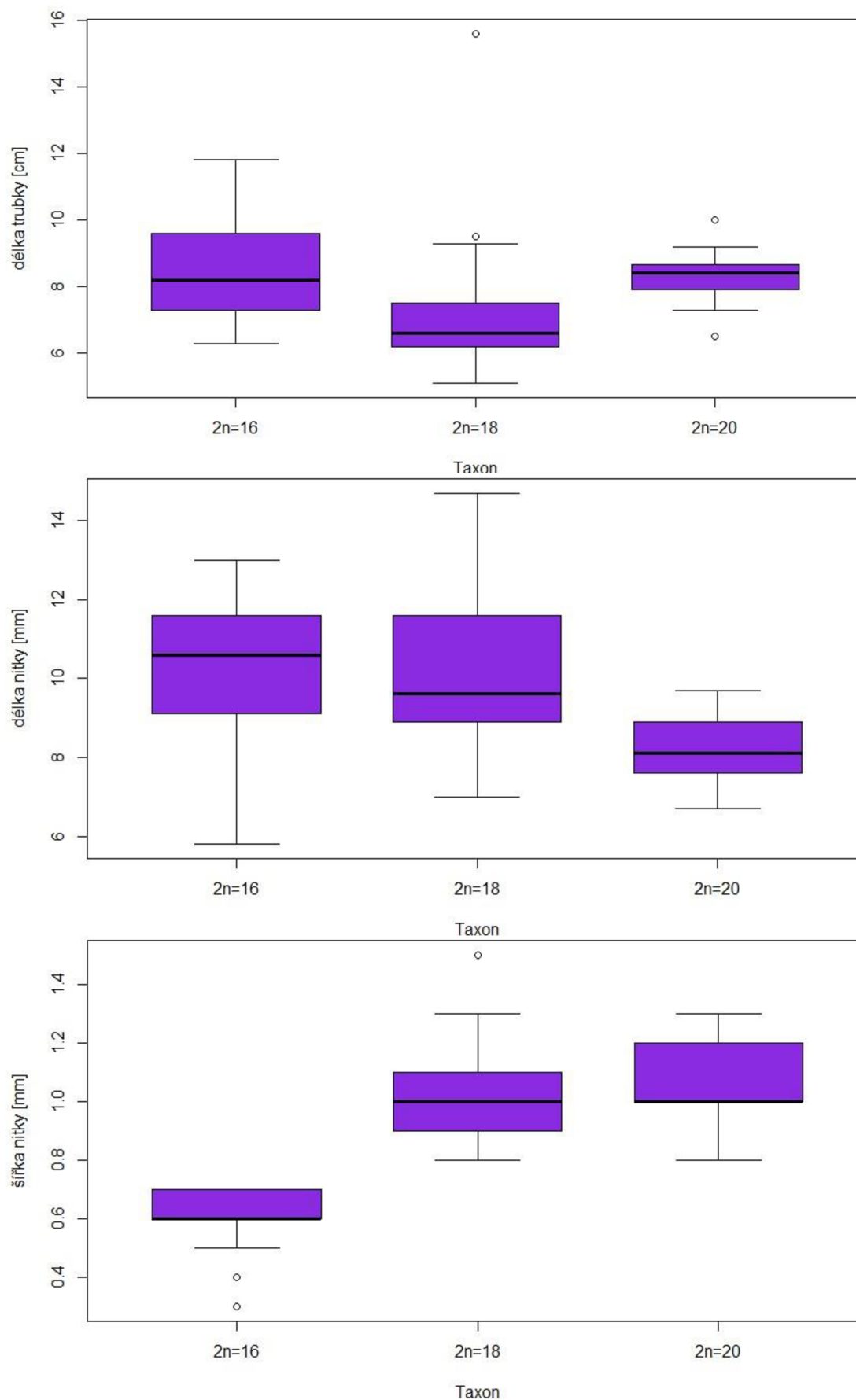
znak	cytotyp	průměrná hodnota znaku	odlišné cytotypy
délka prašníku	2n = 16	12	2n=20
	2n = 18	12	2n=20
	2n = 20	10	2n=16, 2n=18
rozdíl výšky blizny a prašníku	2n = 16	0	2n=18, 2n=20
	2n = 18	7	2n=16
	2n = 20	8	2n=16
délka semeníku	2n = 16	6	2n=20
	2n = 18	6	–
	2n = 20	7	2n=16
délka vnějšího okvětního cípu	2n = 16	33	2n=18
	2n = 18	39	2n=16, 2n=20
	2n = 20	34	2n=18
délka vnitřního okvětního cípu	2n = 16	30	2n=18
	2n = 18	36	2n=16, 2n=20
	2n = 20	31	2n=18
šířka vnějšího okvětního cípu	2n = 16	11	2n=18
	2n = 18	13	2n=16, 2n=20
	2n = 20	12	2n=18
šířka vnitřního okvětního cípu	2n = 16	13	–
	2n = 18	13	2n=20
	2n = 20	12	2n=18
délka levého ramena blizny	2n = 16	5	2n=18
	2n = 18	7	2n=16, 2n=20
	2n = 20	5	2n=18
délka středního ramena blizny	2n = 16	5	2n=18
	2n = 18	7	2n=16, 2n=20
	2n = 20	6	2n=18
délka pravého ramena blizny	2n = 16	5	2n=18
		7	2n=16
		6	–



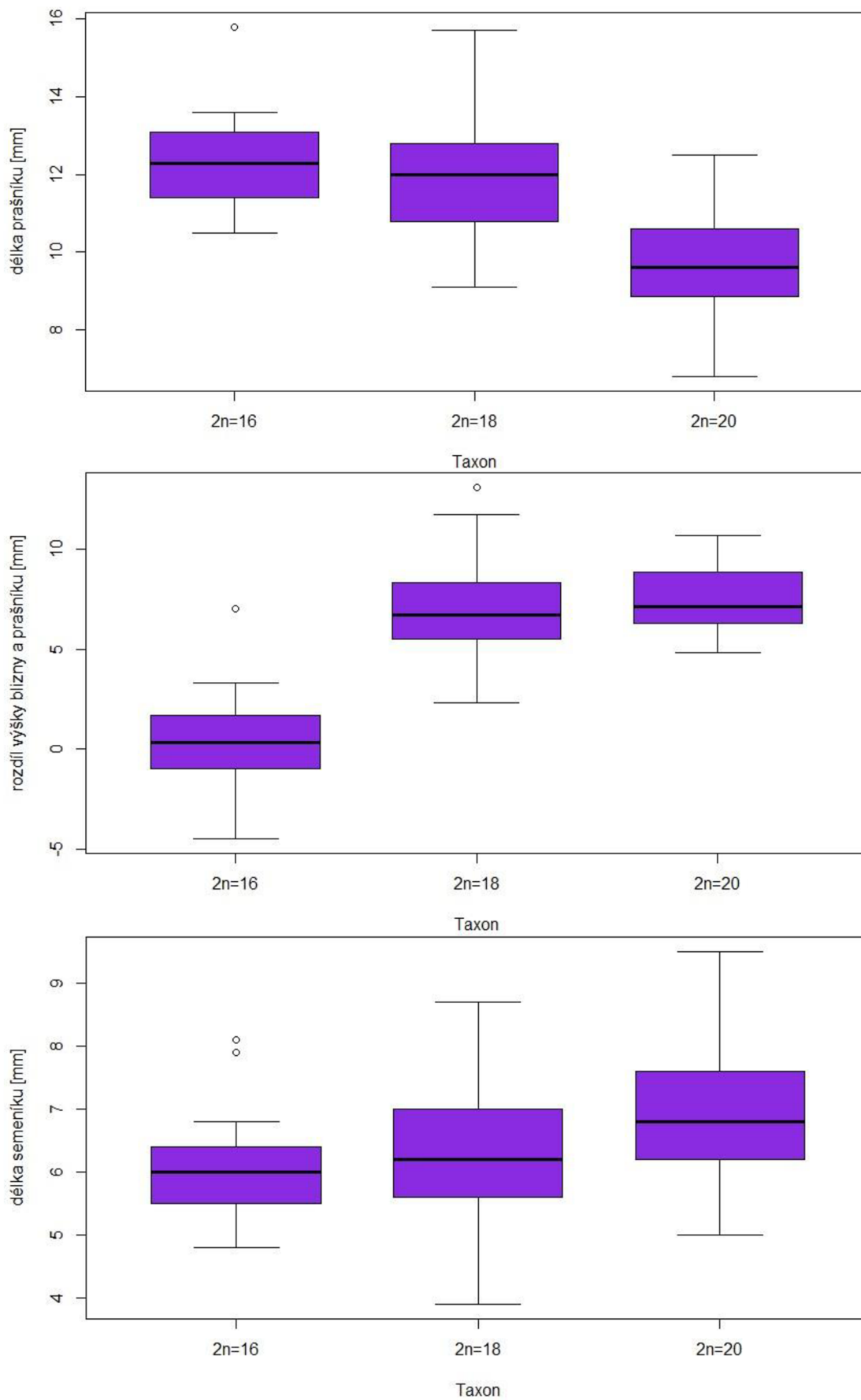
Obr. 7: Variabilita kvantitativních morfologických znaků porovnávaná mezi jednotlivými cytotypy. Tělo boxplotu znázorňuje mezikvartilové rozpětí, čára uvnitř těla představuje medián, „vousy“ udávají zbytek variability a kolečka odlehle hodnoty.



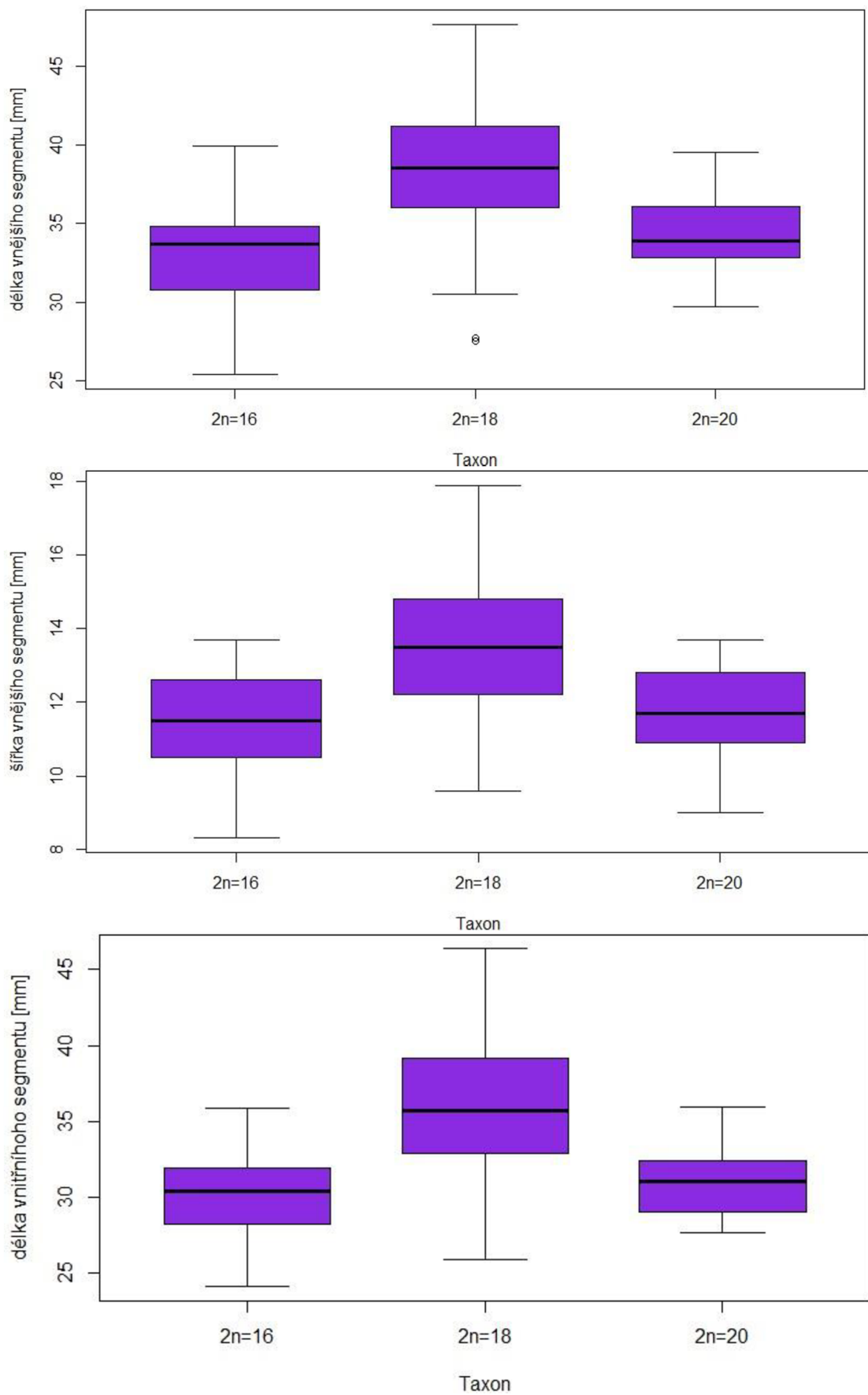
Obr. 8: Variabilita kvantitativních morfologických znaků porovnávána mezi jednotlivými cytotypy. Tělo boxplotu znázorňuje mezikvartilové rozpětí, čára uvnitř těla představuje medián, „vousy“ udávají zbytek variability a kolečka odlehlé hodnoty.



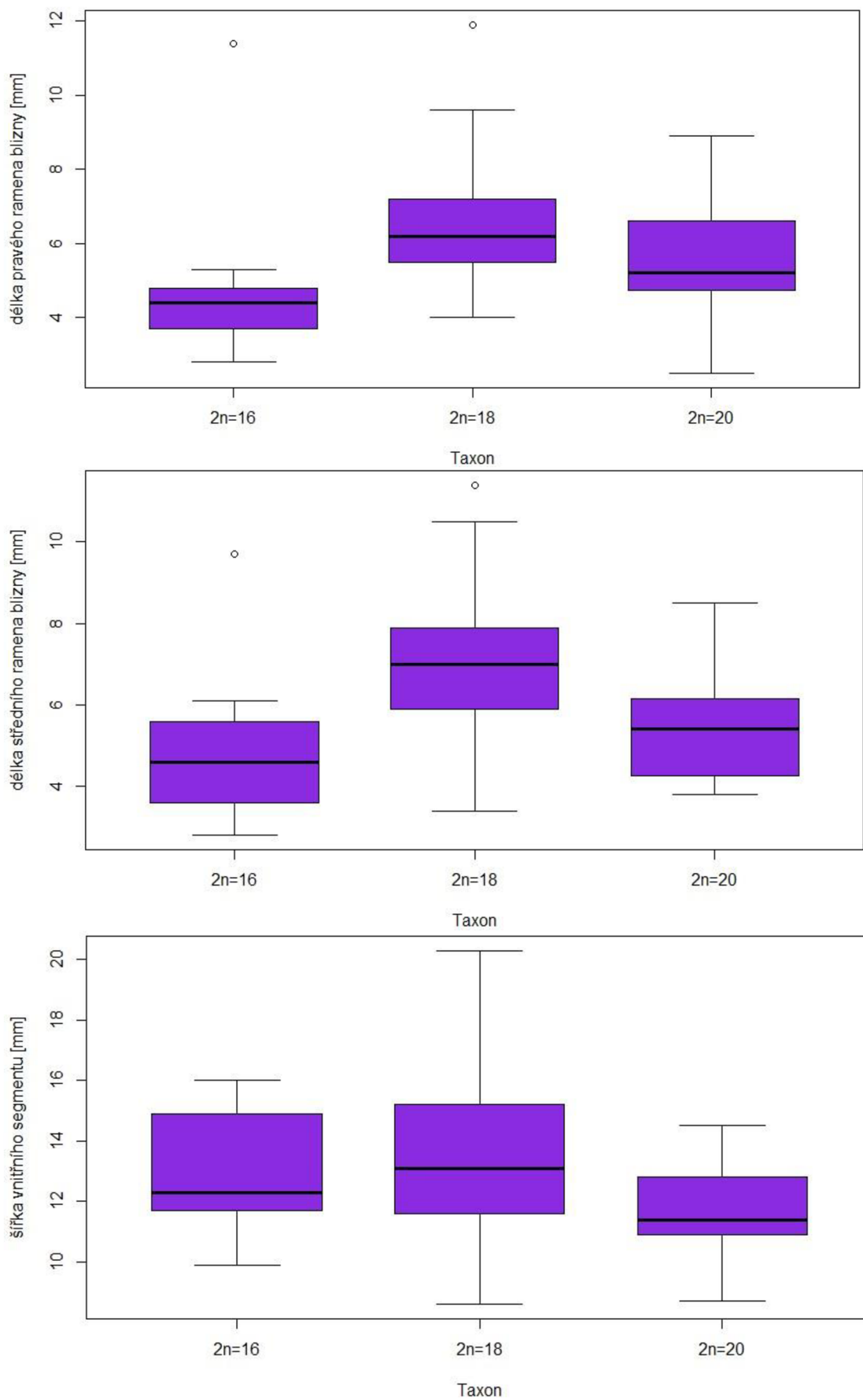
Obr. 9: Variabilita kvantitativních morfologických znaků porovnávaná mezi jednotlivými cytotypy. Tělo boxplotu znázorňuje mezikvartilové rozpětí, čára uvnitř těla představuje medián, „vousy“ udávají zbytek variability a kolečka odlehlé hodnoty.



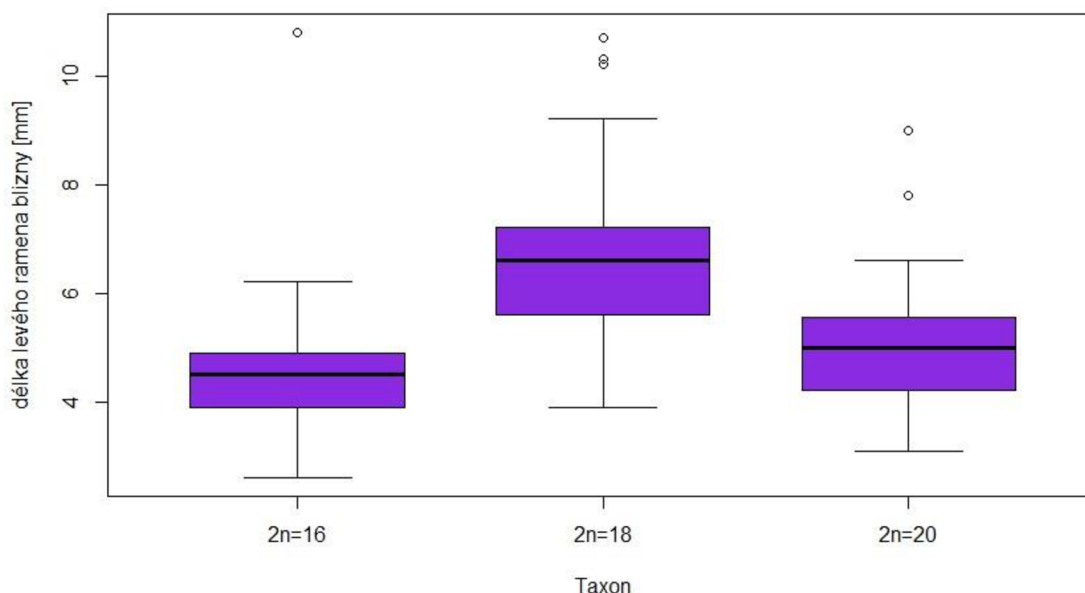
Obr. 10: Variabilita kvantitativních morfologických znaků porovnávaná mezi jednotlivými cytotypy. Tělo boxplotu znázorňuje mezikvartilové rozpětí, čára uvnitř těla představuje medián, „vousy“ udávají zbytek variability a kolečka odlehlé hodnoty.



Obr. 11: Variabilita kvantitativních morfologických znaků porovnávaná mezi jednotlivými cytotypy. Tělo boxplotu znázorňuje mezikvartilové rozpětí, čára uvnitř těla představuje medián, „vousy“ udávají zbytek variability a kolečka odlehle hodnoty.



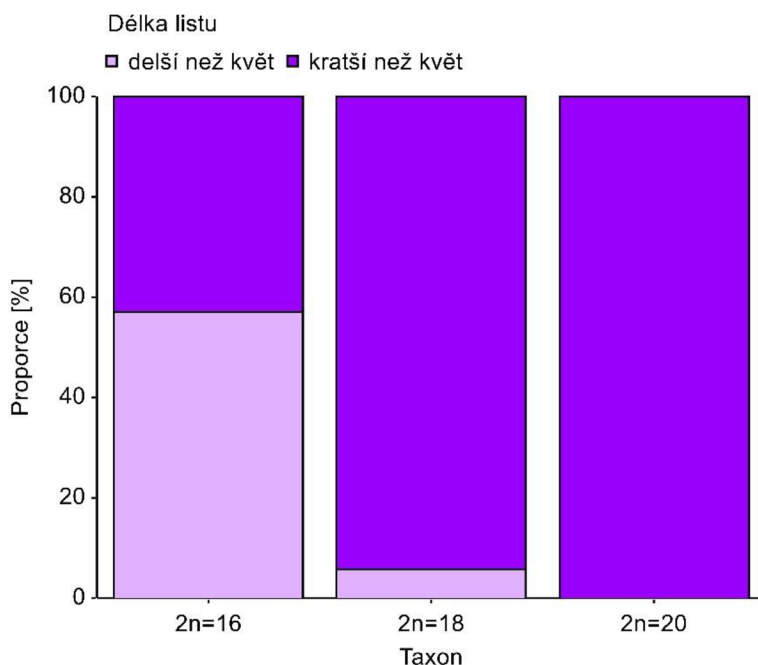
Obr. 12: Variabilita kvantitativních morfologických znaků porovnávaná mezi jednotlivými cytotypy. Tělo boxplotu znázorňuje mezikvartilové rozpětí, čára uvnitř těla představuje medián, „vousy“ udávají zbytek variability a kolečka odlehle hodnoty.



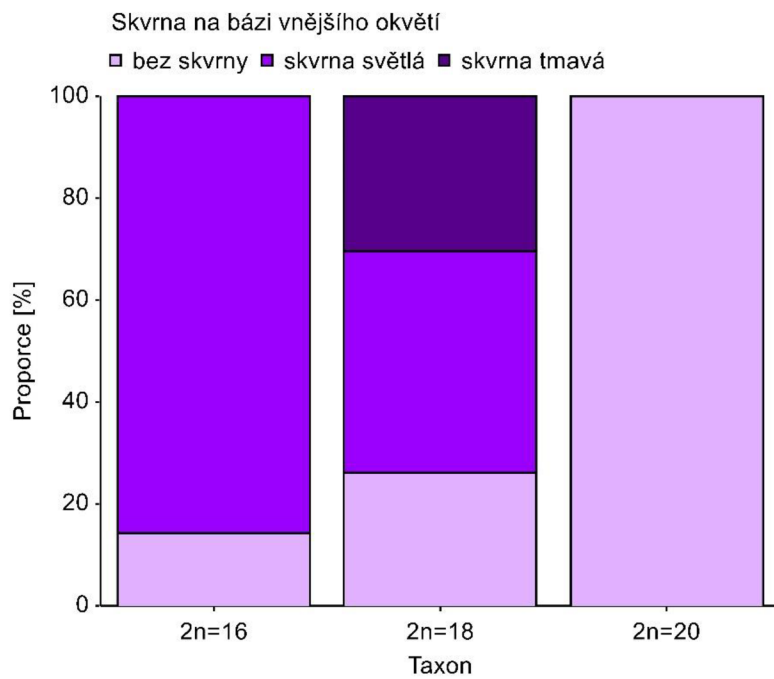
Obr. 13: Variabilita kvantitativních morfologických znaků porovnávaná mezi jednotlivými cytotypy. Tělo boxplotu znázorňuje mezikvartilové rozpětí, čára uvnitř těla představuje medián, „vousy“ udávají zbytek variability a kolečka odlehlé hodnoty.

5.2.2 Kvalitativní znaky

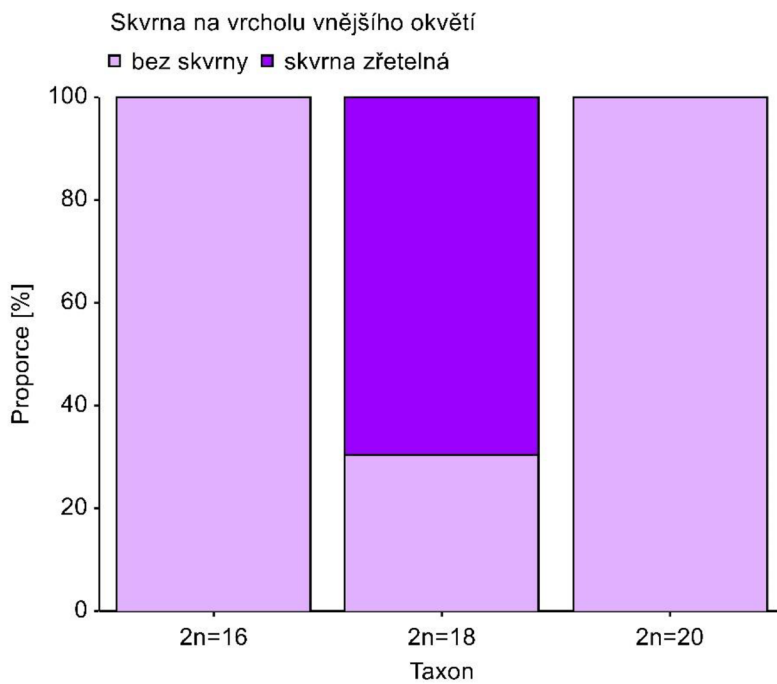
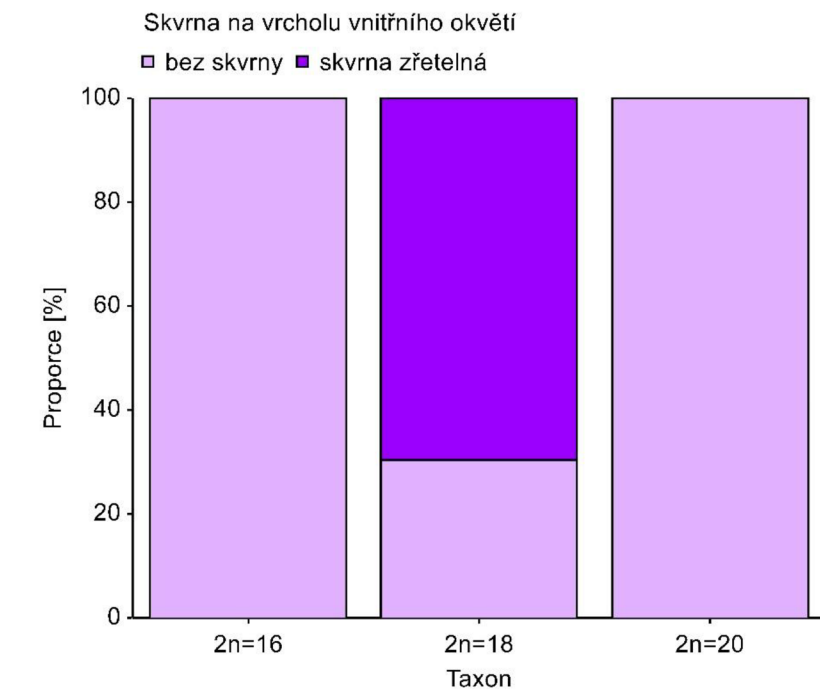
Chí-kvadrát test v kontingenčních tabulkách odhalil signifikantní rozdíly mezi jednotlivými cytotypy ve všech sledovaných kvalitativních znacích. Výsledky testu a proporci shrnují v Tab. 7. Proporce hodnot znaků a odlišnost skupin je znázorněna v proporčních sloupcových diagramech (Obr. 14–16).



Obr. 14: Proporce kvalitativních znaků srovnávaná mezi jednotlivými cytotypy.



Obr. 15: Proporce kvalitativních znaků srovnávaná mezi jednotlivými cytotypy.



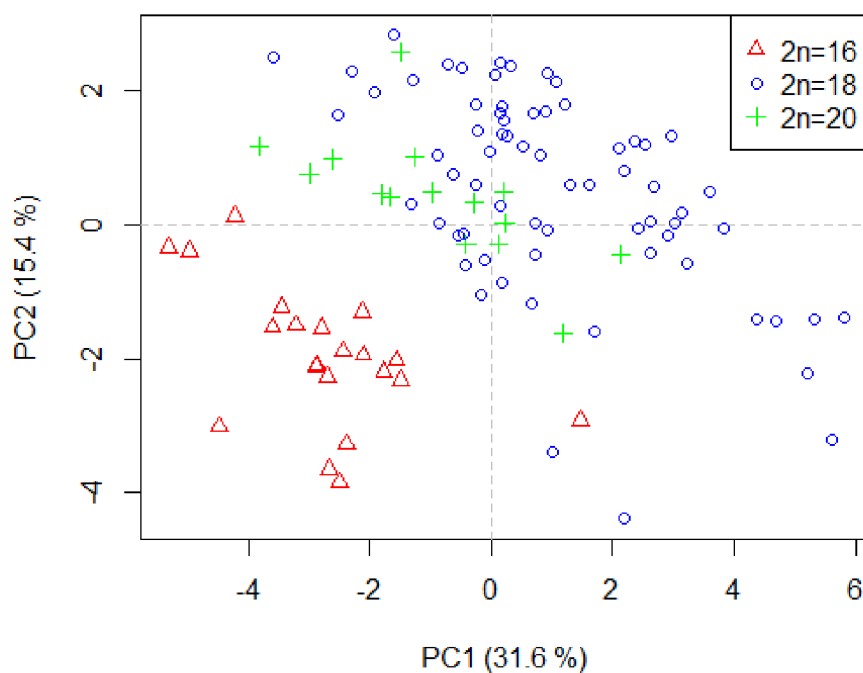
Obr. 16: Proporce kvalitativních znaků srovnávaná mezi jednotlivými cytotypy.

Tab. 7: Proporce hodnot kvalitativních znaků pro jednotlivé cytotypy a výsledky chí-kvadrát testu. Velikost vzorku je uvedena v závorkách u názvu cytotypu (2n = 16, 2n = 18, 2n = 20).

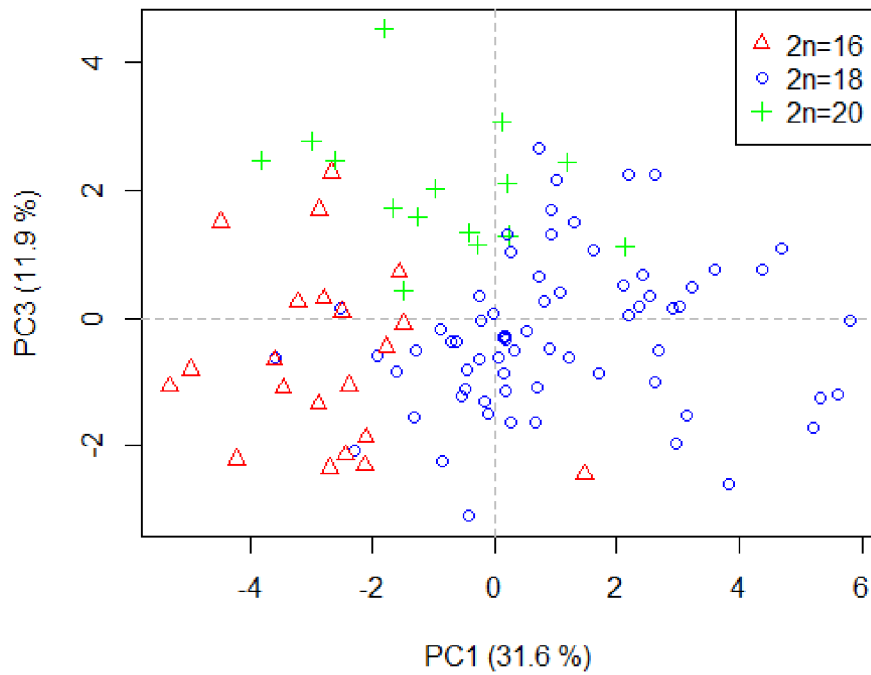
znak	hodnoty znaku	proporce %			χ^2	P
		2n = 16 (21)	2n = 18 (69)	2n = 20 (15)		
převyšování okvěť listy	ano	62	4	7	40.47	<0.001
	ne	38	96	93		
horní skvrna na vnějším cípu	chybí	100	30	100	46.13	<0.001
	tvar V	0	70	0		
	ve špičce	0	0	0		
horní skvrna na vnitřním cípu	chybí	100	30	100	46.13	<0.001
	tvar V	0	70	0		
	ve špičce	0	0	0		
spodní skvrna na vnějším cípu	chybí	14	26	100	47.93	<0.001
	tmavá	0	30	0		
	světlá	86	44	0		
spodní skvrna na vnitřním cípu	chybí	24	29	100	41.76	<0.001
	tmavá	0	32	0		
	světlá	76	39	0		

5.2.3 Mnohorozměrné analýzy

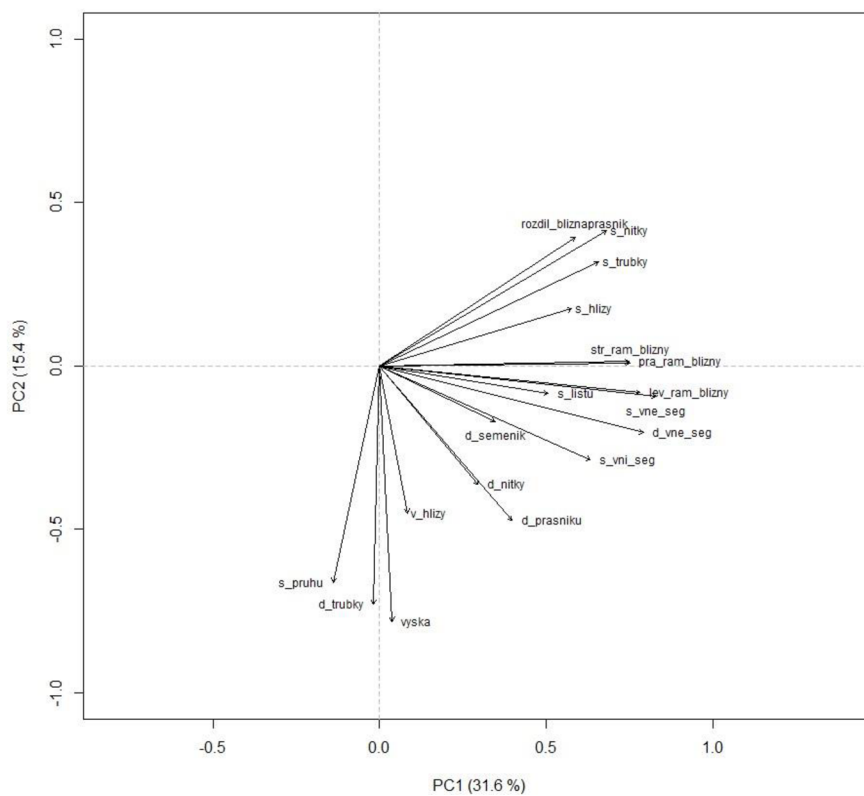
Pro analýzu hlavních komponent (PCA) jsem použil všechny kvantitativní znaky kromě délky vnitřního okvětního cípu, který po výpočtu Pearsonovy korelační matice výrazně koreloval s délkou vnějšího okvětního cípu. První osa vysvětluje 31,6 % variability a rozděluje jedince v ordinačním prostoru na dvě hlavní skupiny ($2n = 16$ a $2n = 18, 20$). S touto osou nejvíce korelují délky všech tří ramen blizny. Rozdělení na tyto dvě skupiny je však spíše šikmé a tímto směrem jej nejvíce podporuje šířka nitky, rozdíl výšky blizny a prašníku a šířka trubky. Druhá osa vysvětluje 15,4 % variability a nejvíce s ní koreluje výška rostliny a délka trubky. V případě zobrazení třetí osy, která vysvětluje 11,9 % variability se již objevilo rozlišení všech tří studovaných skupin. Nejvíce s ní korelovala výška rostliny a délka trubky. S první osou v tomto případě nejvíce korelovala šířka vnitřního okvětního cípu a šířka listu (Obr. 17–20).



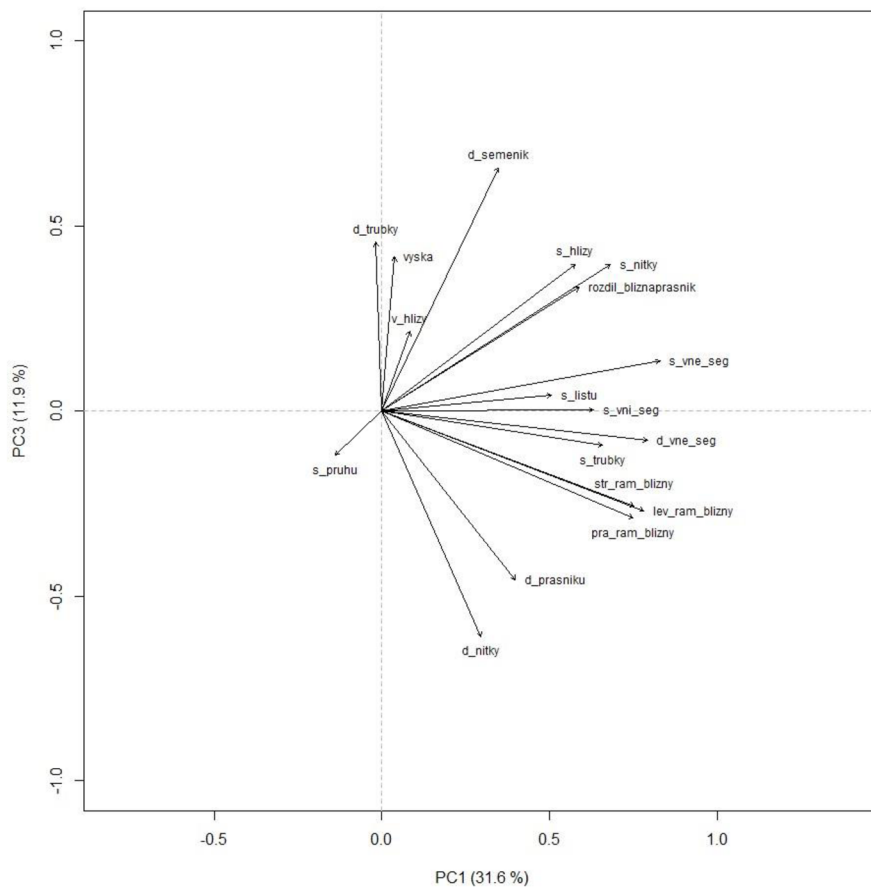
Obr.17: Rozdělení všech morfometricky měřených jedinců v ordinačním prostoru pomocí PCA podle os 1 a 2. Čísla v závorkách názvů u jednotlivých os udávají % vysvětlené variability.



Obr. 18: Rozdělení všech morfometricky měřených jedinců v ordinačním prostoru pomocí PCA podle os 1 a 3. Čísla v závorkách u jednotlivých os udávají % vysvětlené variability.



Obr. 19: Rozdělení morfologických kvantitativních znaků analyzovaných pomocí PCA v ordinačním prostoru podle os 1 a 2.



Obr. 20: Rozdělení morfologických kvantitativních znaků analyzovaných pomocí PCA v ordinačním prostoru podle os 1 a 3.

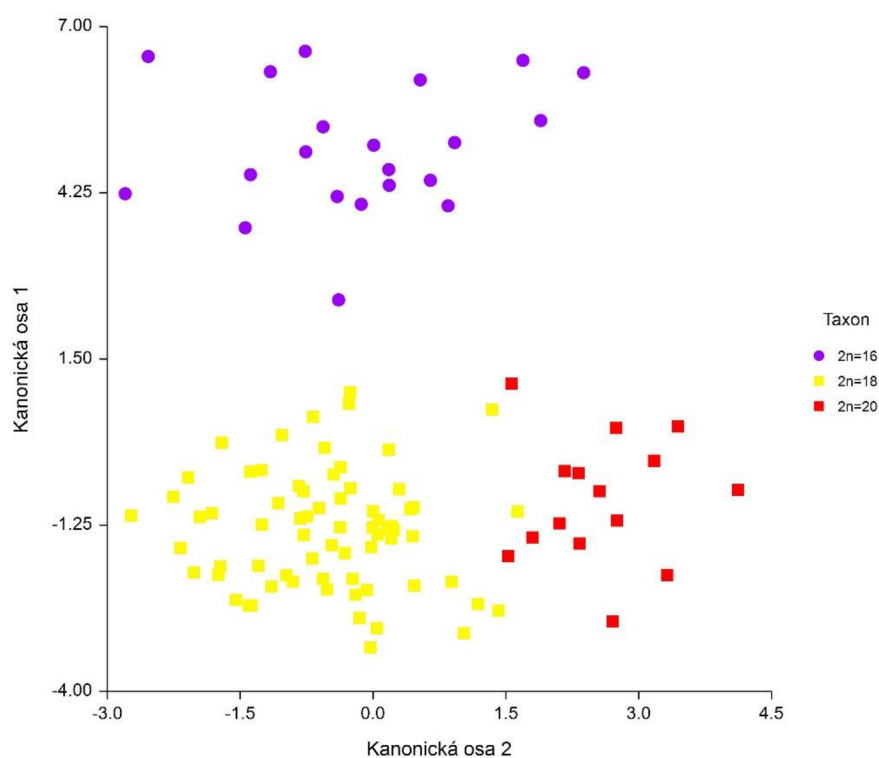
Při vyhodnocování kanonické diskriminační analýzy (CDA) byly použity všechny kvantitativní znaky kromě délky vnitřního okvětního cípu, která v Pearsonově korelační matici vysoce korelovala s délkou vnějšího okvětního cípu. Výsledky analýzy ukazují, že zjištěné cytotypy lze podle morfologických znaků spolehlivě odlišit. Pouze u $2n = 18$ a $2n = 20$ lze pozorovat mírný překryv (Obr. 21, Tab. 9) Nejlepšími znaky pro toto odlišení jsou šířka nitky, šířka bílého pruhu listu, šířka trubky a délka trubky.

Tab. 8: Hodnoty kanonických korelačních koeficientů s příslušnými osami CDA. Nejvíce korelované znaky jsou zvýrazněny tučně.

znak	osa 1	osa 2
výška	0.075412	-0.028228
výška hlízy	0.015096	0.111847
šířka hlízy	0.012438	0.110733
šířka listu	-0.080117	0.123063
šířka pruhu	3.192295	-0.44243
šířka trubky	0.257713	-0.614118
délka trubky	0.236849	0.343876
délka nitky	0.017849	-0.156241
šířka nitky	-5.261175	2.144791
délka prašníku	0.194506	-0.339549
rozdíl výšky blizny a prašníku	-0.187107	0.062857
délka semeníku	0.191632	0.096316
délka vnějšího okvětního cípu	-0.116485	0.012127
šířka vnějšího okvětního cípu	-0.34399	-0.555028
šířka vnitřního okvětního cípu	0.337213	0.325972
délka levého ramena blizny	-0.043018	-0.151648
délka středního ramena blizny	-0.210101	-0.216941
délka pravého ramena blizny	0.042484	0.258021

Tab. 9: Klasifikační tabulka udávající sílu diskriminační funkce pro rozlišení jednotlivých cytotypů. Redukce v klasifikační chybě při použití diskriminační analýzy, za předpokladu náhodné klasifikace jedinců činí 95,7 %.

Predikované	2n=16	2n=18	2n=20	celkem
Skutečné				
2n=16	21	0	0	21
2n=18	0	66	3	69
2n=20	0	0	15	15
celkem	21	66	18	105



Obr. 21: Kanonická diskriminační analýza všech kvantitativních morfologických znaků kromě délky vnitřního okvětního cípu.

6 Diskuse

6.1 Karyologie studovaných populací

Provedená karyologická šetření rozdělují sledované populace na základě velikosti genomu i počtu chromozomů na tři skupiny. U většiny populací, které česká floristická literatura řadí do druhu *C. heuffelianus* (Chrtek 2010, Popelářová et al. 2011) jsem zjistil počet $2n = 18$, které odpovídá allotetraploidnímu *C. discolor* ze západních Karpat, pokud bychom neuvažovali o velmi nepravděpodobné možnosti, že se jedná o *C. vittatus*, s nímž jsem zatím žádné srovnání neprováděl. Tento počet je tedy v souladu s dosud zjištěnými výsledky (Kulichová 2017, Popelářová et al. 2011). Obě patrně nepůvodní populace v Orlických horách (populace na Šajtavě pochází ze zplanění rostlin dovezených na začátku 50. let 20. století ze Západních Tater; J. Kučera, ústní sdělení) vykazovaly zvýšenou variabilitu ve velikosti genomu. Populace z Luisina údolí je navíc na první pohled vysoce variabilní také v morfologii, a to zejména v barvě okvěti. Je tedy možné, že rostliny pěstované a následně zplanělé jsou karyologicky variabilnější než přírodní. Nelze zcela vyloučit ani možnost, že se v populaci nachází více cytotypů nebo dokonce druhů. Potom by ani výše uvedené hodnoty v Tab. 9 nebyly úplně správně. Tato karyologicko-morfologická variabilita však nemusí být sama o sobě vždy důkazem nepůvodnosti výskytu dané populace. O tomto jsem se přesvědčil v případě lokality pod PR Úplaz, která se ukázala být dosti homogenní, ale přesto lze s jistotou říci, že původní na lokalitě není: v den morfometrického měření jsem se zde od místních obyvatel dozvěděl, že zdejší populace se rozrostla z několika málo hlíz dovezených v šedesátých letech minulého století ze Žiaru v Západných Tatrách na Slovensku. Nepůvodní populace tedy nemusí vznikat jen zplaněním (nebo vysazením) kulturních rostlin, ale také přenesením rostlin z přírodní geograficky odlehle populace. Podobným způsobem mohly vzniknout i další populace v CHKO Beskydy. Diskuse o původu jednotlivých populací *C. heuffelianus* s. lat. na území České republiky tak zůstává nadále z velké části otevřená.

Zajímavým výsledkem, který je v rozporu s veškerými literárními údaji, je počet chromozomů populace rostoucí v PR Hořina, u které jsem zjistil počet $2n = 20$. Ačkoli se podle určovacího klíče (Rukšāns 2017) nepochybně jedná o taxon ze studované série *Verni*, stejný počet chromozomů má pouze jediný cytotyp okruhu *C. heuffelianus* rostoucí ve Slovinsku označovaný někdy jako *C. exiguus* (Májovský et al. 1990, Rukšāns 2017). Jelikož i výsledky průtokové cytometrie vykazují větší variabilitu, zůstává otázkou, zda nejde jen o chromozomovou aberaci u části studovaných jedinců, která by tuto variabilitu vysvětlovala, protože předchozí výzkum odtud uvádí počet chromozomů $2n = 18$ (Chrtek 2010). K potvrzení této domněnky by ale byla potřeba podrobnější karyologická studie, tedy spočtení chromozomů většího počtu jedinců. O tom, že se podobné odchylky v populacích mohou vyskytnout, svědčí i studie autorů Rafiński et Passakas (1976 b), ve které řešili taxonomickou příslušnost rostlin *C. vernus* agg. z lokality Czarna Góra v jižním Polsku. V jednom karyotypu se objevila monosomie i trisomie. Otázkou zůstává, jak je tomu v PR Hořina. Jako možné vysvětlení původu populace se nabízí dávné umělé vysazení nebo zplanění z pěstovaných rostlin. Pokud by se v budoucnu ukázalo, že je tato populace cytotypově uniformní, a navíc morfologicky odlišná od západních populací *C. heuffelianus* agg., byl by to již silný argument pro oprávněnost tvrzení, že se o tento okruh nejedná.

Zplanělé či přímo zčásti pěstované populace odebrané ve městech Olomouc a Přerov se ve velikosti genomu mírně odlišovaly. U populace v Přerově jsem zjistil počet $2n = 16$, které odpovídá druhům *C. neglectus* a *C. tommasinianus* (Harpke 2014). Morfologické znaky, a to zejména šířka a tvar horní části okvětní trubky, však ukazují na *C. tommasinianus* (Harpke 2014, Rukšāns 2017). Zvýšenou variabilitu ve velikosti genomu zaznamenává ve své diplomové práci i Kulichová (2017), v níž studovala populaci rostoucí v NPP Babiččino údolí. V případě této práce si lze pravděpodobně důvod rozdílu ve velikosti genomu vysvětlit jako rozdílné kultivary, které mohly být základem pro vysazení či zplanění.

6.2 Morfologie studovaných populací

Analýza variance ukázala u sledovaných cytotypů signifikantní rozdíly ve většině použitých znaků. Podle Tukey-Kramerova testu pro tyto znaky lze odhalit, že populace z PR Hořina ($2n = 20$) se v několika znacích podobá spíše *C. tommasinianus*. Jedná se hlavně o šířku a délku trubky, délku okvětních cípů a ramen blizny. To považuji za jednu z mnoha indicií pro možné chybné zařazení této populace do okruhu *C. heuffelianus* v dodnes uveřejňované literatuře (Chrtek 2010, Popelářová et al. 2011). Výsledky však ukazují i znaky, u kterých mají rostliny z PR Hořina velmi podobné naměřené hodnoty, jako u populací *C. heuffelianus* ($2n = 18$). Jsou jimi šířka bílého pruhu na listu, šířka hlízy, šířka nitky a rozdíl ve výšce blizny a vrcholů prašníků.

Rozlišení všech tří studovaných skupin víceméně podporují obě použité mnohorozměrné analýzy. Analýza hlavních komponent dobře zobrazuje rozdělení jedinců na dvě hlavní skupiny. Cytotyp $2n = 16$, klasifikovaný zde jako *C. tommasinianus*, se dle těchto výsledků vyznačuje větší šířkou bílého pruhu na listech a delší okvětní trubkou. Naproti tomu se objevuje úzká nitka, menší rozdíl ve výšce blizny a prašníků, užší hlíza a horní část okvětní trubky. Tyto údaje souhlasí s informacemi v práci Rukšānse (2017). Novými znaky, kterými se od *C. heuffelianus* ($2n = 18$) dá odlišit, jsou šířka nitky, trubky a hlízy.

Kanonická diskriminační analýza přinesla podobný výsledek, nicméně lépe morfologicky vymezuje populaci z PR Hořina (cytotyp $2n = 20$) a populace *C. heuffelianus* (s. lat.) s $2n = 18$. V překryvu znaků obou skupin se nacházejí pouze tři jedinci. Dva z nich pocházejí z lokality pod Úplazem a jeden z Luisina údolí. K již zmíněným znakům odlišujících sledované cytotypy v této analýze přibývají také šířky okvětních cípů. Kdybychom ovšem nějakým způsobem kvantifikovali i znaky ve zbarvení okvěti a zahrnuli je do mnohorozměrných analýz, rozdíl by se jistě značně zvýraznil.

Zkoumání kvalitativních znaků ukázalo rovněž signifikantní rozdíly mezi jednotlivými cytotypy. Listy převyšovaly okvěti zejména u $2n = 16$ (*C. tommasinianus*), což souhlasí s údaji v práci Rukšānse (2017). V případě cytotypů $2n = 18$ (*C. heuffelianus* s. lat.) a $2n = 20$ (populace Hořina) převyšovaly listy okvěti jen velmi vzácně, i to však mohlo být způsobeno spíše pokročilou fází kvetení, v níž jsme navštívili například lokalitu pod PR Úplaz. Často se však objevovaly rostliny s dobře vyvinutými listy téměř dosahujícími vrcholu okvěti, což je zčásti v rozporu s tvrzením Májovského et al. (1990), kde je uvedeno, že západokarpatské populace *C. discolor* mají listy většinou v době květu slabě vyvinuté a zřídka dosahující báze okvěti.

Zbarvení okvěti bylo nejvariabilnější v rámci cytotypu $2n = 18$ (*C. heuffelianus* s. lat.). Na bázi okvěti se objevovala jak tmavá, tak světlá skvrna nebo chyběla. Zajímavá je však skutečnost, že tmavá skvrna tvaru „V“ v horní části okvětních cípů, která je podle veškeré dostupné literatury (např. Harpke et al. 2014, Mihaly et Cricsfalusy 1997, Mosolygó-I et al. 2016, Rukšāns 2017) typickým znakem okruhu *C. heuffelianus*, se asi ve třetině případů u tohoto cytotypu neobjevovala. Absenci tohoto znaku jsem zaznamenal například na lokalitě u Nového Hrozenkova, kde se objevilo pouze několik málo jedinců s náznakem skvrny. Na lokalitě v obci Horní Lomná jsem sice neprováděl morfometrické šetření z důvodu pozdní fenologické fáze v den návštěvy, některé rostliny však ještě dokvětaly a daly mi možnost fotodokumentace (Obr. 22). U této mikropopulace se objevuje pouze náznak tmavé skvrny podél střední žilky okvětního cípu.

Nejvariabilnější ve zbarvení i kresbě květů byla patrně nepůvodní populace z Luisina údolí v Orlických horách, kde se vyskytují jedinci s okvětem od velmi světlého beze skvrny, přes typické tmavofialové zbarvení s tmavou skvrnou v horní části až po úplně tmavé s dalšími kombinacemi těchto podob. V tomto případě asi nelze vyloučit ani hybridogenní původ části populace, tedy vznik porostu rostlin původně ze 2 různých taxonů. K testování této hypotézy by ovšem byla nutná mnohem podrobnější karyologická a/nebo molekulární analýza této variabilní populace.

Populace s $2n = 20$ v PR Hořina se vyznačuje jednoduše světle fialovými květy bez kresby, kde se pouze vnitřní a vnější okvětní cípy vyznačují rozdílnou intenzitou zbarvení. Těmito charakteristikami se blíží podobě rostlin ze studovaných nepůvodních populací *C. tommasinianus*, u nichž se však často vyskytovala světlá skvrna na bázi okvětních cípů. Kromě všech zmíněných morfologických znaků jsem u studovaných jedinců *C. tommasinianus* vyznamenal i odlišný tvar vrcholu okvětních lístků, který je spíše špičatý ve srovnání se zbylými dvěma cytotypy, které jej mají zaoblený nebo mírně vykrojený. Tento znak sice nebyl zahrnutý v datech této práce, nicméně je na první pohled zřejmý a v souladu se studovanou literaturou (Mihaly et Cricsfalusy 1997, Rukšāns 2017).



Obr. 22: Variabilita vybraných populací pozorovaná v terénních podmínkách. Foto autor, pokud není uvedeno jinak. *C. tommasinianus*, Přerov, foto Michal Hroneš (a), *C. heuffelianus* agg., Zubří, foto František Lamla (b), Nový Hrozenkov (c), Velké Heraltice (d), Deštné v Orlických horách (e), Horní Lomná (f).

7 Závěr

V této bakalářské práci jsem se zabýval variabilitou v morfologii a karyologii okruhu *Crocus heuffelianus* a dalších blízce příbuzných taxonů ze série *Verni*, které se u nás pouze pěstují a často zplaňují. Do svého studia jsem pro potřeby této práce zahrnul všechny populace, jejichž autochtonní původ na našem území ještě nelze vyloučit. K tomu jsem prováděl šetření na několika dalších populacích, o nichž je přímo známé, že vznikly z umělé výsadby.

Mým cílem bylo srovnat tyto populace pomocí měření morfologických znaků a velikosti genomu, zjistit jejich chromozomové počty a pokusit se tak objasnit, čím bývají charakteristické pěstované rostliny v kontrastu s těmi pravděpodobně původními.

Podle mých dosavadních předběžných šetření se zdá, že velikost genomu u studovaných populací odpovídá počtům chromozomů zjištěným klasickým počítáním. Zjistil jsem tak celkem tři cytotypy: $2n = 16, 18, 20$. Očekávaný počet chromozomů pro rostliny odpovídající morfologicky *C. heuffelianus* s. lat. byl $2n = 18$, což souhlasí se zjištěnými výsledky. Jedinou výjimku představuje lokalita PR Hořina, kde jsem u jedné studované rostliny napočítal $2n = 20$. Není však vyloučeno, že se jedná o chromozomovou aberaci. Rostliny z městské výsadby, které jsem v rámci této práce použil pro srovnání s hlavním studovaným okruhem (*C. heuffelianus* agg.), jsem podle zjištěného počtu chromozomů ($2n = 16$) a morfologických znaků zařadil do druhu *C. tommasinianus*.

V některých případech jsem zaznamenal vyšší variabilitu ve velikosti genomu i v rámci jedné populace. Většinou to bylo právě v případě (patrně) nepůvodních rostlin, což mě vedlo k domněnce, že právě vnitropopulační karyologická variabilita je jednou z indicií pro alochtonní původ na lokalitě. Podle této hypotézy bychom pak mohli hovořit i o výskytu v PR Hořina jako o nepůvodním. Tato zákonitost by však neplatila v případě introdukce, kdy jsou na lokalitu vysazovány rostliny z přírody. Velikost genomu by pak byla homogenní, což jsem pozoroval v případě populace rostoucí pod PR Úplaz. Na druhou stranu populace z lokality Šajtava v CHKO Orlické hory představuje značné úskalí pro tuto myšlenku. Pochází sice z rostlin přirozeně rostoucích na Slovensku, ale přesto vykazuje větší rozpětí ve velikosti genomu.

Všechny tři zjištěné cytotypy se podle použitých statistických testů vzájemně signifikantně morfologicky odlišují. Lze však konstatovat, že cytotyp z PR Hořina ($2n = 20$) je ve slabém překryvu morfologických znaků s cytotypem $2n = 18$ (tedy *C. heuffelianus* s. lat., přesněji patrně *C. discolor*). Všechny znaky, které podporují rozlišení mezi *C. tommasinianus* a *C. heuffelianus* s. lato, souhlasí se studovanou literaturou. Navíc se mi podařilo najít i nové znaky, kterými se dají rozeznat (šířka nitky a šířka okvětní trubky). Naproti tomu přítomnost tmavé skvrny tvaru velkého V ve špičce okvětního cípu, uváděná jako typický znak pro okruh *C. heuffelianus*, se u našich populací vyskytovala velmi proměnlivě. V případě lokality Luisino údolí vykazovala dokonce i vnitropopulační variabilitu. Až doposud veškerá literatura (Chrtěk 2010, Popelářová et al. 2011) řadila populaci z PR Hořina do okruhu *C. heuffelianus*. Ve své práci jsem však zaznamenal nezanedbatelný rozdíl, jak v morfologických, tak karyologických znacích, což považuji za své nejvýznamnější zjištění.

V budoucím výzkumu se chci věnovat zejména srovnání dosud studovaných populací s přirozeně se vyskytujícími rostlinami *C. discolor* na Slovensku či s dalšími taxony komplikované série *Verni* v jiných částech střední Evropy a v neposlední řadě také s často pěstovanými odrůdami této skupiny.

8 Literatura

- Abràmoff M. D., Magalhães P. J., Ram S. J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36–42.
- Brighton C. A. (1976) Cytological problems in the genus *Crocus* (*Iridaceae*): I. *Crocus vernus* aggregate. *Kew Bulletin* 31: 33–46.
- Doležel J. et Bartoš J. (2005) Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany* 95: 99–110.
- Doležel J., Greilhuber J. et Suda J. (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233–2244.
- Goldblatt P. et Takei M. (1997) Chromosome cytology of *Iridaceae*: patterns of variation, determination of base number, and modes of karyotype change. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 285–304.
- Grulich V. (2017) Červený seznam cévnatých rostlin ČR. *Příroda* 35: 75–132.
- Harpke D., Carta A., Tomović G., Randelović V., Randelović N., Blattner F.R. et Peruzzi L. (2014) Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus* ser. *Verni* (*Iridaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 301: 309–325.
- Harpke D., Meng S., Kerndorff H., Rutten T. et Blattner F.R. (2013) Phylogeny of *Crocus* (*Iridaceae*) based on one chloroplast and two nuclear loci: ancient hybridization and chromosome number evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 617–627.
- Hintze J. (2013) NCSS 9. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. www.ncss.com.
- Chrtek J., (2016) Distribution of *Crocus heuffelianus* in Czech Republic. In Kaplan Z. et al. (2016) Distributions of vascular plants in the Czech Republic. Part 2. *Preslia* 88: 263
- Chrtek J., (2010) *Crocus* L. – šafrán. In Štěpánková J. (Eds.). *Květena ČR*. Volume 8. Academia, Praha, Česká republika: 556–559.
- Kerndorff H., Pasche E. et Harpke D. (2015) The genus *Crocus* (*Liliiflorae*, *Iridaceae*): life-cycle, morphology, phenotypic characteristics, and taxonomical relevant parameters. *Stapfia* 103: 27–65.
- Koutecký P. (2015) MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. *Plant Systematics and Evolution* 301: 1115–1121.
- Krahulcová A. (1998) Karyologie cévnatých rostlin při aplikaci metod klasického barvení chromozómů. Ms., Průhonice, Česká republika.
- Kulichová A. (2017) Studie rodu *Crocus* (šafrán) v České republice a sousedních zemích. Ms. [Depon. in katedra ekologie, fakulta životního prostředí, Česká zemědělská univerzita v Praze].

- Májovský J., Murín A. et Hindáková M. (1990) Karyotaxonomic of Slovak populations of the genus *Crocus*. Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Comenianae Botanica 38: 49–87.
- Mathew B., (1982) The Crocus. A Revision of the Genus *Crocus* (Iridaceae). Timber Press, Portland, Oregon, United States of America.
- Maw G. (1886) A monograph of the genus *Crocus*. Dulau and Co., London, Great Britain.
- Mihaly A. et Kricsfalusy V. (1997) Population biology and ecology of *Crocus heuffelianus* Herb. (Iridaceae) in Ukraine. Linzer Biol Beitr 29: 641–681.
- Mosolygó-I Á., Sramkó G., Barabás S., Czeglédi L., Jávora A., Molnár A. et Surányi G. (2016) Molecular genetic evidence for allotetraploid hybrid speciation in the genus *Crocus* L. (Iridaceae). Phytotaxa 258: 121–136.
- Peruzzi L., Carta A. et Garbari F. (2013) Lectotypification of the name *Crocus sativus* var. *vernus* L. (Iridaceae) and its consequences within the series *Verni*. Taxon 62: 1037–1040.
- Petersen G., Seberg O., Thorsøe S., Jørgensen T. et Mathew B. (2008) A phylogeny of the genus *Crocus* (Iridaceae) based on sequence data from five plastid regions. Taxon 57: 487–499.
- Popelářová M., Koutecký P. et Krupa M. (2011) Šafrán karpatský (*Crocus heuffelianus* Herbert) na východní Moravě. Acta Carpatica Occidentalis 2: 41–50.
- Raca I., Harpke D., Shuka L. et Randelović V. (2020) A new species of *Crocus* ser. *Verni* (Iridaceae) with 2n = 12 chromosomes from the Balkans. Plant biosystems: 1–7.
- Raca I., Jovanović M., Ljubisavljević I., Jusković M. et Randelović V. (2019) Morphological and leaf anatomical variability of *Crocus* cf. *heuffelianus* Herb. (Iridaceae) populations from the different habitats of the Balkan Peninsula. Turkish Journal of Botany. 43: 645–658.
- Raca I., Ljubisavljević I., Jušković M., Randelović N. et Randelović V. (2017) Comparative anatomical study of the taxa from series *Verni* Mathew (*Crocus* L.) in Serbia. Biologica Nyssana 8: 15–22.
- Rafiński J. N. et Passakas T. (1976 a) Chromosomal differentiation within *Crocus vernus* agg. (Iridaceae) in the Carpathian Mts. Plant Systematics and Evolution 125: 1–8.
- Rafiński J. N. et Passakas T. (1976 b) A contribution to the karyology of *Crocus vernus* agg. (Iridaceae) from the Iserian Mts. (Sudety Mts., Poland). Plant Systematics and Evolution 125: 9–13.
- Rudall P. et Mathew B. (1990) Leaf anatomy in *Crocus* (Iridaceae). Kew Bulletin 45: 535–544.

Rudall P. J., Owens S.J. et Kenton A.Y. (1984) Embryology and breeding systems in *Crocus* (*Iridaceae*) – a study in causes of chromosome variation. *Plant Systematics and Evolution* 148: 119–134.

Rukšāns J. (2017) *The world of Crocuses*. Latvian Academy of Sciences, Riga, Latvia.

Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat Methods* 9: 671–675.

Skalinska M. (1968) Further cytological studies on the genus *Crocus* L., *C. albiflorus* Kit. *Acta Biologica Cracoviensia, Series: Botanica* 11: 31–37.

Skalinska M. (1966) Cytotaxonomic studies in the genus *Crocus* L. *Acta Biologica Cracoviensia, Series: Botanica* 9: 137–152.

Příloha 1: Informace o studovaných lokalitách

Lokalita	zkratka	GPS	počet jedinců	druh šetření	datum sběru
Botanická zahrada Přf UPOL	OLO	49.5860633N, 17.2496458E	6	morfometrika, průtoková cytometrie	04.03.2021
PR Hořina, Velké Heraltice	HOR	49.9994069N, 17.7276167E	15	morfometrika, průtoková cytometrie, počet chromozomů	26.03. 2021, 05.03.2022
MŠ Radost, Přerov	PRE	49.4543594N, 17.4588667E	15	morfometrika, průtoková cytometrie, počet chromozomů	26.03.2021
Břehy Hodorfského potoka, Zubří	ZUB	49.4901981N, 18.0887950E	15	morfometrika, průtoková cytometrie	10.04.2021
Protějšší svah u PR Úplaz, Horní Lomná	UPL	49.5261728N, 18.6581608E	12	morfometrika, průtoková cytometrie	25.04.2021
Luční enkláva blízko potoka Lomná, Horní Lomná	HLO	49.5206500N, 18.6315844E	8	průtoková cytometrie	25.04.2021
Sjezdovka nedaleko chaty Kohútka, Nový Hrozenkov	HRO	49.2959133N, 18.2406336E	15	morfometrika, průtoková cytometrie	28.04.2021
Luční enkláva, nejbližší místní název Na Člověčí, Velké Karlovice	CLO	49.3905661N, 18.3569478E	4	průtoková cytometrie, počet chromozomů	28.04.2021
Les u osady Zdobnická Seč blízko chaty Šajtava, Zdobnice	SAJ	50.2513119N, 16.4013158E	12	morfometrika, průtoková cytometrie	01.05.2021
Luisino údolí, Deštné v Orlických horách	DES	50.2871500N, 16.3886242E	15	morfometrika, průtoková cytometrie	01.05.2021

Příloha 2: Pearsonova korelační matice pro kvantitativní morfologické znaky

	v	v_h	s_h	s_l	s_pru	s_t	d_t	d_n	s_n	d_pra	r_bpr	d_s	d_v_seg	s_v_seg	s_v_seg	l_r_bl	s_r_bl	p_r_bl
v	1	0.34	-0.04	0.00	0.28	-0.18	0.87	0.08	-0.14	0.11	-0.13	0.33	0.16	0.13	0.20	0.03	-0.02	-0.04
v_h	0.34	1	0.18	0.07	0.37	-0.24	0.27	0.10	0.10	0.14	0.09	0.15	0.17	-0.10	-0.16	0.17	0.10	0.04
s_h	-0.04	0.18	1	0.25	-0.09	0.29	0.01	-0.09	0.61	0.05	0.54	0.32	0.36	0.43	0.20	0.34	0.33	0.32
s_l	0.00	0.07	0.25	1	0.22	0.34	-0.06	0.17	0.27	0.11	0.31	0.21	0.27	0.45	0.45	0.34	0.25	0.22
s_pru	0.28	0.37	-0.09	0.22	1	-0.34	0.24	0.17	-0.37	0.31	-0.28	-0.04	-0.06	-0.10	0.11	-0.08	-0.07	-0.13
s_t	-0.18	-0.24	0.29	0.34	-0.34	1	-0.24	0.17	0.53	0.17	0.38	0.10	0.50	0.58	0.47	0.38	0.37	0.34
d_t	0.87	0.27	0.01	-0.06	0.24	-0.24	1	0.02	-0.15	0.04	-0.15	0.29	0.09	0.12	0.15	-0.03	-0.10	-0.04
d_n	0.08	0.10	-0.09	0.17	0.17	0.17	0.02	1	-0.17	0.44	-0.05	-0.17	0.42	0.11	0.15	0.39	0.30	0.32
s_n	-0.14	0.10	0.61	0.27	-0.37	0.53	-0.15	-0.17	1	-0.05	0.67	0.39	0.43	0.51	0.21	0.38	0.45	0.41
d_pra	0.11	0.14	0.05	0.11	0.31	0.17	0.04	0.44	-0.05	1	-0.14	-0.01	0.48	0.37	0.44	0.34	0.30	0.30
r_bpr	-0.13	0.09	0.54	0.31	-0.28	0.38	-0.15	-0.05	0.67	-0.14	1	0.25	0.39	0.40	0.08	0.35	0.36	0.37
d_s	0.33	0.15	0.32	0.21	-0.04	0.10	0.29	-0.17	0.39	-0.01	0.25	1	0.25	0.37	0.33	0.11	0.08	0.04
d_v_seg	0.16	0.17	0.36	0.27	-0.06	0.50	0.09	0.42	0.43	0.48	0.39	0.25	1	0.67	0.50	0.56	0.50	0.53
s_v_seg	0.13	-0.10	0.43	0.45	-0.10	0.58	0.12	0.11	0.51	0.37	0.40	0.37	0.67	1	0.82	0.48	0.48	0.45
s_v_seg	0.20	-0.16	0.20	0.45	0.11	0.47	0.15	0.15	0.21	0.44	0.08	0.33	0.50	0.82	1	0.35	0.32	0.31
l_r_bl	0.03	0.17	0.34	0.34	-0.08	0.38	-0.03	0.39	0.38	0.34	0.35	0.11	0.56	0.48	0.35	1	0.78	0.83
s_r_bl	-0.02	0.10	0.33	0.25	-0.07	0.37	-0.10	0.30	0.45	0.30	0.36	0.08	0.50	0.48	0.32	0.78	1	0.78
p_r_bl	-0.04	0.04	0.32	0.22	-0.13	0.34	-0.04	0.32	0.41	0.30	0.37	0.04	0.53	0.45	0.31	0.83	0.78	1