

Pcháč Sudův – nejvzácnější ze vzácných kříženců

Pcháče (rod *Cirsium*) jsou ostnitě byliny domácí na severní polokouli. S více než 400 druhy patří k druhově nejbohatším rodům čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*). Většina druhů pcháčů se vyskytuje ve Středozeří a v Íránsko-turanské oblasti (západní a střední Asii) – tedy v územích, kde bychom našli i většinu jejich nejbližších příbuzných z tribu *Cardueae*, zahrnujícího rody bodlák (*Carduus*), pupava (*Carlina*), bělotrn (*Echinops*), ostropek (*Onopordum*), bodlinatý (*Ptilostemon*) a dalších více než 70 rodů, které jsou vesměs rovněž ostnitě. Mnoho pcháčů je však domácích také ve východní Asii nebo v Severní a Střední Americe – v oblastech, kde se z ostatních rodů tribu *Cardueae* vyskytují většinou jen druhy zavlečené. V Evropě roste téměř 70 druhů pcháčů, z toho je v České republice původních 11. Častým mezidruhovým křížením (hybridizací) přitahují pcháče pozornost přírodovědců po staletí – upoutaly jak zakladatele moderní klasifikace rostlin Carla Linného, který je zmiňuje v díle *Plantae hybridae*, tak zakladatele genetiky Gregora Johanna Mendela, jenž je používal pro některé hybridizační pokusy.

Pro většinu lidí je představa tohoto rodu spojena s obtížnými plevelnými a invazními druhy – pcháčem osetem (*C. arvense*) nebo p. obecným (*C. vulgare*) – které se přispěním člověka rozšířily prakticky po všech kontinentech, kromě Antarktidy. Převážná většina pcháčů má však areály mnohem menší a stenoendemismus (endemity s velmi malým areálem) není v tomto rodě vzácností – zejména ve vztahu k horským oblastem. Na plošně velice malé horské masivy jsou např. v Evropě omezeny *C. alpis-lunae* – endemit severoapeninského pohoří Alpe della Luna, *C. lacaitae* – endemit masivu Monti Lattari při Neapolském zálivu, nebo *C. bertolonii* v Apuánských Alpách. Na rozsáhlejší evropská pohoří

jsou vázány pcháče jako *C. gregarium* – pohoří jižního Španělska, *C. appendiculatum*, *C. hypopsilum*, *C. mairei*, *C. heldreichii* a *C. tymphaeum* – všechny najdeme jen v pohoří Balkánu. V Pyreneích nalezneme *C. glabrum*, zatímco pouze v Alpách roste jeho příbuzný p. nejostnitější (*C. spinosissimum*). Podobnou geografickou vikarianci (vzájemné nahrazování příbuzných druhů či poddruhů) vykazují také pyrenejský endemit *C. rufescens* a jeho příbuzný pcháč kraňský (*C. carnolicum*), omezený na východní Alpy (na obr. 1 žlutě). Další takovou dvojici tvoří východo- a jihokarpatský pcháč Waldsteinův (*C. waldsteinii*) a jeho příbuzný p. Greimlerův (*C. greimieri*), vázaný na východní Alpy a Dinaridy

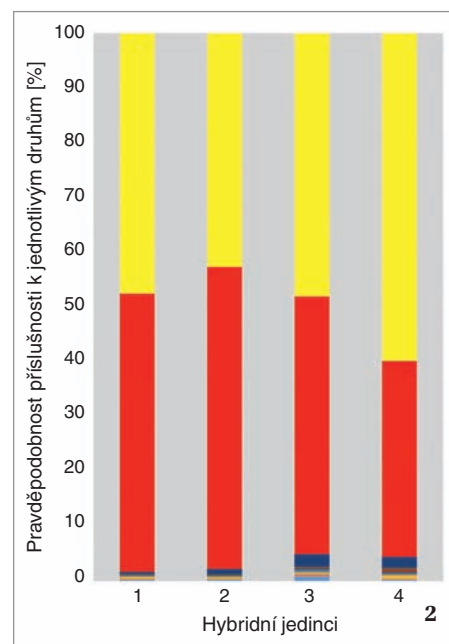
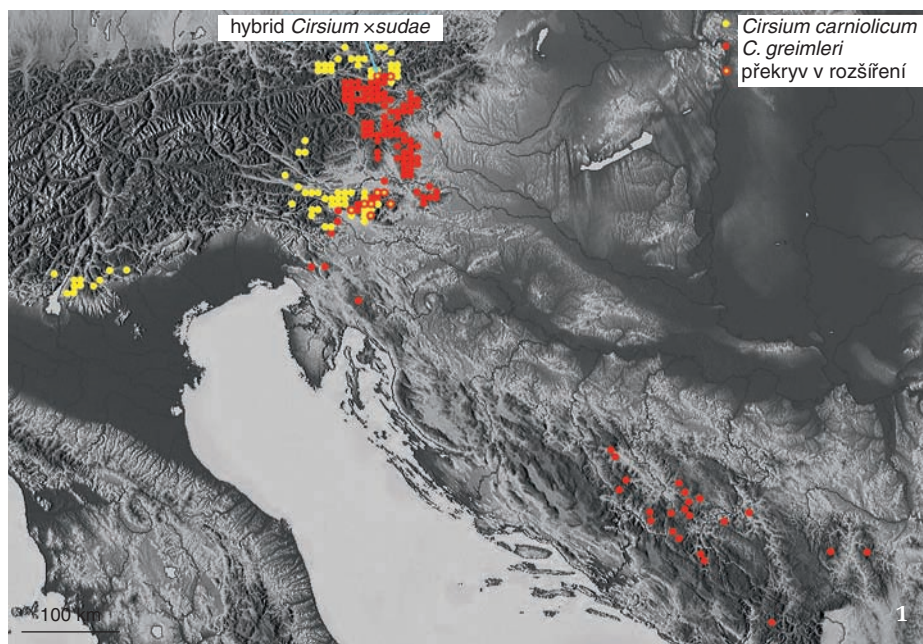
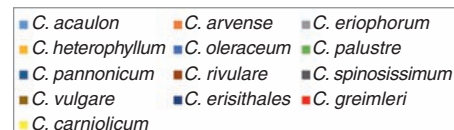
(na obr. 1 červeně). Horské masivy tak pro pcháče často představují jakési ostrovy, na nichž jsou jejich druhy geograficky izolovány od příbuzných. Tím je omezen až vyloučen mezidruhový genový tok daný hybridizací, která by v konečném důsledku mohla vést k jejich splnutí v jeden druh. To však platilo dříve, než člověk začal výrazněji měnit krajinu, vegetační kryt a druhové složení na místech, která si přizpůsoboval pro své potřeby. Jeho vlivem se mnohé pcháče, především druhy luční – např. p. šedý (*C. canum*), p. různolistý (*C. heterophyllum*), p. zelinný (*C. oleraceum*), p. bahenní (*C. palustre*) nebo p. potokní (*C. rivulare*), začaly potkávat mnohem častěji, než tomu bylo v původní převážně lesnaté krajině. Proto dnes jejich křížence v přírodě najdeme poměrně často. Naopak zejména horské druhy, jejichž výskyt a rozšíření člověk svými zásahy spíše omezil, hybridizují vzácněji.

Někdy můžeme mít štěstí...

Když jsme se v r. 2016 vypravili do Ennstalských Alp v Rakousku na rutinní odběr genetických vzorků pcháče kraňského, zasažla šťastná náhoda. V této části pásma Severních vápencových Alp rostou pcháče

1 Areály pcháče kraňského (*Cirsium carnolicum*, žlutě) a p. Greimlerova (*C. greimieri*, červeně); červenožlutě jsou vyznačena místa, kde se rozšíření těchto druhů překrývají; lokalita nálezů jejich křížence – pcháče Sudova (*C. x sudae*), je označena modrou šipkou. Výřez mapy zahrnuje východní Alpy a Dinaridy. Podklad pro mapu převzat z <https://maps-for-free.com/>. Orig. P. Bureš

2 Diagram vyjadřující pravděpodobnosti, s jakými hybridní jedinci patří k potenciálním rodičovským druhům značeným různými barvami. Každý hybridní jedinec znázorněn jedním sloupcem, číslovaným 1 až 4. Blíže v textu. Orig. E. Michálová





kraňský a p. Greimlerův, které se takto překrývají už jen v pásu Jižních vápencových Alp při rakousko-slovenské hranici – v Karavankách a Kamnických Alpách (obr. 1). To ale neznamená, že kam se zde podívá-

me, tam nacházíme oba druhy pohromadě. Pokud nevíme, kde je hledat, můžeme chodit celé týdny a nenarazíme ani na jeden z nich. Navíc se předpokládá, že se v přírodě nemohou potkat, protože jsou

odlišné ekologicky – pcháč kraňský je považován za druh rostoucí výhradně na vápenci, p. Greimlerův naopak za druh kyselých substrátů. Na základě našich pozorování v terénu však můžeme říci, že to



3 Habitus pcháče Sudova (prostřední sloupec – b, e, h) a jeho rodičů – pcháče kraňského (vlevo – a, d, g) a p. Greimlerova (vpravo – c, f, i). Terminální, tedy nejvýše na lodyze postavený úbor (a, b, c; měřítko 1 cm), terminální soubor úborů (d, e, f; měřítko 1 cm) a celkový vzhled (g, h, i; měřítko 10 cm)

4 Vysokobylinná horská niva s dominantním pcháčem Greimlerovým na jižních svazích nad horskou chatou Winterleitenhütte v rakouských Lavantalských Alpách. Na podobném typu stanovišti roste i p. kraňský. Foto: P. Bureš (obr. 3a, c, d, h, i; 4) a J. Šmerda (3b, e–g)

neplatí vždy, protože p. Greimlerův se může ojediněle vyskytovat i na vápenci.

Z početnější populace pcháče kraňského poblíž osady Kölblwirt, na kterou nás upozornili kolegové z vídeňské univerzity, jsme již dříve odebírali genetické vzorky. Nicméně v r. 2016 jsme chtěli prostudovat vedle p. kraňského také jeho křížence s p. lepkavým (*C. erisithales*), proto jsme procházeli celou populaci pozorněji. Narazili jsme přitom na malý klon p. Greimlerova, jehož jsme si při dřívějších návštěvách nevšimli; poblíž jsme navíc objevili i čtyři rostliny, které vykazovaly morfologicky přechodný vzhled (fenotyp) mezi p. kraňským a p. Greimlerovým naznačující, že by mohlo jít o dosud nepopsaného křížence těchto druhů. Chceme-li však hybrid skutečně bezpečně určit, nelze se zcela spoléhat na morfologii. Hybridy nestojí ve všech morfologických znacích vždy jen uprostřed rodičovských fenotypů, ale konkrétní jedinci jsou spíše náhodnou mozaikou libovolného stavu znaků jejich rodičů – jakýmsi kombinatorickým součinem rozsahu rodičovských variabilit. V dnešní době se už naštěstí nemusíme spoléhat jen na morfologii a svůj (ne vždy správný) úsudek. Díky nejrozličnějším molekulárním metodám máme možnost domněle hybridy zkoumat přímo na úrovni DNA a jejich původ spolehlivě prověřit.

Metoda AFLP

Délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism, podrobněji viz např. Fér 2011) se stal osvědčenou metodou při zkoumání hybridů. V dnešní době je již postupně nahrazován modernějšími metodami založenými na sekvenování nové generace (NGS – Next Generation Sequencing), které jsou přesnější a poskytují mnohem více informací. Pokud však jde o ověření hybridního původu zkoumaných jedinců a jejich příslušnosti k rodičovským druhům, dosáhneme s oběma metodami stejně spolehlivé odpovědi na otázku: Je zkoumaný jedinec hybrid? Jsou konkrétní druhy jeho rodiči? AFLP ale bude i dnes stále ještě levnější a její laboratorní i počítačové analýzy nepoměrně jednodušší. Princip této metody spočívá v restrikci čili rozstřihání celogenomové DNA (která zahrnuje jak DNA obsaženou v jádrech buněk, tak DNA mitochondrií a chloroplastů) na fragmenty za pomoci restrikčních enzymů a jejich následné selektivní amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí (PCR – Polymerase Chain Reaction). Díky ní na konci zbydou z původního nepřeberného množství úseků DNA pouze desítky až stovky, tedy soubor, který je dostatečně reprezentativní, ale zároveň se v něm dá dostatečně dobře orientovat. Vzniklé fragmenty jsou posléze v každém vzorku rozříděny podle velikosti a jednotlivé vzorky tak mezi sebou můžeme porovnat na základě přítomnosti (1), či nepřítomnosti (0) příslušných fragmentů. Na rozdíl od metod založených na NGS tedy nemáme informaci přímo na úrovni DNA sekvenace, ale v podobě velké matice jedniček a nul, z níž se dá spočítat řada věcí, např. genetická odlišnost mezi vzorky.

Hledání potenciálních rodičů

Při hledání potenciálních rodičů hybrida však nestačí zahrnout jen dvojici morfologicky nejpravděpodobnějších rodičů. U pcháčů totiž nelze nikdy vyloučit, že daný hybridní jedinec obsahuje geny více

než jen dvou druhů – různých trojnásobných hybridů bylo v tomto rodu zaznamenáno více než 30. „Potenciálním pachatelem“ mohl být v tomto směru zejména p. lepkavý, rostoucí v populaci u Kölblwirtu hojně všude kolem, o němž jsme navíc věděli, že v přírodě jak s p. Greimlerovým, tak s p. kraňským hybridizuje velmi ochotně. Pro ověření původu domnělých kříženců a jejich příslušnosti k rodičovským druhům pomocí AFLP jsme tedy na lokalitě u Kölblwirtu kromě vzorků čtyř domnělých kříženců sebrali i vzorky všech druhů pcháčů, které se tu vyskytovaly – p. kraňského, p. Greimlerova a p. lepkavého. Nemohli jsme vyloučit ani podíl jiných druhů pcháčů rostoucích v mnohem širším okolí. Důvodem pro opatrnost není ani tak možnost dálkového přenosu pylu, který dosahuje v případě pcháčů opylovaných hmyzem do desítek až stovek metrů, ale transport nažek, které mohou být díky chmýru přeneseny větrem z místa svého vzniku do vzdáleností řádově jednotek až desítek kilometrů. Do analýzy jsme proto zahrnuli všechny druhy pcháčů, které se v Ennstalských Alpách a jejich okolí vyskytují, a mohly při vzniku domněle hybridních jedinců hrát roli – pcháč bezlodyžný (*C. acaulon*), p. oset, p. bělohlavý (*C. erio-phorum*), p. různolistý, p. zeliný, p. bahenní, p. panonský (*C. pannonicum*), dále p. potoční, p. nejostnitější a p. obecný. Analyzovali jsme tedy čtyři vzorky domnělých hybridů a 18 až 24 vzorků morfologicky „čistých“ (nehybridních) jedinců za každý z 13 druhů – celkem 283 jedinců.

Data získaná z tohoto souboru metodou AFLP jsme hodnotili pomocí programu Structure. Tento program dokáže (kromě jiného) spočítat pravděpodobnost, s jakou domnělý hybridní jedinec patří k jednomu každému z 13 analyzovaných druhů. To znamená, že pro každého domnělého křížence získáme 13 takových pravděpodobností (na obr. 2 jsou značeny různými barvami). Provedená analýza odhalila, že čtyři jedinci nalezení u Kölblwirtu jsou

skutečně hybridy, na jejichž vzniku se s výraznou a přibližně rovnocennou pravděpodobností jako rodičovské druhy podílely pcháč kraňský a p. Greimlerův. Nepotvrdila, že by se na jejich vzniku podílel jakýkoli z ostatních pcháčů vyskytujících se v Ennstalských Alpách a jejich okolí, včetně p. lepkavého. V grafu sice můžeme vidět nepatrné pravděpodobnosti, s jakými by kříženci mohli patřit i k jiným než rodičovským druhům, nejvyšší z těchto pravděpodobností se však pohybují okolo 2 % – zůstávají tedy pod úrovní statistické chyby programu. Dále můžeme vidět, že zatímco u prvních tří hybridů je poměr pravděpodobností příslušnosti k rodičům zhruba 1 : 1 – jde tedy zřejmě o primární hybridy F_1 – v případě čtvrtého hybridu (obr. 2 zcela vpravo) je trochu vychýlen ve prospěch p. kraňského, mohl by tedy představovat zpětného hybridu [(*C. carniolicum* × *C. greimleri*) × *C. carniolicum*]. Mohlo by jít i o jedince další hybridní generace ($F_2 = F_1 \times F_1$), jemuž daly vzniknout takové gamety, v nichž důsledkem náhodné segregace převládly chromozomy p. kraňského.

Nový kříženec a jeho zdánlivá sterilita
Kříženec *C. carniolicum* × *C. greimleri* z lokality Kölblwirt sdílí se svými rodiči charakteristické velké, široce vejčité a mělce laločnaté listy s měkkými krátkými ostny (obr. 3 g, h, i). Tento charakter listů není

u pcháčů častý a souvisí patrně s typem stanoviště, kde druhy s takovými listy rostou – světlé horské lesy a vysokobylinné horské nivy (obr. 4). Dalším znakem, který prozrazuje příslušnost hybridu k oběma rodičům, jsou jeho bělavě růžové květy (obr. 3 b, e), mající původ v krémově bílých květech p. kraňského (obr. 3 a, d) a temně fialových květech p. Greimlera připomínajících barvu syrových jater (obr. 3 c, f). Přechodnými je ve srovnání s jeho rodiči řídce pavučinaté až vlnaté odění stonku pod terminálním úbořem a délka ostnů laterálních laloků jeho horních listů. Řídce štětinatým až chlupatým oděním svrchní strany listů a terminálními ostny zákrovních listenů je hybrid bližší p. kraňskému, řídce pavučinatou spodní stranou listů a lysými zákrovnými listeny naopak p. Greimlerovu.

Během práce na popisu křížence jsme zaznamenali, že u žádné hybridní rostliny z kölblwirtske populace nebyly plně vyvinuty prašníkové trubičky. Jednak byly výrazně kratší, ale hlavně se v nich nevyvinul žádný pyl, což by mohlo být snadno interpretováno jako sterilita hybridů. Šlo by ale o chybu, protože u většiny druhů pcháčů, včetně obou rodičovských druhů, se vyskytuje pohlavní dimorfismus – gynoecie, při které v populacích daného druhu nacházíme rostliny hermafroditní a samičí (jejichž prašníkové trubičky neobsahují pyl). Sterilita prašníků hybridních rostlin tak byla spíše samičím fenotypem,

zděděným od mateřského rodičovského druhu, než sterilitou vzniklou následkem hybridizace samotné.

Poté, co jsme na základě AFLP potvrdili hybridní původ jedinců sebraných u Köblwirtu a jejich příslušnost k pcháčům *C. carniolicum* a *C. greimleri* a připravili jsme morfologický popis, nezbývalo než nový hybridní taxon pojmenovat (Michálková a kol. 2018). Když jsme v r. 2003 začínali studovat pcháče a jejich hybridy pomocí průtokové cytometrie, měli jsme jen cytometr pro měření s AT-selektivním fluorochromem DAPI (také Živa 2005, 1: 46–48). Abychom mohli výsledky interpretovat i v absolutních jednotkách (milionech párů bází nebo pikogramech DNA), nabídl nám tehdy pomoc botanik Jan Suda, který se zasadil o zavedení průtokové cytometrie do české terénní botaniky – první studie o velikosti genomu pcháčů a jejich hybridů tak vznikla v r. 2004 (Bureš a kol.) na základě paralelních analýz v cytometrických laboratořích Botanického ústavu AV ČR v Průhoniciích a tehdejší katedry botaniky Masarykovy univerzity v Brně. Pojmenovali jsme proto nejvzácnějšího ze vzácných hybridů *Cirsium ×suda*.

Výzkum byl prováděn v rámci projektu Grantové agentury Masarykovy univerzity č. MUNI/A/0979/2017.

Použitá literatura uvedena na webu Živy.

Lukáš Laibl

K výuce

Po stopách prvohorních členovců. Současné názory na fylogenezi vymřelých skupin

Významný český geolog a paleontolog prof. Ivo Chlupáč (1931–2002) se mimořádným dílem zasloužil o rozvoj stratigrafie starších prvohor, především siluru a devonu, a to nejen z regionálního, ale také globálního hlediska. Neméně důležitá byla jeho práce věnovaná různým skupinám prvohorních členovců z Čech, Moravy i Slezska. Během své kariéry detailně popsal nebo zrevidoval mnoho druhů trilobitů, kyjonožců (Eurypterida), fylokaridních koryšů (Phyllocarida) a dalších členovců, které v jeho době (v 50. až 90. letech 20. století) bylo obtížné systematicky zařadit. Jeho paleontologická práce je dodnes mezinárodně uznávaná stejnou měrou jako jeho práce stratigrafická. Pohled na současné a fosilní členovce se ale během posledních desetiletí výrazně změnil. V následujícím textu si přiblížíme nejvýznamnější skupiny prvohorních členovců, které již nemají současné zástupce, a pokusíme se je umístit na fylogenetický strom kmene Euarthropoda. Některé druhy těchto skupin byly studovány právě Ivem Chlupáčem.

Členovci jsou jak do počtu druhů, tak jedinců pravděpodobně nejúspěšnějším živočišným kmenem, který kdy žil na naší planetě. Všichni dnes žijící členovci tvoří dvě velké skupiny – klepítkatce (Chelicerata)

a kusadlovce (Mandibulata). Mezi současné zástupce klepítkatců patří nohatky (Pycnogonida), ostrorepi (Xiphosura) a pavoukovci (Arachnida). Kusadlovci zahrnují stonožkovce (Myriapoda) a koryše včetně

hmyzu a ostatních šestinožců (Pancrustacea/Tetraconata). Tyto dvě velké skupiny – klepítkatci a kusadlovci – jsou nazývány Euarthropoda (členovci v úzkém slova smyslu). Nutno podotknout, že příslušnost nohatek (viz také Živa 2016, 3: 129–131) ke klepítkatcům a stonožkovcům ke kusadlovcům byla některými studiemi zpochybněna, poslední analýzy však opět naznačují původní dělení.

Všichni dnešní členovci mají mozek rozdělený do tří částí, nacházejících se v prvních třech hlavových člancích. První článek nese část mozku označovanou jako protocerebrum, ta innervuje oči (pokud jsou vyvinuty) a horní pysk (labrum). Druhý, deutocerebrální článek nese první pár končetin, který je u klepítkatců přeměněn na klepítka (chelicery) a u kusadlovců na první tykadla (antény). Třetí článek s tritocerebrem může nést končetiny, nebo může být úplně bez končetin jako v případě hmyzu a stonožkovců.

Dnešními nejbližšími příbuznými členovců jsou drápkovci (Onychophora), vyskytující se v tropech jižní polokoule, a želvušky (Tardigrada), žijící prakticky všude. Dodnes však zůstává poněkud nejasné, která z těchto skupin je skutečně sesterskou členovcům. Poslední analýzy naznačují, že jde o drápkovce. Kromě molekulárních dat podporuje sesterské vztahy mezi drápkovci a členovci také množství morfologických a fyziologických znaků, jako např. srdeční struktura, svalovina končetin nebo struktura hemocyaninu v hemolymfě.

V geologické minulosti však nacházíme členovce, které je obtížné zařadit do některé z výše uvedených skupin. Příkladem