

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Bakalářská práce

Studium evoluce indických zástupců rodu *Curcuma* L.

(Study of evolution in Indian *Curcuma* L.)

Eliška Závěská

Školitel: Mgr. Tomáš Fér

Praha, 2007

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především mému školiteli Mgr. Tomáši Férovi, odborné konzultantce PhD. Janě Škorníčkové a laborantce z DNA laboratoře Katedry botaniky PřF UK Veronice Machalové za jejich trpělivost, dobré rady a nezměrnou ochotu, bez kterých by tato práce nemohla být započata ani dokončena.

Mé poděkování patří také rodině a ostatním přátelům, kteří mi projevili podporu v jakékoli formě.

Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce je předběžnou studií k navazující diplomové práci, která se bude věnovat problematice evoluce polyploidních taxonů na modelovém příkladu indických zástupců rodu *Curcuma* L.

Práce začíná krátkým **úvodem**, který klade důraz zejména na užitkový význam taxonomicky problematického rodu *Curcuma*, který je navzdory svému velkému ekonomickému významu a potenciálům např. v lékařství stále nepříliš dobře probádán. Úvod zmiňuje základní problémy komplikující studium tohoto rodu a také stručně představuje strukturu bakalářské práce. Za úvodem následuje **literární rešerše**, která se věnuje polyploidizaci jako významnému procesu saltační speciace, možným přístupům ke studiu evoluce polyploidních taxonů, představuje detailněji rod *Curcuma* a shrnuje nejnovější poznatky týkající se karyologie, polyploidie a použití molekulárních markerů nejen v tomto rodu ale i v ostatních rodech čeledi Zingiberaceae.

Praktická část práce představuje předběžné výsledky z použití optimalizované metody AFLP na 164 jedincích z 34 populací náležících do 22 druhů *Curcuma* s.l., stručně diskutuje získané výsledky a hodnotí vhodnost této metody pro nadcházející studii, která se bude zabývat vnitro- a mezi-populační variabilitou, mezidruhovou variabilitou a fylogenetickými vztahy pro odvození fylogenetických vztahů v rámci rodu *Curcuma*, zejména nominálního podrodu *Curcuma*, kam patří většina indických zástupců tohoto rodu.

Práce je uzavřena stručným **závěrem** a **přehledem literatury**.

Klíčová slova

Curcuma, Zingiberaceae, polyploidie, fylogeneze, evoluce, velikost genomu, cytologie, karyologie, molekulární markery, AFLP

Abstract (English)

Presented bachelor thesis serves as a preliminary study for the upcoming master thesis on the evolution of polyploidy complexes with the focus on Indian species of *Curcuma* L.

The presented work starts with short **introduction**, pointing especially towards the economic importance of the genus *Curcuma*, which is in spite its huge potential e.g. for pharmacological industry, not yet well known taxonomically. The introduction also mentions basic problems explaining the slow progress in taxonomic studies in this genus and also outlines the structure of the thesis. The introduction is followed by the **literature search** pertinent to the process of polyploidy as an important process of evolution and to possible various approaches to study the evolution of polyploidy complexes. It also introduces the genus *Curcuma* in greater details and summarizes the recent knowledge about the karyology, polyploidy and use of molecular markers not only in the studied genus, but also the rest of the family Zingiberaceae.

Practical part of the thesis presents preliminary results from the analysis of 164 individuals belonging to 34 population of 22 species of *Curcuma* s.l. by the optimized AFLP method. It shortly discusses the obtained results and assesses the suitability of this method for the upcoming more detailed study, which will focus on inter- and intra-population variability and phylogenetic relationships within the genus *Curcuma*, particularly in its nominal subgenus *Curcuma*, where all but one Indian representative belong.

The thesis ends by concise **conclusion** and the **list of references**.

Key words

Curcuma, Zingiberaceae, polyploidy, phylogeny, evolution, genom size, cytology, karyology, molecular markers, AFLP,



Obrázek 1: *Curcuma aeruginosa* Roxb. (reprodukováno z *Monandrian Plants*, Roscoe 1824-1828)

OBSAH

Poděkování	2
Abstrakt	3
Abstract (English)	4
OBSAH	6
1. Úvod	7
2. Literární rešerše: Možné přístupy ke studiu evoluce polyploidních taxonů	8
2.1. Polyploidizace jako významný proces saltační speciace	8
2.1.1 Vznik polyploidních taxonů	8
2.1.2 Rozšíření polyploidie v rámci krytosemenných rostlin	9
2.1.3 Vlastnosti nově vzniklých polyploidních taxonů	10
2.1.4 Studium fylogeneze u polyploidních taxonů	11
2.2. Přístupy ke studiu polyploidních taxonů	11
2.2.1 Analýza genomu	11
2.2.2 Karyologie a studie karyotypů	12
2.2.3 Velikost genomu	13
2.2.4 Vybrané molekulární markery ve fylogenetice	15
2.3. Polyploidní rod <i>Curcuma</i> a jeho specifika	22
2.3.1 Taxonomické zařazení rodu	22
2.3.2 Polyploidie v čeledi Zingiberaceae	23
2.3.3 Charakteristika rodu <i>Curcuma</i>	24
2.3.4 Taxonomie a vnitřní členění rodu	27
2.3.5 Nejnovější poznatky v rodu <i>Curcuma</i>	27
2.3.6 Použití molekulárních markerů v čeledi Zingiberaceae a rodu <i>Curcuma</i>	29
3. Praktická část	31
3.1. Úvod	31
3.2. Materiál	32
3.3. Metodika	35
3.3.1 Extrakce DNA	35
3.3.2 AFLP celkové DNA	35
3.3.3 Analýza AFLP dat	36
3.4. Výsledky a diskuze	37
3.4.1 Vyhodnocení fragmentů	37
3.4.2 Vyhodnocení binárních dat	38
4. Závěr	43
5. Seznam literatury	44

1. Úvod

Rod *Curcuma* je jedním z významných rodů tropické čeledi Zingiberaceae jak z hlediska botanického, tak z hlediska ekonomického. Různé druhy tohoto rodu jsou využívány jako koření, léky, barviva potravin, textilií, dřeva a mnoha dalších materiálů či jako okrasné rostliny. Mají tak v současnosti obrovský komerční potenciál zejména pro asijské země. Druhy rodu *Curcuma* jsou také nedílnou součástí každodenního života asijských původních obyvatel, zejména v Indii jsou používány při náboženských rituálech již odnepaměti a provázejí hinduisty prakticky od narození až do smrti (Gupta, 1981). Nejznámějším a ekonomicky nejvyužívanějším druhem tohoto rodu je *Curcuma longa*, která poskytuje kurkumový prášek, který je nedílnou součástí známého koření curry.

Z botanického hlediska je rod *Curcuma* otázkou zejména pro taxonometry, neboť současná znalost taxonomie tohoto rodu je bezpochyby nejzmatenější mezi všemi rody indických Zingiberaceae (Škorníčková, 2007). Složitost a komplexita tohoto rodu je způsobena především polyploidním charakterem jejích taxonů, rozdílnou mírou variability a v neposledním případě také problémům se studiem originálních materiálů (typových položek), které jsou u mnoha druhů stále nezvěstné a komplikují jasné použití jmen a vyřešení nomenklatorických problémů.

Polyplodie je významným procesem speciace, který ovlivňuje evoluci u více než 80% všech krytosemenných rostlin. Ovlivňuje chování rostlin na všech úrovních-molekulární, buněčné, organismální a nakonec má důsledky i ekologické. Z těchto důvodů je proces polyplodizace předmětem mnoha současných intenzivních studií (např. Soltis a Soltis 1984-2004).

Pro studium fylogeneze polyploidních taxonů a následné sestavení přirozeného taxonomického systému jsou klíčovými otázkami zejména detekce takových taxonů a určení jejich evolučního původu, který může být často velmi spletitý. Pro řešení těchto otázek může být použito mnoho nových a přesných metod.

Předkládaná bakalářská práce je rozdělena do dvou hlavních částí. První část-literární rešerše- shrnuje klasické i novodobé poznatky o fenoménu polyplodie, které jsou klíčovými pro pochopení chování polyploidních organismů a které dovolují odhalovat jejich vzájemné vztahy. Dalším cílem této části je poskytnout jeden ucelený pohled na možný postup při hledání původů polyploidních taxonů pomocí vybraných klasických cytologických i moderních molekulárních technik. Jako modelový organismus (systém) pro prezentaci navrženého teoretického postupu byl použit právě tropický rod *Curcuma*, který je charakterizován ve třetí části literární rešerše.

Náplní druhé, praktické části práce je aplikace vybrané molekulární metody AFLP na sérii populací indických druhů rodu *Curcuma* s cílem ohodnotit vhodnost vybrané metody pro daný druh a pro řešení daného problému, jímž je rekonstrukce fylogeneze tohoto druhu.

Literární rešerše i praktická část práce budou sloužit jako podklady k dalším, komplexnějším molekulárním studiím rodu *Curcuma* plánovaným v budoucí diplomové práci.

2. Literární rešerše: Možné přístupy ke studiu evoluce polyploidních taxonů

2.1. Polyploidizace jako významný proces saltační speciace

Polyploidizace, proces, při kterém dochází ke zvýšení počtu chromosomových sad, hraje klíčovou roli v evoluci cévnatých rostlin (Stebbins, 1971; Soltis a Soltis, 1993). Soudí se, že je to nejběžnější mechanismus sympatrické saltační speciace u rostlin (Otto a Whitton, 2000), a že většina rostlin tento proces prodělala ve své evoluční historii alespoň jednou, ale spíše vícekrát (Soltis et al., 2003).

Za polyploidní organismus považujeme takový organismus, který má v buněčných jádrech více než dvě monoploidní sady chromosomů (tři sady = triploid, čtyři sady = tetraploid, atd.) (Darlington, 1932).

2.1.1 Vznik polyploidních taxonů

Mechanismy vzniku polyploidních taxonů

Ke vzniku polyploidního jedince může docházet zdvojením chromosomů v somatických buňkách diploidního taxonu, což vede k produkci polyploidních tkání, případně k produkci polyploidního potomstva (Ramsey a Schemske, 1998).

Podstatnější roli při vzniku polyploidů hrají však neredukované gamety (Thompson a Lumaret, 1992), které mohou vznikat následkem narušeného průběhu meiosis u diploidních organismů. Tyto gamety pak obsahují diploidní sadu chromosomů ($2n$). Splynutím takových gamet vzniká polyploidní organismus (např. Harlan a deWet, 1975). Výskyt tohoto procesu je dokázán a dobře prostudován u mnoha polyploidních taxonů (např. *Dactylis glomerata*, Bretagnolle a Thompson, 1995 nebo rod *Tragopogon*, Ownbey, 1950).

Typy polyploidních taxonů

Podle genetické a taxonomické podobnosti genomů, které se polyploidizace účastní, a z pohledu chování chromosomů při párování v meióze, rozlišujeme nově vzniklé polyploidní taxony na autopolyploidní a allopolyploidní (Kihara a Ono, 1926)

V případě *autopolyploidie* jsou všechny chromosomové sady genomu homologní a polyploidie vznikla uvnitř taxonu procesem znásobení genomu, např. v důsledku narušení normálního průběhu mitosy, nebo splynutím dvou neredukovaných gamet. V případě *allopolyploidie* jsou alespoň některé chromosomové sady účastníci se polyploidizace odlišné. Allopolyploidní genom tak mohl vzniknout například křížením dvou příbuzných diploidních druhů s následným zdvojením genomu (polyploidizací) v somatických buňkách křížence. (Lewis a John, 1963).

V závislosti na době vzniku, mohou být polyploidní jedinci klasifikováni jako *neopolyploidní* a *paleopolyploidní*. Za neopolyploidní se považují taxony, které jsou si vzájemně podobné a blízce příbuzné k žijícím diploidům (nebo nižším polyploidům), takové, které mohou být umístěny ve stejném druhu (nebo druhovém agregátu). Za paleopolyploidní taxony jsou považována odvozená (dávná) stádia polyploidů s vysokým základním chromosomovým číslem (Grant, 1963; Goldblatt, 1980). Takové taxony jsou izolovány díky tomu, že všichni diploidní i nižší polyploidní předci jsou vyhynulí nebo je již nelze rozeznat (Ehrendorfer, 1980).

Procesy doprovázející polyploidizaci

Procesy duplikace genomu jsou doprovázeny značnými genetickými i epigenetickými změnami v nově vzniklém genomu.

Mezi tyto procesy patří rozsáhlé přestavby genomu po polyploidizaci, zahrnující vnitro- i mezi-genomické reorganizace (Soltis a Soltis, 1993; Leitch a Bennett, 1997; Soltis a Soltis, 1999; Wendel, 2000; Chen et al., 2004).

Dalším významným fenoménem je snižování velikosti genomu. Tento jev zamítá logický předpoklad, že polyploidní taxon, by měl mít rozsáhlejší velikost genomu (C-hodnoty) než jeho diploidní předek. Leitch a Bennett (2004) popsali, na základě porovnání C-hodnot z rozsáhlé databáze C-hodnot krytosemenných rostlin (Angiosperm DNA C-values database: <http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>), že množství DNA v nereplikovaném jádře gamet (1C DNA) má tendence se snižovat se zvyšujícím se stupněm ploidie.

Mezi tzv. „gene silencing“ procesy se řadí genetické i epigenetické mechanismy měnící genovou expresi (Durbin et al., 2000; Lynch a Conery, 2000; Lee a Chen, 2001; Osborn et al., 2003). Zde jsou zahrnuty změny trvalého charakteru v DNA sekvencích nebo přímo ztráty genů (např. aneuploidie, inserce a delece, duplikace, bodové mutace) i změny bez trvalých změn v DNA sekvencích (Wolffe a Matzke, 1999; Osborn et al., 2003), které však mohou mít dramatické důsledky fenotypické.

Tyto děje, genetické i epigenetické, mohou hrát významnou roli v evoluci polyploidie (Liu a Wendel, 2003). Řada vědců navíc předpokládá, že změny v genové expresi mohou být klíčem k porozumění úspěchu polyploidů ve srovnání s jejich diploidními předky (Stephens, 1951; Ohno, 1970; Gottlieb, 1977, 1981; Levin, 1983; Soltis a Soltis, 1993; Matzke a Matzke, 1998).

Výše zmíněné změny doprovázející polyploidizaci mohou být souhrnně označeny jako *diploidizace*-proces, kterým se z polyploidních taxonů stávají „funkční diploidi“ (Soltis et al., 2003).

2.1.2 Rozšíření polyploidie v rámci krytosemenných rostlin

Odhaduje se, že více než 80% krytosemenných rostlin je polyploidního původu (Leitch a Bennett, 1997). Četnost výskytu polyploidů u kvetoucích rostlin je však mezi rostlinnými čeleděmi a rody značně variabilní, např. u Poaceae je více než 80% druhů polyploidních (Stebbins, 1985; de Wett, 1987), zatímco v čeledi Liliaceae nebo Fabaceae je to jen 23% a 18% (Goldblatt, 1980, 1981).

Odhady relativního zastoupení polyploidních taxonů nemusí být však vždy jednoznačné, neboť je otázkou, kdy je druh skutečně diploidní (Bennett, 2004). Zatímco Goldblatt (1980) považoval za diploidní druhy s $2x = 2n \leq 20$, pro jiné vědce byla hranice polyploidie $2n = 2x = 28$ (Grant, 1981). Goldblatt (1980) usuzuje, že téměř všechny druhy s $n = 9$ nebo 10 pravděpodobně někdy v historii prodělaly polyploidizaci, zatímco druhy s $n \geq 11$ jsou téměř jistě polyploidního původu (paleopolyploidi).

2.1.3 Vlastnosti nově vzniklých polyploidních taxonů

Fenotyp, fyziologie, ekologie

Díky procesům provázejícím polyploidizaci („gene silencing“, apod.) se přímo projevují účinky na fenotyp, fyziologii a chemické vlastnosti organismů (Levin, 1983). Polyploidie může přímo ovlivnit velikost buňky, velikost rostliny nebo období květu.

Obecně lze říci, že polyploidní taxony často vykazují nové fenotypy, které nebyly přítomny u jejich diploidních předků (např. vyšší tolerance ke stresovým faktorům, delší životní intervaly, větší obranyschopnost proti patogenům a herbivorům, důraz na vegetativní rozmnožování) (Lewis, 1980; Levin, 1983), mají větší schopnost kolonizovat nová nebo narušená stanoviště (Stebbins, 1985; Ehrendorfer, 1980) a celkově mívají širší geografickou distribuci než jejich diploidní předci (Reese, 1958; Stebbins, 1972).

Sterilita

Se vznikem některých polyploidních taxonů souvisí i jejich častá sterilita. Při redukčním dělení se v buňkách polyploidů mohou tvořit multivalenty homologních chromosomů a dochází k nerovnoměrnému rozchodu chromosomů při prvním meiotickém dělení. Gamety vzniklé takovým dělením jsou obvykle sterilní (Briggs a Walters, 2001).

Přítomností multivalentů a univalentů lze vysvětlit sníženou plodnost u polyploidů s lichým počtem chromosomů (např. triploidní 3x, pentaploidní 5x nebo nonaploidní 9x taxony). Přesto mohou být někteří triploidní (popř. 5x, 7x, 9x) jedinci plodní. Jejich gamety však bývají diploidní, triploidní, aneuploidní apod., takže jejich splynutím vznikají jedinci s nejrůznějšími počty chromosomů (Gibby, 1981).

Změna způsobu reprodukce

Nově vzniklý polyploidní jedinec se může setkat s reprodukčními problémy. Podle Gibbyho (1981) je polyploidie nejčastější u vytrvalých bylin, které se mohou rozmnožovat vegetativně. Vytrvalá rostlina tak může dlouhou dobu přežívat, ale při případném pohlavním rozmnožování může trpět „nevýhodou malých čísel“ (Levin, 1975).

Mezi nejčastěji pozorované změny způsobu rozmnožování patří přechod polyploidních jedinců k samosprašnosti (např. rod *Turnera*, Shore a Barrett, 1985 nebo rod *Paspalum*, Quarin a Hanna, 1980) nebo k apomixii, a to nejčastěji v případech, kdy jsou polyploidy lichého ploidního stupně 3x, 5x apod. Příkladem druhu s apomiktickými polyploidy a sexuálně se množícími diploidy je např. *Ficaria verna* s.l., kde se sterilní triploidní a tetraploidní formy množí pacibulkami (vegetativní apomixie), zatímco diploidní rostliny tvoří běžným pohlavním procesem pravá semena (Briggs a Walters, 2001).

Přechod k apomixii může mít kladný adaptivní význam, neboť na určitých typech stanovišť mohou výhody rychlé a spolehlivé reprodukce převážit nad výhodami udržování genetické variability. Mezi taková stanoviště patří agrocenózy, ruderální stanoviště vzniklá lidskou činností apod. (Briggs a Walters, 2001).

Polyploidní taxony a jejich potenciál pro evoluční změny

Procesy jako mnohočetný vznik auto- i allopolyploidů (Soltis a Soltis, 2003), nebo genový tok uvnitř i mezi různými ploidními úrovněmi mohou výrazně zvyšovat variabilitu polyploidů. Následkem této variability je široká ekologická amplituda i zeměpisné rozšíření, překonávající často rozšíření diploidních předků. (Soltis a Soltis, 2003).

2.1.4 Studium fylogeneze u polyploidních taxonů

Jako modelové systémy pro studium polyploidie a polyploidizace slouží vybrané, v současnosti dobře prostudované polyploidní komplexy mezi které patří i řada užitkových rostlin jako např. *Triticum a Aegilops* (Ozkan et al., 2001; Kashkush et al., 2002; Levy a Feldman, 2002; David et al., 2004) nebo *Gossypium* (Adams et al., 2003; Adams a Wendel, 2004). Mezi vhodné modelové systémy patří také „nedávno vzniklé polyploidie“, kteří byli vytvořeni během posledních 150 let (neopolyploidie), např. rod *Tragopogon* (Soltis et al., 2004), *Spartina* (Ainouche et al., 2004) nebo *Senecio*. (Abbott a Lowe, 2004).

Retikulární evoluce

Rekonstrukce fylogeneze polyploidních komplexů je často komplikována jejich vzájemně provázanými vztahy (reticulate nature) (Soltis a Soltis, 2003).

K odhalení rodičovského původu a evoluční historie polyploidů však mohou napomoci molekulární techniky, zejména kombinace analýz z jaderné a chloroplastové DNA (kap. 2.2.4.).

Příkladem použití molekulárních technik pro rekonstrukci fylogeneze u polyploidních skupin je např. odvození původu *Silene aegaea* (Caryophyllaceae) pomocí sekvenování úseku ITS jaderné DNA v kombinaci s intronem *rps16* chloroplastové DNA (Popp a Oxelman, 2001), nebo použití metody RAPD v kombinaci se sekvenačními daty z ITS a *matK* k určení domnělých rodičů *Saxifraga osloensis* (Saxifragaceae) (Brochmann et al., 1996). Další příklady uvádí kap. 2.2.4 nebo 2.3.6.

Pro odhalování vzájemných vztahů uvnitř polyploidních druhů jsou však nepostradatelné i cytologické analýzy využívající jak klasických metod karyologie, tak určování velikosti genomu.

2.2. Přístupy ke studiu polyploidních taxonů

Polyploidní komplexy mají často malou morfologickou variabilitu a morfologické znaky jsou pro studium polyploidů často nedostačující. Pro řešení otázek vzniku, původu, četnosti a evoluční úspěšnosti polyploidních organismů jsou užitečnými nástroji pro výzkum moderní molekulární a cytologické techniky.

2.2.1 Analýza genomu

Nejstarší studie zabývající se hledáním původu polyploidních druhů využívaly výhradně cytogenetické postupy jako např. studie průběhu meiosis u různých typů polyploidů vzniklých především experimentálním křížením, nebo synteticky-působením alkaloidu kolchicinu (Blakeslee a Avery, 1937).

Ukázkovým příkladem použití analýzy genomu je studie Hauflera a Zhongrena (1991), která hledala původ severoamerického allotetraploidního druhu *Polypodium virginianum* ($2n = 4x = 148$), který pravděpodobně vznikl hybridizací mezi jižním osladičem *P. appalachianum* ($2n = 2x = 74$) a na severu rozšířeným *P. sibiricum* ($2n = 2x = 74$).

Odlíšení alloxeploidního druhu osladiče *Polypodium interjectum*, od jeho diploidního (*P. australe*) a tetraploidního (*P. vulgare*) rodičovského druhu dokázaly cytologickými metodami studie Mantona (1950) a Shivase (1961).

Metody analýzy genomu významně přispěly k poznání původu důležitých polyploidních zemědělských plodin, například brukve (*Brassica*), bavlníku (*Gossypium*) a banánovníku (*Musa*) (Simmonds, 1976, Zohary a Hopf, 1993; Smartt a Simmonds, 1995),

naproti tomu však byly odhaleny některé jejich limitace při studiích polyploidních taxonů rodu *Triticum* (Riley, 1965; Breiman a Graur, 1995; Zohary a Feldman, 1962; Pazy a Zohary, 1965).

Analýzy genomu zůstávají však nadále užitečným nástrojem, jsou-li používány s dalšími experimentálními postupy: analýzou karyotypů a hybridizačními experimenty. (Briggs a Walters, 2001).

2.2.2 Karyologie a studie karyotypů

Karyologie je disciplína zabývající se studiem buněčného jádra, která zkoumá zejména chromosomy, nositele většiny genetické informace eukaryotních organismů. Karyotyp je hlavní charakteristikou jádra. Je to chromosomová sada jedince definovaná počtem, velikostí a tvarem chromosomů obvykle tak, jak se tyto jeví v metafázi mitotického dělení. Této charakteristiky lze využít spolu s ostatními znaky (např. morfologickými, fyto geografickými, ekologickými, chemickými) jako charakteristiku určité taxonomické skupiny a k definování rozdílů mezi takovými skupinami. Dalším důležitým znakem při studii buněčného jádra je uspořádání homologních chromosomů při redukčním dělení, neboť míra homologie chromosomů odráží míru vývojové příbuznosti rodičovských genomů.

Většinu karyologických znaků lze využít spíše k charakteristice skupin na úrovni druhové a nižší. (Krahulcová, 1998).

Na základě porovnávání karyotypů odhalil například Jones (1958) posloupnost událostí, které vedly ke vzniku pentaploida medynku měkkého (*Holcus mollis*) z diploidního medynku vlnatého (*H. lanatus*) a tetraploidního *H. mollis*.

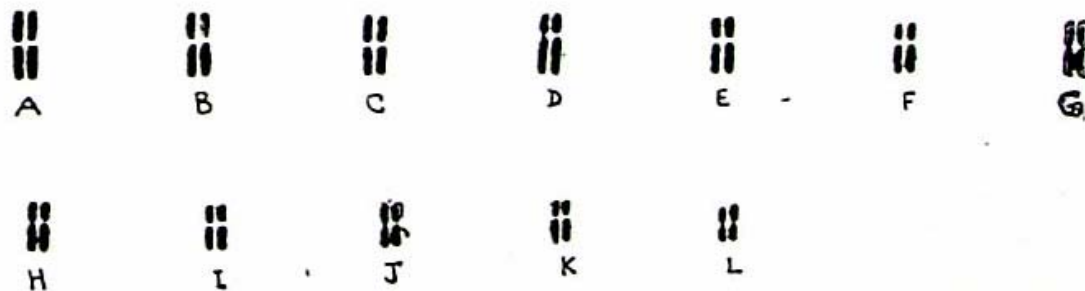
V nedávné studii pak Kubota et al.(2006) použil karyologické metody ve spojení s molekulární metodou AFLP k přehodnocení vztahů mezi japonskými druhy rodu *Trilium*, tvořícími polyploidní sérii, konkrétně k nalezení rodičovských druhů tetraploidního *T. channellii*, kterými jsou pravděpodobně diploidní *T. camschatcense* a tetraploidní *T. tschonoskii* nebo hexaploidní *T. hague*.

Znalosti o proměnlivosti počtu, velikosti a tvaru chromosomů umožnily nový pohled na taxonomii řady kapradin, z krytosemenných pak zejména druhů z čeledi Brassicaceae, Poaceae, v rodech *Crepis*, *Tragopogon*, *Clarkia* a mnoha dalších (podle Krahulcová, 1998).

Základní karyologické charakteristiky

Základními karyologickými charakteristikami, které jsou v rámci krytosemenných rostlin variabilní a lze je tedy použít jako taxonomických znaků, jsou počet chromosomů ($2n$) a základní chromosomové číslo (značí se x). Některé rody (nebo dokonce i čeledi) mají jen jedno základní číslo, jiné jich mají několik. Chromosomový počet ($2n$) se zjišťuje nejčastěji z buněk dělicích se somatických pletiv (např. meristémů kořenových špiček). Ze znalosti hodnot ($2n$) a (x) pak plyne důležitý údaj o stupni polyploidie. Informace o počtu chromosomů je cenným vodítkem zejména v případech, kdy se v rámci skupiny příbuzných taxonů vyskytuje více stupňů ploidie a taxony tak tvoří celé polyploidní řady (komplexy). Pokud se při zvětšování počtu chromosomů jedná o celé násobky základního čísla, mluvíme o *euploidii* (nebo *orthoploidii*); stav, kdy se počet chromosomů od základního čísla drobně odchyluje, nazýváme *aneuploidii* (nebo *anorthoploidii*).

Dalšími charakteristickými znaky jsou velikost a tvar chromosomů a z celkového pohledu na karyotyp, jeho symetrie a asymetrie (více v Krahulcová, 1998).



Obrázek 2: Příklad rostlinného karyotypu *Roscoea humeana* ($2n = 24$); idiogram zobrazující typy chromosomů (podle Mahanty, 1970).

2.2.3 Velikost genomu

Důležitou charakteristikou všech živých organismů, a tedy i dalším užitečným taxonomickým markerem, je velikost genomu, tj. absolutní obsah DNA v jádře buňky.

Obsah DNA v nereplikovaném haploidním jádře (bez ohledu na ploidní stupeň taxonu) je označován jako *C-hodnota* (Swift, 1950), zatímco obsah DNA monoploidní sady chromosomů (u polyploidů průměr) je označován jako *velikost genomu*. *C-hodnota* je tak rovna velikosti genomu, pokud se jedná o diploidní taxon, zatímco je vždy větší než velikost genomu, pokud se jedná o polyploidní taxon.

Jak *C-hodnota*, tak velikost genomu, může být vyjádřena buď v pikogramech DNA (pg) nebo párech megabází (1 pg = 978 Mbp; Doležel et al. 2003).

Variabilita ve velikosti genomu

V rámci rostlinné říše byla pozorována velká variabilita v *C-hodnotách* (Bennett et Leitch 2003) kolísající mezi 0,16 a 127,4 pg, přičemž tyto hodnoty nejsou nejspíš definitivní, neboť *C-hodnoty* byly dosud měřeny jen u zlomku druhů krytosemenných rostlin (Suda, 2004).

Nápadná variabilita ve velikosti genomu je nacházena i mezi blízkými příbuznými druhy, což může korelovat s různými adaptivními znaky na jaderné, buněčné, tkáňové a organismální úrovni a ovlivňuje také fenologické a ekologické chování organismu. Zvětšení nebo zmenšení velikosti genomu může být pak korelováno s evolučním pokrokem v rámci skupiny a seskupování taxonů podle *C-hodnot* poskytnout přirozený způsob vysvětlení fylogenetických vztahů (Ohri, 1998).

Variabilita v *C-hodnotách* má u některých rodů nespojitou povahu a tvoří se tak skupiny taxonů, které jsou jednoznačně odděleny (ve smyslu přesných intervalů *C-hodnot*). Jiné rody, jako např. česnek (*Allium*) mohou vykazovat kontinuální variabilitu. (Ohri, 1998).

Z taxonomického hlediska je důležitá především variabilita *C-hodnot* na úrovni druhů, neboť některé příbuzné druhy se stejným počtem chromosomů se mohou lišit právě v absolutním obsahu DNA a být tak jednoduše rozeznány (Suda, 2004).

Metody pro odhady velikosti genomu

V současnosti nejběžněji používanými metodami pro odhady velikosti genomu jsou Feulgenova densitometrie a průtoková cytometrie.

Feulgenova densitometrie byla doposud nejpoužívanější metodou a stále poskytuje největší počet odhadů (Bennett a Leitch, 1997), ale průtoková cytometrie se vzhledem k rychlosti a pohodlnosti stává ještě oblíbenější a vyhledávanější metodou (Doležel et al. 1998).

Průtoková cytometrie (FCM = flow cytometry)

Tato metoda je založena na odhadu množství DNA z intenzity fluorescence fluorescenčně obarvených částic (např. jader) (více o principu metody např. Suda, 2004). Kromě odhadů velikosti genomu lze pomocí této metody určit i jiné charakteristiky jak na buněčné, tak na vnitrobuněčné úrovni (např. velikost a tvar buněk, zastoupení bazí v nukleových kyselinách, velikost chromosomů, apod.).

Použití FCM při studiu polyploidních druhů

Metoda FCM je výhodná především z hlediska přesnosti, která umožňuje detekovat malé rozdíly ve velikostech genomu v rámci drobných druhů (mikrospecií), které se liší jen nepatrně v morfologických znacích, nicméně jsou jednoznačně definovány ploidním stupněm, nebo počtem chromosomů. Tyto microspecies v rámci blízké příbuzných polyploidních skupin mohou být pomocí FCM spolehlivě a rychle určeny (Suda, 2004).

Příkladem může být studie Dimitrova et al. (1999), kde u dvou populací druhu *Crepis foetida* se stejným karyotypem měl poddruh subsp. *commutata* o 10% menší velikost genomu než subsp. *rhoeadifolia*.

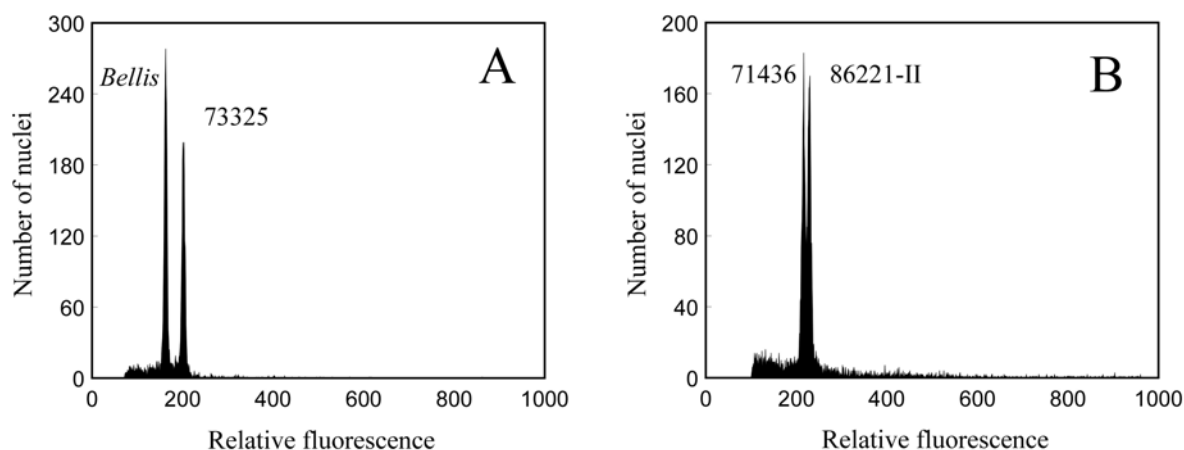
Dalšími použitími metody FCM může být identifikace heteroploidních kříženců vzájemně příbuzných taxonů, identifikace vzácných cytotypů, průzkum cytotypové struktury v rámci populací (Suda, 2004) nebo vyhodnocení genomického složení u allopolyploidních taxonů (Lysák et al. (1999).

Lysák et al. (1999) dokázal asi 12% rozdíl mezi genomy A (z *Musa acuminata*) a B (z *M. balbisiana*) vyskytujícími se v triploidních kultivarech banánovníku (*Musa*) a navrhnul, že srovnávací analýzy velikostí genomu u diploidních a triploidních taxonů mohou být nápomocné při identifikaci domnělých předků kultivovaných triploidních banánovníků.

Hlavními výhodami metody FCM jsou rychlost, snadná a pohodlná příprava vzorků pro analýzy dovolující zkoumání mnoha desítek vzorků během dne a vysoká přesnost. Výhodou jsou i nízké provozní náklady.

Největší nevýhodou FCM je potřeba čerstvého rostlinného materiálu pro přípravu vzorků. Obtížná může být navíc analýza druhů, které obsahují velké množství sekundárních metabolitů, které mohou narušovat proces barvení částic. FCM také nenahradí klasické karyologické metody při detekci aneuploidie nebo přídavných chromosomů (Suda, 2004).

Některé limity metody popisují např. Doležel et al. (1998) a Suda (2004).



Obrázek 3. (A) reprezentativní histogram z analýzy FCM dokumentující velikost genomu u druhu *Curcuma oligantha* (sběrné číslo 73325) při použití *Bellis perennis* jako vnitřního standardu. (B) FCM, důkaz vnitrodruhové variability velikosti genomu u druhu *Curcuma longa* (souběžná analýza položek 71436 ($2C = 2.60$ pg) a 86221-II ($2C = 2.85$ pg)). Buněčná jádra byla barvena pomocí fluorochromu propidium iodid. (podle Leong-Škorníčková et al., 2007)

Alternativními metodami pro měření velikosti genomu jsou výše zmíněná denzitometrie (Vilhar et al. 2001), kde množství DNA je odvozeno z optické hustoty barvené oblasti (jader) nebo fluorometrické techniky (Darzynkiewicz et al. 1999), kde množství DNA je odhadováno z intenzity fluorescence podobně jako u FCM. Tyto techniky, na rozdíl od FCM, pracují s částicemi fixovanými na pevném podkladu, jsou proto označovány jako statické cytometrie, a ve srovnání s FCM jsou díky zdlouhavé přípravě vzorků časově, popř. finančně náročné.

2.2.4 Vybrané molekulární markery ve fylogenetice

V současné době se ve fylogenetice, oboru studujícím příbuzenské vztahy taxonů, masivně uplatňují metody využívající molekulární znaky-tzv. *markery*.

Jako *molekulární marker* označujeme informaci o organismu získanou na základě analýzy jeho molekul, typicky proteinů nebo DNA. Data získaná prostřednictvím molekulárních metod lze využít pro účely rozpoznávání jednotlivých druhů organismů, pro jejich třídění, pro zjišťování genealogické příbuznosti jedinců v rámci populace či druhu, pro zjištění vnitro a mezidruhové variability a také pro účely rekonstrukce fylogeneze druhů či vyšších taxonů (Flegr, 2005; Lowe et al., 2004).

Oproti klasickým znakům, např. morfologickým, mají znaky získané pomocí molekulárně biologických technik několik výhod (Flegr, 2005): lze získat prakticky libovolné množství hodnotitelných znaků; jednotlivé znaky jsou na sobě vzájemně nezávislé, nebo je jejich závislost detekovatelná; na rozdíl od klasických znaků mají molekulární znaky často kvalitativní charakter (přítomnost/nepřítomnost fragmentu, alely, nukleotidu), což umožňuje jednoduchý přepis dat do „digitální“ podoby; molekulární znaky mají charakter nevážených znaků (každému znaku je přiřazena stejná váha), popřípadě se vážení znaků řídí předem daným matematickým algoritmem; většina molekulárních znaků je selektivně neutrálních (míra sdílení molekulárně biologických znaků u dvou druhů přímo odráží míru vzájemné příbuznosti daných druhů a je víceméně nezávislá na vnější fenotypové podobnosti či odlišnosti).

Molekulární markery ve studiu fylogeneze na druhové úrovni

Hlavním zdrojem informací pro molekulární fylogenetické studie jsou sekvence DNA (pořadí nukleotidů v DNA). Široké rozpětí sekvencí z jaderných a plastidových genomů umožňuje jejich využití ve fylogenetických studiích na všech úrovních. Pro studie blíže příbuzných rodů nebo druhů sekvence však často nevykazují dostatečnou variabilitu (např. Muir a Schlötterer, 1999). Na těchto nižších úrovních mohou být lepšími fylogenetickými markery tzv. délková variabilita v restričních nebo různými metodami amplifikovaných fragmentech, která poskytuje dostatečné fylogenetické signály (Koopman, 2005).

Mezi další běžně používané markery patří např. restriční technika RFLP (restriction fragment length polymorphisms = polymorfismu v délkách restričních fragmentů; Grodzicker et al., 1974; Botstein et al., 1980), amplifikační techniky RAPD (random amplified polymorphic DNAs; Williams et al., 1990; Welsh a McClelland, 1990) a mikrosatelity (nebo také SSR = simple sequence repeats; Cregan, 1992) nebo metoda, která je spojením restričních a amplifikačních technik, AFLP (Vos et al., 1995; Amplified Fragment Length Polymorphisms = polymorfismus v délkách amplifikovaných fragmentů, tzv.).

Sekvenování DNA

Informace ze sekvencí DNA získáváme určením pořadí nukleotidů v předem vybraném úseku DNA. Porovnáním vybraného úseku všech studovaných taxonů detekujeme rozdílnosti v pořadí nukleotidů (mutace, substituce, inserce, delece), tedy rozdílnosti v evoluci DNA. Takových informací lze využít ke zjištění průběhu a rychlosti evoluce nebo ke zjištění podobnosti a příbuznosti taxonů. Množství zjištěných změn a jejich charakter závisí na vybraném úseku genomu (Bishop a Rawlings, 1997). K sekvenování se proto vybírají různé oblasti DNA.

Pro oblasti kódující genetickou informaci (exony) je charakteristická spíše konzervativnější evoluce a jsou tedy vhodnější pro studie na vyšších úrovních taxonů (čeledí, rodů). Oblasti nekódující (introny nebo intergenické spacery) bývají variabilnější a tudíž jsou použitelné pro studie blíže příbuzných taxonů (např. druhů).

Jiným kritériem pro vybírání vhodných úseků je jejich umístění v různých genomech. Ke studiu fylogeneze lze využít chloroplastový (cpDNA) jaderný (nDNA) nebo mitochondriální (mtDNA) genom. Chloroplastový genom je obecně konzervativnější a často tedy méně variabilní než genom jaderný (Lowe et al., 2004), což indikuje také jeho použití.

Mezi nepoužívanější sekvenované úseky v systematice a fylogenetice na druhové úrovni patří z cpDNA kódující úsek *matK*, nekódující *trnL* intron a spacer mezi *trnL* a *trnF*. Z jaderné DNA jsou to úseky ribozomální DNA (rDNA) jako např. ITS – internal transcribed spacer – který je velmi často používán ke zjištění vztahů mezi blízkými příbuznými rody i na druhové úrovni, někdy je však málo variabilní (Muir a Schlötterer, 1999).

Často se při řešení fylogenetických otázek využívá analýz sekvencí z více úseků z různě variabilních oblastí genomu, nebo kombinací sekvenování s některým z dalších molekulárních markerů. Tím lze získat více nezávislých znaků. Porovnáním výsledných dendrogramů ze sekvenovaných úseků cpDNA a nDNA můžeme odhalit např. hybridní původ některých taxonů, nebo vyjasnit vztahy mezi skupinami, které při použití jediného úseku zůstanou nejasné. Příkladem takového přístupu je např. studie o fylogenetických vztazích v čeledi Zingiberaceae (Kress et al., 2002). Více příkladů je také uvedeno v kapitole 2.3.6.

Princip metody

Metoda sekvenování DNA je založena na namnožení konkrétní oblasti DNA pomocí metody PCR s použitím dvojice známých primerů. Namnožený úsek je pak podroben cyklickému sekvenování (Brown, 1994) za použití pouze jednoho primeru. Kromě dNTP jsou v reakční směsi přítomny i fluorescenčně značené ddNTP. Vznikají fragmenty, které se liší právě o jednu bázi, což umožňuje stanovení přesného pořadí nukleotidů v řetězci DNA. Konečná vizualizace je prováděna po elektroforetickém rozdělení na automatickém sekvenátoru.

Vedle širokého spektra využití a vysoké kvality informací je výhodou této metody především jednoduchá amplifikovatelnost řady úseků z cpDNA s využitím tzv. univerzálních primerů (Demesure et al., 1995) pro studium i dosud molekulárně neprozkoumaných taxonů. Některé známé sekvence jsou dostupné z databází sekvencí (např. GenBank (NCBI)). Snadné je i vyhodnocování dat, neboť je k dispozici celá řada metod i dostupného softwarového vybavení.

Pokud je sekvenován úsek, který je v genomu přítomen ve více kopiích (tzv. multiple-copy geny, např. ITS), může nastat problém s homologií sekvenovaných úseků. Na druhé straně, sekvenuje-li se jedinečná oblast (tzv. low-copy, případně single-copy geny nebo cpDNA), nastává problém s nalezením vhodných primerů pro danou oblast a pro studovanou skupinu, neboť nemusí být známy sekvence ohraničující požadovaný sekvenovaný úsek. To platí především pro úseky z jaderné DNA, neboť v případě cpDNA bývají primery široce použitelné (Demesure et al., 1995).

Vyhodnocení sekvenačních dat

Vyhodnocování sekvenačních dat spočívá v porovnávání získaných sekvencí od jednotlivých jedinců, které se liší bodovými substitucemi nebo oblastmi inzercí a delecí. Vlastnímu hodnocení předchází konstrukce tzv. mnohonásobného alignmentu (multiple alignment), kdy jsou pod sebou řazeny homologní báze. Konstrukce alignmentu často předpokládá tvorbu mezer (gapů). Dobře udělaný alignment je předpokladem pro správnou fylogenetickou analýzu.

Na základě dat získaných vyhodnocením alignmentu je sestavován dendrogram. Při konstrukci dendrogramu se postupuje buďto kladistickou metodou maximální úspornosti (maximum parsimony), při které je hledán nejjednodušší strom (takový, který vysvětluje evoluci genomu co nejmenším počtem změn), nebo statistickou metodou maximální věrohodnosti (maximum likelihood), která hledá strom s největší pravděpodobností, že za daného evolučního modelu se při dané topologii stromu vyvinou pozorované sekvence (více např. Lowe et al, 2004). Třetí používanou metodou je tzv. bayesovská metoda (více např. Ronquist a Huelsenbeck, 2003).

Pro hodnocení sekvenčních dat lze použít také distanční metody založené na koeficientech podobnosti (viz dále).

Dominantní a kodominantní povaha dat

Jako kodominantní markery označujeme takové, které umožňují identifikovat homologní alely a tak rozeznat homozygotní a heterozygotní genotyp, Dominantní markery jsou znaky skórované jako přítomné/nepřítomné a tak neumožňují identifikaci homologických alel ani genotyp jedince.

Dominantní markery nejsou pro populačně-genetické studie tak účinné jako kodominantní (Lewis a Snow, 1992; Lynch a Milligan, 1994). Odhaduje se, že při analýze dominantním markerem je potřeba analyzovat 2-10 krát více jedinců na jeden lokus ve srovnání s kodominantní markerem (Lynch a Milligan, 1994). Tato nevýhoda může být však vyvážena velkým počtem generovaných polymorfismů (Krauss a Peakall, 1998).

Mikrosatelity jako příkladné kodominantní markery

Tato metoda využívá skutečnosti, že ve většině genomů existují početné lokusy v nichž se vyskytují mnohonásobné repetic určitého jednoduchého sekvenčního motivu o délce jedné až čtyř bází-tzv. mikrosatelity (také simple sequence repeats (SSRs) (např. Goldstein a Schlotterer, 1999; Powel et al., 1996; Provan, Powel a Hollingsworth, 2001). Počet opakování daného motivu v jednotlivých lokusech se liší a v rámci jednoho lokusu existuje v počtu repetic často velký polymorfismus související s jejich vysokou proměnlivostí (mutační rychlost v těchto oblastech se pohybuje okolo 10^{-3} – 10^{-5} na generaci a lokus. Oblasti mikrosatelitů se nacházejí jak v jaderné, tak chloroplastové DNA. Jaderné mikrosatelity jsou často velmi druhově specifické, velmi variabilní a používají se pro studie na vnitrodruhové úrovni (Lowe et al., 2004). Na vyšší úrovni může nastat problém s homologií alel (Buteler et al., 1999), nulovými alelami (Callen et al., 1993) a univerzálností primerů pro všechny studované taxony. Variabilita chloroplastových mikrosatelitů odpovídá variabilitě cpDNA. Chloroplastové mikrosatelity jsou používány pro hodnocení mezidruhových vztahů (mezidruhové variability) (např. Provan et al., 1999).

Princip metody

Délkový polymorfismus lokusů je detekován namnožením vybraných úseků technikou PCR a rozdělením produktů (alel) gelovou nebo kapilární elektroforézou. Vzhledem k celkovému počtu lokusů v genomech a stupni jejich polymorfismu představují mikrosatelity optimální lokusy pro molekulárně taxonomické studie (Flegr, 2005).

Mezi výhody této metody patří kodominantní povaha markeru, čehož je využíváno při analýzách rodičovství (rod *Hordeum*; Provan et al., 1999) nebo identifikaci polyploidních druhů.

Nevýhodou je potřeba syntézy primerů pro PCR, při práci s novým genetickým materiálem (např. Robinson a Harris, 1999).

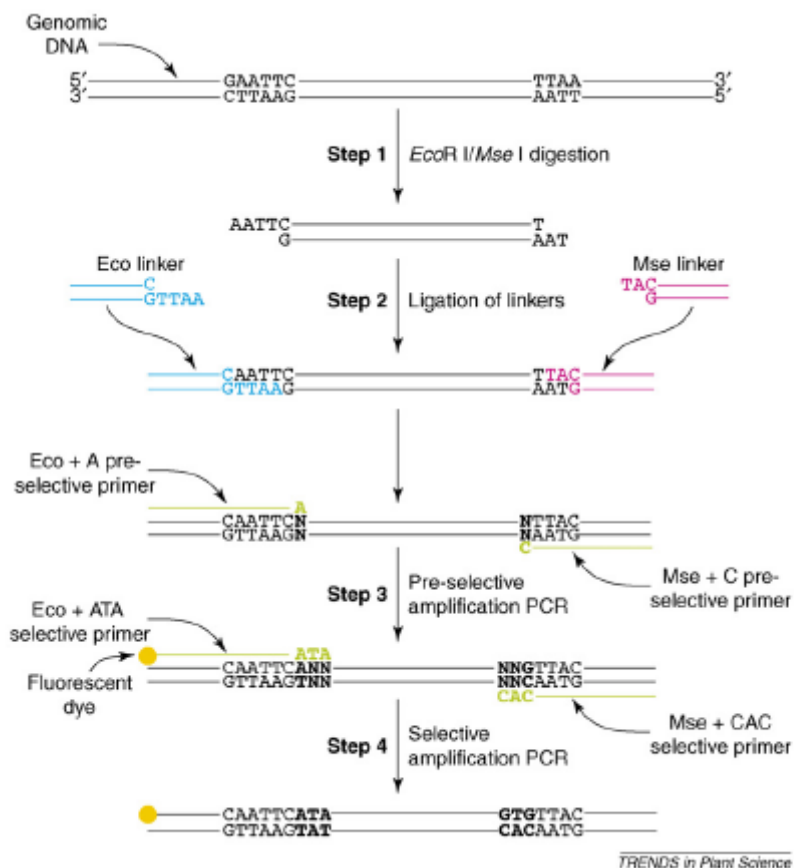
Hodnocení kodominantních dat

Hodnocení dat se provádí výpočtem genetických vzdáleností mezi jedinci na základě frekvencí alel v lokusu např. Jaccardovým koeficientem (Jaccard, 1908) a následnou konstrukcí dendrogramu (např. shlukovací metodou UPGMA, Sneath a Sokal, 1973). Pro mikrosatelitová data byla také vyvinuta řada specifických koeficientů, které zohledňují délku jednotlivých alel a umožňují tak přesněji odhadnout genetické vzdálenosti mezi jedinci za předpokladu tzv. step-wise mutačního modelu (Jarne a Lagoda, 1996).

AFLP (=Amplified Fragment Length Polymorphism)

Základním principem této metody je štěpení celkové DNA dvěma restričními enzymy, které je následováno selektivní amplifikací jen některých úseků. U těch je hodnocen polymorfismus v délce (Vos et al. 1995).

Průběh metody je rozdělen do několika fází. V první fázi – *restrikci* - je rozštěpena celková DNA dvojicí restričních endonukleáz (např. *EcoRI* a *Mse I*) na mnoho fragmentů. V druhém kroku - *ligaci* - jsou k oběma koncům takto získaných úseků připojeny tzv. adaptory, krátké úseky dvouřetězcové DNA o známé sekvenci. V *preselektivní amplifikaci* jsou metodou PCR s dvojicí primerů, které jsou komplementární k sekvenci adaptorů a s jednou bazí (tzv. selektivní) navíc, namnoženy jen některé fragmenty, asi 1/16 z původního počtu fragmentů po restrikci. Čtvrtou fází je tzv. *selektivní amplifikace*, PCR amplifikace fragmentů po preselektivní amplifikaci s použitím tzv. selektivních primerů (tj. primerů se dvěma až čtyřmi selektivními bazemi, přičemž jeden z primerů je značen fluorescenčním značením), která zajistí redukci počtu fragmentů na optimální počet, který je možné vyhodnocovat.



Obrázek 4. Schéma průběhu AFLP analýzy molekuly DNA (step1, restrikce = rozštěpení celkové DNA; step 2, ligace = připojení adaptorů na konce vzniklých fragmentů; step 3, preselektivní amplifikace = amplifikace vybraných fragmentů pomocí primerů s jednou selektivní bazí; step 4, selektivní amplifikace = amplifikace fragmentů vzniklých v předchozím kroku pomocí primerů se třemi selektivními bazemi. (podle Meudt et al., 2007)

Vyhodnocení délek fragmentů je prováděno na automatickém sekvenátoru elektroforetickým rozdělení produktů podle délky. Výsledná data jsou dominantní povahy a jsou skórována jako přítomnost/nepřítomnost proužků v daném lokusu u všech vzorků. Z těchto dat je sestavena 0-1 matice, která je dále vyhodnocována vhodnými metodami, které pomohou vyřešit položené otázky.

Nejpodstatnější výhodou techniky AFLP je vysoký počet polymorfismů, který je touto metodou generován (až 100 fragmentů=lokusů na jednu kombinaci primerů). Ve studiích zabývajících se srovnáváním restričních technik (Bachmann, 1992, Powell et al., 1996, Karp et al., 1996, Jones et al., 1997, Milbourne et al., 1997, Russell et al., 1997, a McGregor et al., 2000) bylo pozorováno, že relativně málo informací poskytuje metoda RFLP, markery SSR, RAPD a ISSR poskytují asi dvakrát větší množství informací než RFLP, zatímco metoda AFLP se z tohoto pohledu vymyká, neboť ve srovnání s RAPD poskytuje až desetinásobné množství informací (na jednu kombinaci primerů). Barker et al. (1999), studoval genetickou diverzitu v rodu *Salix* (Salicaceae), našel 170 polymorfních proužků s 20 RAPD primery, ale 645 polymorfních proužků se 4 AFLP primery. Nakajima et al. (1998) shledal, že AFLP produkuje v průměru čtyřikrát více proužků na reakci ve srovnání s RAPD v jejich studii diverzity rodu *Daucus* (Apiaceae).

Dalšími výhodnými charakteristikami AFLP jsou: potřeba nulové znalosti analyzovaného genetického materiálu, na rozdíl od technik sekvenování nebo mikrosatelitů; vysoký „multiplex ratio“ (= počet odlišných genetických lokusů, které mohou být současně analyzovány v jedné reakci (Rafalski et al., 1996) díky rozmístění fragmentů AFLP skrze celý genom; vysoká spolehlivost a reprodukovatelnost metody (Jones et al., 1997).

Nevýhodami techniky je vedle relativní finanční náročnosti dominantní povaha AFLP markerů. Velkým problémem v analýze AFLP může být homologie fragmentů –problematika tzv. komigrujících proužků, kterou diskutují např. Mace et al., 1999 a Kardolus et al., 1998.

Použití metody - aplikace

V současnosti se metoda AFLP nejvíce využívá ke studiu „základní“ diverzity, genetické variability (např. Russel et al., 1999; Krauss a Peakall, 1998: analýza otcovství v přirozených populacích *Persoonia mollis* (Proteaceae)) a také v systematice.

Účinnost metody ve fylogenetických analýzách doložil např. Aggarwal et al. (1999), který studoval fylogenetické vztahy mezi diploidními a polyploidními druhy rodu *Oryza* s použitím AFLP markerů nebo Kardolous et al., (1998), který aplikoval AFLP na taxonomii rodu *Solanum* a shrnul, že AFLP je „efektivní a spolehlivá technika pro evoluční studie“. Obecným znakem těchto prací je, že tyto druhy nebo rody byly již téměř prostudovány, než byly použity jiné markery, tzn., že málo AFLP studií poskytlo takové postřehy, které by nebyly dostupné z jiných markerů. Tak je to např. se studií rodu *Oryza*, který byl intenzivně studován a výsledky od Aggarwal et al. (1999) jsou obecně v souladu s taxonomií rodu založenou na jiných liniích důkazů.

Metoda AFLP byla však také úspěšně použita v případech, kdy např. předchozí studie založené na sekvenování DNA detekovali minimální rozdíly mezi blízkými taxony a nebylo tak možno jednoznačně určit vztahy mezi jednotlivými druhy (např. rod *Trollius* L.: Després et al. 2003 nebo rod *Achillea*, Guo, 2005).

Vyhodnocování dominantních dat pro účely rekonstrukce fylogeneze

K interpretaci získaných molekulárních dat pro účely řešení systematických otázek se zejména využívá (1) konstrukce dendrogramů, stromových grafů znázorňující jakékoli vztahy mezi objekty-taxony, (2) ordinačních metod, zejména analýzy hlavních koordinát (=PCoA), nebo (3) analýz molekulární variance (AMOVA), pro zjištění „rozložení“ celkové variability populací.

Konstrukce dendrogramů-shlukovací metody

Pro případ dominantního markeru, s výstupními daty v podobě dat binárních (jako např. u AFLP) se pro konstrukci dendrogramů využívá shlukovacích metod.

Z matice binárních dat jsou vypočteny genetické vzdálenosti (pro každý pár studovaných taxonů) pomocí jednoho z několika možných koeficientů podobnosti. Nejčastěji používané koeficienty podobnosti jsou Jaccardův (Jaccard, 1908), který měří podíl společných znaků (=proužků na vyhodnocovaném gelu), Nei-Li koeficient (Nei-li, 1979), který měří pravděpodobnost, že proužek amplifikovaný v jednom vzorku je amplifikován i v jiném vzorku a simple matching koeficient, (SMC; Sneath a Sokal, 1973), který měří podíl společných proužků (přítomných i nepřítomných) mezi dvěma vzorky.

Následně je vybrán vhodný shlukovací algoritmus např. metoda průměrné vzdálenosti- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean = UPGMA (Sneath a Sokal, 1973) nebo neighbor-joining (NJ method , Saitou a Nei 1987), podle kterého je zkonstruován fenogram, dendrogram popisující vzájemnou podobnost studovaných taxonů. Díky selekční neutralitě hodnocených znaků odráží fenogram průběh fylogeneze a může sloužit jako hypotéza o fylogenetických vztazích mezi studovanými taxony.

K posouzení stupně věrohodnosti získaných výsledků (podpory jednotlivých větví stromu) slouží např. technika opakovaných výběrů- tzv. bootstrapping (Manly, 1997).

Analýza hlavních koordinát (principal coordinate analysis = PCoA; Gower, 1966)

PCoA slouží k nalezení směřů největší variability v datech na základě koeficientů podobnosti mezi jednotlivými jedinci. Je vhodná pro interpretaci velkého množství binárních dat (jako jsou napr. data z AFLP), ale i jiných znaků. Výsledkem této analýzy je nově zkonstruovaný *n*-rozměrný prostor zobrazující jedince, jejichž vzájemná eukleidovská vzdálenost v tomto prostoru odráží vztahy mezi studovanými objekty (tyto vztahy jsou měřeny libovolným koeficientem podobnosti).

Analýza molekulární variance (AMOVA, Excoffier, Smouse a Quattro, 1992)

AMOVA je používána pro zjištění rozložení celkové genetické variability mezi variabilitu uvnitř populací a variabilitu mezi populacemi, popřípadě mezi skupinami populací. Tuto analýzu lze aplikovat jak na dominantní (např. AFLP), tak na kodominantní data (např. mikrosatelity), případně i na sekvenční data. Hodnoty vnitropopulační a mezipopulační diverzity jsou vypočteny některým z algoritmů (např. pomocí programu FAMD, Schlüter, 2006) z dat matice podobnosti mezi jedinci.

2.3. Polyploidní rod *Curcuma* a jeho specifika

2.3.1 Taxonomické zařazení rodu

říše: Plantae (rostliny)
podříše: Tracheobionta (cévnaté rostliny)
oddělení: Magnoliophyta (krytosemenné)
třída: Liliopsida (jednoděložné)
řád: Zingiberales (zázvorotvaré)
čeleď: Zingiberaceae (zázvorovité)
rod: *Curcuma*

Řád Zingiberales

Řád Zingiberales je podle současného taxonomického přístupu (Kress 1990) dělen na osm čeledí (Musaceae s.s., Streliziaceae, Lowiaceae, Heliconiaceae, Cannaceae, Marantaceae, Costaceae a Zingiberaceae) a zahrnuje přes 90 rodů a 2200 druhů. Mnohé z nich jsou ekonomicky významné a jsou pěstovány pro komerční využití, např. banány (Musaceae), různá koření (Zingiberaceae), léčivé rostliny (zejména Zingiberaceae) nebo okrasné rostliny (zástupci ve všech čeledích).

Tento řád je považován za monofyletickou skupinu, což bylo podpořeno jak morfologickými studiemi (např. Tomlinson, 1962; Panchaksharappa, 1962; Thorne, 1976; Cronquist, 1981), tak nedávnými molekulárními studiemi (Kress, 1990).

Čeleď Zingiberaceae

Čeleď Zingiberaceae je s 53 rody a více než 1200 druhy je nejrozsáhlejší čeledí v řádu Zingiberales (Kress 1990). Významnými rody jsou *Alpinia* Roxb. s přibližně 250 druhy, *Amomum* (cca 150 druhů), *Zingiber* (cca 90 druhů), *Curcuma* (po revizi až 120 druhů, Škorníčková et al. 2004), *Kaempferia* (cca 70 druhů) a *Hedychium* s asi 80 druhy. (Podle Škorníčková, 2007).

Zingiberaceae jsou vytrvalé byliny obývající nejčastěji spodní patro tropických lesů, některé jsou epifytické. Zástupci čeledi jsou rozšířeni od nížin po horské oblasti přibližně do 3500 m.n.m. a mnoho z nich je běžných i na lokalitách poznamenaných lidskou činností. Ve většině stále zelených lesů a ve stále vlhkých oblastech sezónních lesů si udržují jedinci listy po celý rok, v oblastech sezónních lesů jedinci přecházejí v období sucha do dormance a přežívají jako podzemní oddenek (Škorníčková 2007, Holttum, 1950)

Čeleď je rozšířena v tropických oblastech s největší koncentrací v tropické Asii a spíše sporadicky v Africe a Jižní Americe (Holttum 1950).

Zingiberaceae patří mezi obtížně studovatelné skupiny rostlin. Hlavními důvody jsou potřeba studia živého kvetoucího materiálu, přičemž některé druhy kvetou jen velmi krátce, zásobní orgány, které obsahují důležité diagnostické znaky lze těžko uchovávat jako suché vzorky. Mnoho druhů bylo popsáno před více než 150 lety a jejich identita je dodnes nejasná. Důsledkem těchto problémů je časté přiřazování jednoho jména k několika povrchně podobným druhům a naopak, několika různých jmen k jedinému druhu, který však vykazuje značnou vnitrodruhovou variabilitu. Výsledkem je celkový zmatek v taxonomii této čeledi (Burt a Smith, 1972; Škorníčková, 2007).

Pro objasnění vztahů uvnitř Zingiberaceae a následný pokus o přirozenou klasifikaci této skupiny se jeví jako nadějně použití moderních přístupů a metod, jako je například využití molekulárních markerů, sekvenování DNA apod. To potvrzuje nedávná studie o nové

klasifikaci čeledi Zingiberaceae (Kress, 2002), která využívá k rekonstrukci fylogenetických vztahů kombinaci molekulárních dat ze sekvencí úseků jaderné a chloroplastové DNA-ITS a *matK*. Jejím výsledkem je obecně přijaté vnitřní členění čeledi Zingiberaceae:

ZINGIBERACEAE

Siphonochiloideae

Siphonochileae

Tamijioideae

Tamijieae

Alpinioideae

Alpinieae

Riedelieae

Zingiberoideae

Zingibereae → *Curcuma*

Globbeae

2.3.2 Polyploidie v čeledi Zingiberaceae

V čeledi Zingiberaceae se polyploidní komplexy vyskytují často, zejména v podčeledi Zingiberoideae, kde byly pozorovány např. u rodu *Globba* s $2n = 24, 32, 48, 64, 80, 96$ (Ramachandran, 1969; Lim, 1972; Larsen, 1972; Takano, 2001; Takano a Okada, 2002), dále u rodu *Hedychium* (Raghavan a Venkattasuban, 1943; Sharma a Bhattacharya, 1959; Mukherjee, 1970; Chen a Chen, 1984) *Kaempferia* (Raghavan a Venkattasuban, 1943; Sharma a Bhattacharya, 1959; Ramachandran, 1969; Mahanty, 1970) *Boesenbergia* (Poulsen, 1993), *Zingiber* (Bisson et al., 1968; Sato, 1960; Ramachandran, 1969) a dalších včetně rodu *Curcuma* s $2n = 20, 24, 28, 32, 34, 36, 40, 42, 56, 62, 63, 64, 84$ (podle Škorníčková, 2007).

Produkce neredukovaných gamet a následný vznik autopolyploidů byl pozorován u rodu *Globba* (Takano a Okada, 2002) stejně jako dříve u jiných jednoděložných (např. Refouffi et al., 2001).

Ačkoli triploidní taxony jsou obvykle v polyploidních komplexech vzácné, mezi Zingiberaceae byly zaznamenány u rodů *Globba* ($2n = 3x = 48$, Takano a Okada, 2002) a *Curcuma* ($2n = 3x = 63$, např. Apavatjirut et al., 1996; Joseph et al., 1999; Sirisavad et al., 2003). Stejně jako u rodu *Globba*, existují u rodu *Curcuma* o triploidních taxonech jisté dohady. U rodu *Globba* byl navržen taxon s $2n = 48$ jako triploidní podle Takano a Okada (2002), kde za základní chromosomové číslo bylo považováno $x = 16$. Podle Lim (1972) je však základní chromosomové číslo u tohoto rodu $x = 8$, a tedy $2n = 48$ odpovídá hexaploidnímu taxonu. Podobně je tomu u rodu *Curcuma*, kde byly polyploidní stupně uvažovány při základním chromosomovém čísle $x = 21$ (tedy diploidi $2n = 42$, triploidi $2n = 63$ a zřídka tetraploidi s $2n = 84$, podle Ramachandran, 1961; Prana, 1977; Prana et al., 1978; Islam, 2004), zatímco Leong-Škorníčková et al., (2007) zastávají názor, že základním chromosomovým číslem je $x = 7$ s polyploidní řadou $2n = 6x = 42, 2n = 9x = 63, 2n = 12x = 84, 2n = 11x = 77$ a $2n = 15x = 105$.

2.3.3 Charakteristika rodu *Curcuma*

Rozšíření a druhová bohatost

Rod *Curcuma* patří mezi nejpočetnější rody čeledi Zingiberaceae. Má svá přirozená stanoviště v oblasti jižní a jihovýchodní Asie s několika druhy zasahujícími svým „teritoriem“ do Číny, Austrálie a Jižního Pacifiku. Centrem diverzity je Thajsko a Indie (kolem 40 druhů v každé oblasti), dále pak Myanmar, Bangladéš, Indonésie a Vietnam. Užítkově významné druhy (koření, okrasné rostliny, zdroj škrobu či farmakologicky významných složek atd.) jsou pak pěstovány v tropech celého světa.

Přesný počet druhů rodu *Curcuma* není znám, přičemž v posledních 30 letech kolísaly odhady od 50 (Smith, 1981), přes 80 (Larsen et al., 1998), 100 (Sirirugsa, 1996), zatímco Škorníčková et al. (2004) navrhuje, že počet druhů by se mohl blížit číslu 120.

Takto vysoké odhady jsou založeny jak na studiu všech platně publikovaných jmen pro rod *Curcuma* a jejich typů (více než 130, mnohá však dlouhodobě přehlížena; Škorníčková, osobní komunikace), tak nedávnými objevy nových druhů v jihovýchodní Asii (Sirirugsa a Newman, 2000; Mood a Larsen, 2001) a Indii (Škorníčková et al., 2003a,b, 2004). Další „nárůst počtu druhů“ může být očekáván v méně prozkoumaných oblastech jako je Laos, Kambodža nebo Vietnam, kde jsou uváděny jen malé počty známých druhů, avšak vzhledem k vhodnému klimatu mohou být odhady druhové diverzity daleko vyšší (Škorníčková, 2007).

Stanoviště

Druhy rodu *Curcuma* se uplatňují jako součást podrostu na okrajích tropických a subtropických primárních a sekundárních lesů, křovinných formací, otevřených pastvinách, plantážích, v podrostu plantaží kokosových a betelových palem, na březích řek nebo zřídka i v bambusových lesích (Mangaly a Sabu, 1993). Některé druhy mohou být i prvními osidlovateli narušených oblastí jako jsou okraje silnic nebo příkopy.

S typem stanoviště těsně souvisí i stupeň ploidie u jednotlivých druhů. Obecně lze říci, že zatímco druhy rozmnožující se semeny můžeme obvykle nalézt na primárních typech stanovišť, sterilní, vysoce polyploidní druhy jsou rozšířeny na sekundárních stanovištích a v člověkem narušených oblastech (Škorníčková, 2007). Několik těchto druhů je kultivováno (tamějším obyvatelstvem ale i jako komerční zemědělská činnost) a díky tomu nalézáno i mimo svá obvyklá stanoviště (Mangalay a Sabu, 1993). V důsledku lidských migrací se některé z těchto vysoce polyploidních druhů nacházejí po celé Asii a dokonce i v Africe a Americe.

Morfologie

Zástupci rodu *Curcuma* jsou vytrvalé byliny s oddenky, jež zatahují nadzemní části během období sucha v monzunových oblastech. Většina druhů je střední velikosti, přibližně 0,5-1,5 m vysokých, nejmenší druhy však měří 15-20 cm, nejstatnější dosahují až 3,5 m. Oddenky jsou jednoduché oválné, nevětvené, nebo větvené. „Větve“ oddenků mohou být krátké a sloužit zejména jako zásobní orgán, nebo dlouhé plazivé výhonky, které dávají možnost růstu nových listových výhonů daleko od původní rostliny. Oddenky jsou obvykle zvenku světle hnědé, uvnitř pak jsou barvy bílé, mohou mít několik odstínů barvy žluté, modravé až tmavě modré, od světlé po tmavě oranžovou, žluté se zelenavými okraji, šedé, apod. Tyto charakteristiky oddenků jsou značně specifické, ačkoli intenzita barevného odstínu může být ovlivněna stářím rostliny nebo snad i ekologickými činiteli. Kořenové hlízy jsou přítomny u všech druhů rodu *Curcuma*, jsou umístěny na koncích kořenů, vzdáleny od oddenků 5 až 20 cm. Tyto hlízy obsahují škrob a nejsou schopny rašení (odnožování). Jejich funkce je

výhradně za účelem uskladnění energie nezbytné pro rostlinu během období dormance. U většiny druhů se tvoří tzv. pseudostem (nepravý stonek), který je tvořen těsně se objímajícími listovými pochvami. Listy mají pochvu a jsou většinou řapíkaté, vzácně přisedlé. Vlastní list je obvykle kopinatý, podlouhlý nebo vejčitý, zřídka čárkovitý; jasně zelený. Některé druhy mají purpurové nebo fialové skvrny na svrchní straně listů, které u některých druhů pronikají na spodní stranu. Velikost, tvar a relativní umístění skvrn na listu, barva a hustota, mohou být nápomocné při určování některých druhů, ale jsou obvykle proměnlivé zejména u rostlin rozmnožujících se semeny. Žilnatina je souběžná, u většiny druhů hlavní žilky viditelně vystupují a vytvářejí nápadné vroubkování na svrchní straně listu. Přítomnost oddenku je značně variabilní, zejména u druhů tvořících semena, ale může být relativně spolehlivým znakem u některých sterilních druhů. Květy jsou uspořádány v květenství, které je tvořeno listeny. Ty jsou obvykle po stranách spojeny se sousedním listenem a tvoří tak tzv. kapsy (pouches). Listeny ve spodní části květenství jsou plodné, objímající 1-10 květů obvykle méně barevné, často zelené, a více srostlé než listeny ve vrcholových částech květenství. Vrcholové listeny jsou obvykle větší, delší a jasně zbarvené, nazývané 'coma', neboli chochol. Tato část květenství pravděpodobně slouží k vábení opylovačů. Několik druhů nemá výrazně oddělené části květenství.

Květenství může vyrůst ve dvou polohách vzhledem k listům-laterálně nebo centrálně. Laterální květenství se objevuje záhy po předmonzunových sprškách, dříve než začne období dešťů, u některých druhů dokonce dříve, než se vytvoří listy. Druhy s centrálním květenstvím kvetou později, květenství vyrůstá mezi listovými pochvami. Několik málo druhů se vyznačuje zvláštním typem centrálního květenství, které se protrhne nepravým stonkem (např. *C. rubrobracteata*).

Mnohé druhy, které se rozmnožují semeny, jsou schopny kvést dvakrát za sezónu, jedenkrát na začátku sezóny (laterálně) a pokud jsou monzunové deště dostačující, pak také později v létě (centrálně) (podle Škorníčková, 2007).

Specifické znaky v závislosti na stupni ploidie- kvetení, sterilita a variabilita

Všechny druhy rodu *Curcuma* vykazují jeden ze tří způsobů kvetení - laterální, centrální, nebo oba. Při pozorování způsobů kvetení indických druhů rodu *Curcuma* byla zjištěna korelace s ploidní úrovní, stavbou oddenků a relativní variabilitou pozorovaných jedinců. Tyto korelace vystihuje tabulka 1. Zatímco všechny sterilní druhy (tj. $2n = 9x = 63$) vykazují vždy jen jeden způsob kvetení (většinou laterálně indické druhy a centrálně některé javanské), většina druhů rozmnožujících se semeny ($2n = 42$) je schopná kvést dvakrát (nejprve laterálně a v příhodných podmínkách i centrálně).

Morfologická variabilita rostlin úzce souvisí se způsobem rozmnožování a ploidní úrovní. *Curcuma* je obecně považována za rod, jehož druhy jsou si velmi podobné a těžko rozeznatelné. Přesto si již někteří autoři v minulosti všimli, že některé druhy rodu *Curcuma* si zachovávají jemné, ale trvalé rozdíly (Roxburgh 1810; Wight, 1853; Valeton, 1918). Tito autoři však pracovali s materiálem, který není velmi reprezentativní pro celý rod, protože zahrnoval především sterilní, vysoce polyploidní druhy ($2n=63, 105$), které se rozmnožují (a to v zřejmě naprosté většině případů) výhradně vegetativně pomocí rozvětvených oddenků a tudíž vykazují nízkou variabilitu. Ve skutečnosti mohou tyto sterilní druhy představovat jen několik klonů, které jsou rozmístěny v mnoha oblastech během několika set let trvajících migraci (lidský faktor, pomocí oddenků).

Druhy rozmnožující se semeny ($2n = 22, 42, 77$) vykazují jeden ze tří odlišných stupňů variability a jeden ze dvou charakteristických staveb oddenků. Druhy s větvenými oddenky obvykle vykazují střední nebo nízkou variabilitu a většinou kvetou jen jednou, formace semen není tak častá a tudíž se dá předpokládat, že se tyto druhy částečně (a v různé míře u různých druhů) spoléhají na vegetativní reprodukci. Rostliny s nevětvenými

(vejčitými) oddenky jsou prakticky odkázány na sexuální rozmnožování, ve většině případů jsou schopny kvést dvakrát v jedné sezóně, tvoří velké množství semen a vykazují většinou vysokou či střední variabilitu (Škorníčková, 2007).

Je možné předpokládat, že vegetativní rozmnožování se vyvíjí jako důsledek narušené sexuální reprodukce u kříženců (hybridních taxonů).

Druh	pozice květenství	oddenek	variabilita	způsob rozmnožování
2n=2x=22				
<i>C. vamana</i>	centrální	větvený	nízká	veg./sex.
2n=6x=42				
<i>C. angustifolia</i>	laterální	vejčitý	střední	sexuální
<i>C. aff. aromatica</i> 1.	lat./cent.?	větvený	nízká	veg./sex.
<i>C. prakasha</i>	lat./cent.?	větvený	vysoká	veg./sex.
<i>C. aurantiaca</i> (= <i>C. ecalcarata</i>)	centrální	vejčitý	vysoká	sexuální
<i>C. bhatii</i>	centrální	větvený	nízká	veg./sex.
<i>C. cananorensis</i> (= <i>C. lutea</i>)	obě	vejčitý	vysoká	sexuální
<i>C. decipiens</i>	obě	vejčitý	vysoká	sexuální
<i>C. inodora</i> (= <i>C. purpurea</i>)	obě	vejčitý	vysoká	sexuální
<i>C. karnatakensis</i>	obě	vejčitý	střední	sexuální
<i>C. mutabilis</i>	obě	vejčitý	vysoká	sexuální
<i>C. neilgherrensis</i>	obě	vejčitý	střední	sexuální
<i>C. pseudomontana</i>	obě	vejčitý	vysoká	sexuální
<i>C. reclinata</i> (= <i>C. sulcata</i>)	obě	vejčitý	vysoká	sexuální
2n=9x=63				
<i>C. aeruginosa</i>	laterální	větvený	nízká	vegetativní
<i>C. aff. aromatica</i> 2.	laterální	větvený	nízká	vegetativní
<i>C. aff. aromatica</i> 3.	laterální	větvený	nízká	vegetativní
<i>C. leucorrhiza</i>	laterální	větvený	nízká	vegetativní
<i>C. zanthorrhiza</i>	laterální	větvený	nízká	vegetativní
<i>C. longa</i>	centrální	větvený	nízká	vegetativní
2n=11x=77				
<i>C. oligantha</i> (Sri Lanka)	obě	větvený	střední	veg./sex.
2n=15x=105				
<i>C. raktakanta</i> (= <i>C. malabarica</i>)	laterální	větvený	nízká	vegetativní

Tabulka 1: Pozice květenství ve vztahu ke stupni polyploidie, struktuře oddenků a k variabilitě u vybraných indických druhů rodu *Curcuma*; “?” = není potvrzeno přímým pozorováním (upraveno ze Škorníčková, 2007) (Tyto a další druhy jsou analyzovány v praktické části.)

2.3.4 Taxonomie a vnitřní členění rodu

Od počátků studií rodu *Curcuma* byl tento rod členěn na podrody na základě různých morfologických znaků. Roxburgh (1810) jako první rozdělil rod do dvou sekcí na základě pozice květenství vůči rostlině – centrální nebo laterální. Přestože již Roxburgh pozoroval, že některé druhy mohou kvést oběma způsoby - centrálně i laterálně, většina autorů přesto používala tento znak pro rozdělení přinejmenším na nižších úrovních (subsekcce) (Horaninow, 1862; Baker, 1890; Valeton, 1918; Velayudhan et al., 1996). Dalšími hlavními znaky používanými pro členění rodu byly charakteristiky oddenků (jejich délka, přítomnost hlíz), tyčinek, staminodií, tvar listenů (Valeton 1918), přítomnost/nepřítomnost sesilných hlíz (Velayudhan et al., 1996, 1999).

Podle Velayudhan et al. (1996) a Škorníčková (2007) žádná z dosavadních vnitřních klasifikací rodu není vhodná, neboť není ani přirozená, tj. nereflektuje fylogenetické vztahy mezi druhy, ani praktická, neboť je založena na znacích, které je potřeba sledovat po prodlouženou dobu na živém materiálu.

Pro praktické účely se někdy používá členění podle Schumanna (1904), které rozděluje rod na podrod *Eucurcuma* Schum. (*Curcuma*) (přítomnost ostruh na tyčince), a podrod *Hitcheniopsis* Baker (absence ostruh na tyčince). Leong-Škorníčková et al. (2007) zmínili, že lepším diskriminačním znakem pro tyto dva podrody je přítomnost epigynních nektarií, než přítomnost ostruh na tyčinkách.

2.3.5 Nejnovější poznatky v rodu *Curcuma*

Asi nejkritičtější problém u rodu *Curcuma* je identita mnoha druhů, včetně těch běžně používaných v denním životě např. *C. zedoaria*, *C. longa*, *C. aromatica*. Většina druhů je dosti variabilní, ale mnoho si je jich navzájem velmi podobných. Navíc se některé druhy mohou vzájemně křížit a naturalizovat. Často je jedno jméno aplikováno na mnoho různých druhů nebo mnoho jmen pro jeden druh a typový materiál je pro mnoho jmen dosud neznámý a lektotypy nebyly vybrány. Absence kompletní revize rodu *Curcuma* v celém geografickém areálu tak způsobuje zmatek mezi taxonomy, ale má dopad i na mnoho ostatních disciplín (Velayudhan et al., 1996, Škorníčková, 2007).

Počty chromosomů

Nedávná rozsáhlá cytologická studie (Leong-Škorníčková et al., 2007) zahrnující asi 46 druhů, 160 jedinců rodu *Curcuma* poskytla řadu nových poznatků o počtech chromosomů, velikostech genomu a stupních ploidie, což vnáší nové světlo do málo jasných vztahů mezi druhy uvnitř rodu. Ve srovnání s publikovanými počty chromosomů z dřívějších studií rodu *Curcuma* v Indii ($2n = 22, 40, 42, 48, 62, 63, 64, 66, 84, 86, 93$, podle Chakravorti, 1948, Das et al., 1999, Ramachandran, 1961, 1969, Nambiar et al., 1982, Sharma a Bhattacharya, 1959; Nayak et al., 2006, Sharma, 1970; Chatterjee et al., 1989, atd.) bylo ve studii Leong-Škorníčková et al. (2007) zaznamenáno pouze šest chromosomových čísel (tj., $2n = 22, 42, 63, >70, 77$ a 105), která jsou ve většině případu násobkem čísla $x = 7$.

Nejčastěji pozorované počty $2n = 42$ a $2n = 63$ jsou většinou v souladu s dřívějšími pozorováními. Některé konkrétní nesrovnalosti přisuzují autoři misidentifikaci vzorků nebo širšímu pojetí druhů přijímanému ve starších studiích. Karyologická variabilita (např. aneuploidie) nebyla v jejich studii pozorována, a přestože ji autoři *a priori* nevylučují, poukazují na fakt, že chromosomy v rodu *Curcuma* jsou velmi malé, početné a většina aneuploidních počtů je staršího data (použití méně dokonalých technik při počítání chromosomů mohlo produkovat více chyb). Autoři upozorňují, že přestože bylo provedeno

mnoho výzkumů, které se zabývaly určováním počtu chromosomů a stupňů ploidie u rodu *Curcuma* v nejrůznějších oblastech (Thajsko, Indie, Bangladéš a Čína), mnoho z nich trpí nedostatkem dokladových herbářových materiálů a jejich identita se tudíž nedá ověřit.

Základní chromosomové číslo a stupeň ploidie

V počátcích karyologických studií u rodu *Curcuma* zaznamenali Raghavan a Venkatasuban (1943) poprvé, že základní chromosomové číslo je $x = 21$. Pozdější studie navrhovali $x = 7$ a $x = 8$ (Sato, 1960). Ramachandran (1961) pak pozoroval pravidelné tvoření bivalentů při meiose u druhu *C. decipiens* ($2n = 42$) a vysokou frekvenci trivalentů u *C. longa* ($2n = 63$), což podpořilo dřívější myšlenku, že $x = 21$. Další autoři navrhovali i jiná základní čísla, nicméně, $x = 21$ je dosud nejběžněji akceptovaným základním chromosomovým číslem v rodu *Curcuma* (Ramachandran, 1961; Prana, 1977, 1978; Ardiyani, 2002; Islam, 2004). Jak poznamenává Ramachandran (1961, 1969), toto číslo je patrně výsledkem dávné polyploidie.

Základní chromosomové číslo $x = 7$ je nižší alternativa pro základní číslo $x = 21$ a není tak v konfliktu s předchozími studiemi. Navíc tato hodnota dobře vysvětluje pozorované chromosomové číslo u *C. oligantha* $2n = 77$. Podle Granta (1982) jsou nejběžnější chromosomová čísla u jednoděložných $x = 7$ a 10. Autoři studie Leong-Škorníčková et al. (2007) se domnívají, že $x = 7$ by mohlo být považováno za základní chromosomové číslo pro nominální podrod *Curcuma* (tzn. většinu indických druhů). Z tohoto pohledu by se původně zamýšlené diploidní taxony staly taxony hexaploidními a triploidní nonaploidními atd.

Velikost genomu v rodu *Curcuma*

Určováním velikosti genomu u rodu *Curcuma* se dosud zabývalo jen malé množství prací (Bharathan et al., 1994; Das et al., 1999; Islam, 2004), navíc často s rozporuplnými výsledky (Škorníčková, 2007).

Výsledky studie Leong-Škorníčková et al. (2007) týkající se velikosti genomu u indických zástupců rodu *Curcuma* odhalily na jedné straně relativně malý počet druhově specifických genomových velikostí, na druhé straně však odhadované hodnoty homoploidní velikosti genomu (Cx) utvořily tři dobře definované skupiny se signifikantně odlišnými Cx -hodnotami (skupina GI, GII, GIII). Autoři navrhují, že tyto skupiny mohou mít odlišnou evoluční historii, což je podpořeno i jejich rozdílným geografickým rozšířením. Výsledků této studie je využito v praktické části této práce (viz dále).

Karyomorfoloická data

Vzhledem k tomu, že chromosomy kurkum jsou velmi malé (velikost je v rozmezí 0,5-2,0 μm ; Ramachandran, 1961; Apavatjirut, 1996; Joseph et al., 1999; Sirisawad, 2003), a jsou si morfoloicky velmi podobné (Sharma a Bhattacharya, 1959), jejich počítání pod mikroskopem je nesnadné a většina studií neuvádí karyotypy (Newman, 1988; Ardiyani, 2002; Islam 2004). Nicméně, strukturní změny chromosomů pozorovatelné v různých karyotypech různých druhů jednoho rodu z čeledi Zingiberaceae jsou pozoruhodné a Sharma a Bhattacharya (1959) míní, že každý druh je charakterizován odlišným karyotypem.

2.3.6 Použití molekulárních markerů v čeledi Zingiberaceae a rodu *Curcuma*

Kress et al. (2002) provedl molekulární studii, která poskytla hodnotný vhled do dlouhotrvajících taxonomických problémů v této čeledi. Na jejím základě pak autoři navrhli novou klasifikaci čeledi Zingiberaceae. Několik tribusů (např. *Hedychieae*, Searle a Hedderson, 2000; *Zingibereae*, Ngamriabsakul et al., 2004; *Globbeae*, Williams et al., 2004) či větších rodů (např. *Hedychium*, Wood et al., 2000; *Alpinia*, Rangsiruji et al., 2000b, Kress et al., 2005; *Amomum*, Xia et al., 2004, *Etlingera*, Pedersen, 2004) bylo v posledních letech také podrobena fylogenetickým analýzám s použitím molekulárních markerů (většinou kombinace ITS s jedním z dalších běžně používaných markerů, např. *trnL-F* nebo *matK*). Některé další specificky zaměřené studie napomohly porozumění fyto geografických disjunkcí v rodu *Roscoea* (Ngamriabsakul et al., 2000), původu a vztazích u některých ekonomicky významných druhů (např. *Alpinia galanga*, Rangsiruji et al., 2000), či lepšímu porozumění recentní radiace v rodu *Aframomum* (Harris et al., 2000).

Kress et al. (2002), jejichž analýza čeledi Zingiberaceae byla založená na DNA sekvencích jaderného úseku ITS a úseku *matK* plastidové DNA, navrhli, že rod *Curcuma*, tak jak je dnes akceptován, je parafyletický s rody *Hitchenia*, *Stahlianthus* a *Smithatris*, které sdílejí podobnou stavbu květenství. Studie však zahrnovala pouze 6 vzorků rodu *Curcuma* a autoři sami doporučují další studie s větším množstvím vzorků.

Ngamriabsakul et al. (2004) rozpracoval fylogenezi čeledi Zingiberaceae se stejným jaderným úsekem ITS, ale s rozdílným plastidovým úsekem, *trnL-F*. Jeho analýza ukázala, že rody podobné rodu *Curcuma* (*Hitchenia*, *Paracautleya*, *Smithatris* a *Stahlianthus*) jsou opravdu začleněny v komplexu *Curcuma* a mohou být považovány za jediný rod. Ačkoli jsou zde morfologické znaky podporující separaci jednotlivých taxonů, autoři navrhuje, že tyto znaky mohou být autapomorfni.

V předchozích letech byly využity i jiné molekulární markery při studiu rodu *Curcuma*. Metody analýzy izozymů bylo využito k odhadům genetické variability v přirozených populacích *C. alismatifolia* v Thajsku (Paisooksantivatana et al. (2001). Apavatjirut et al. (1999) využili izozymy k rozeznání sedmi morfologicky podobných sterilních druhů (všechny kvetoucí laterálně) vyskytujících se v Thajsku.

RAPD byl dalším markerem použitým k zodpovězení konkrétních, úzce zaměřených otázek jako např. vztah dvou čínských druhů *C. sichuanensis* a *C. wenyujin*, přičemž výsledky naznačují, že tyto dva druhy se od sebe neliší (Chen et al. 1999). Islam et al. (2005, 2007) použil metodu RAPD k odhadům intra a interpopulační variability u *C. zedoaria*. Nayak et al. (2006) zkombinovali RAPD a analýzu velikosti genomu k určení variace v 17 kultivarech pěstované *C. longa*. Sekvenování 18S rRNA a *trnK* bylo navrženo jako potenciální metodika k rozeznávání několika druhů rodu *Curcuma* běžně uplatňovaných v čínském farmakologickém průmyslu (Cao et al., 2001; Cao et Komatsu, 2003).

Dodnes však nebyla publikována žádná komplexní molekulárně-fylogenetická analýza rodu *Curcuma*.

Další příkladné molekulární analýzy rodů z čeledi Zingiberaceae

Na základě sekvenčních dat z úseků plastidové DNA (intron *rps16*) a nukleární DNA (úsek ITS) byly studovány fylogenetické vztahy „podčeledi“ Alpinioideae s důrazem na rozsáhlý rod *Etlingera*. Dendrogram získaný z kombinací dat ITS a *rps16* podporuje teorii o monofyletickém původu podčeledi Alpinioideae a monofyletičnost skupin *Etlingera* a *Hornstedtia*. Tuto studii provedl Pedersen (2004).

Studii podčeledi Alpinioideae a rodu *Alpinia* provedli Kress et al. (2005). *Alpinia* je největším, nejrozšířenějším a taxonomicky nejsložitějším rodem v čeledi Zingiberaceae s 230

druhy vyskytujícími se v tropické a subtropické Asii. Kress et al.(2005) použil pro průzkum evolučních vztahů metodou sekvenování DNA oblasti ITS a *matK*. Testoval monofyletičnost rodu a platnost předchozích klasifikací na vybraných zástupcích rodu *Alpinia* (72 druhů rodu *Alpinia*, 27 jiných druhů z podčeledi Alpinoideae, 8 druhů z podčeledi Zingiberoideae, 1 druh z podčeledi *Tamijioideae* a 3 druhy rodu *Siphonochilus*-*Siphonochiloideae*, který byl použitý jako „outgroup“). Metodou maximální parsimonie vyhodnocená data z ITS a z *matK*. stejně jako data z kombinace obou úseků, obsahovala šest polyfyletických shluků a druhy momentálně zahrnuté do rodu *Alpinia* byly obsaženy v celém tribu Alpinieae. Kromě vzácných případů, monofyletické skupiny neodpovídají předchozím klasifikacím (Schuman, 1904 a Smith 1990) na základě morfologických studií. Autoři studie navrhuji, že rod *Alpinia* by měl být na základě těchto a budoucích výsledků jinak vymezen.

3. Praktická část

3.1. Úvod

V posledních letech probíhající důkladná taxonomická revize rodu *Curcuma* v Indii (Škorníčková et al., 2003a, b, 2004, 2005a, b, c, 2007) poskytla řadu nových poznatků, zejména v nedávné studii (Leong-Škorníčková et al., 2007), kdy byla publikována cytologická data-velikost genomu, počet chromosomů a stupeň ploidie- pro 161 jedinců ze 46 druhů rodu *Curcuma*, z jednoho křížence a ze čtyř druhů klasifikovaných jako druhy separované, ale příbuzné rodu *Curcuma*.

Výsledky této studie identifikovaly 6 odlišných chromosomových čísel (tj., $2n = 22, 42, 63, >70, 77$ a 105), přičemž většina z nich jsou násobky $x = 7$. Autoři se domnívají, že toto číslo by mohlo být skutečným základním chromosomovým číslem v rodu *Curcuma* a tudíž rostliny s počtem somatických chromosomů 42, 63, 77 a 105 odpovídají hexaploidním (6x), nonaploidním (9x), 11-ploidním a 15-ploidním taxonům. Studie velikosti genomu odhalila na jedné straně relativně malý počet druhově specifických genomových velikostí, na druhé straně však odhadované hodnoty homoploidní velikosti genomu (Cx) utvořily tři dobře definované skupiny se signifikantně odlišnými Cx-hodnotami (skupina GI, GII, GIII; více tab.2). Autoři se domnívají, že tyto skupiny mohou mít odlišnou evoluční historii, což je podpořeno i jejich rozdílným geografickým rozšířením (obr.5).

V rámci projektu GAAV (č. B6407401) byla v letech 2004-2006 provedena předběžná analýza 30 druhů rodu *Curcuma* pomocí metod sekvenování DNA. Byly vybrány tři nekódující úseky cpDNA (*trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *trnG-trnG*) pro nalezení variabilních znaků pro rekonstrukci fylogeneze. V rámci těchto oblastí bylo však nalezeno jen omezené množství použitelných znaků. Zkonstruované dendrogramy přesto poskytly dobře vyhodnotitelné pattern: shluky vytvořili diploidní jedinci z jižní Indie (*C. inodora*, *C. sulcata*, *C. pseudomontana*), zatímco diploidní a triploidní jedinci ze severovýchodní Indie vytvořili druhou dobře podpořenou skupinu (např. *C. zedoaria*, *C. zanthorrhiza*).

Cílem nadcházející studie (diplomové práce) využívající metody AFLP pro řešení otázek, které nebyly zodpovězeny studii předcházejícími by mělo být (1) ověření a zhodnocení vhodnosti použití metody AFLP pro zjištění intra a extrapopulační variability a odvození vnitrodruhových fylogenetických vztahů v rámci rodu *Curcuma* a (2) ve spolupráci s dalšími daty morfologickými, cytologickými, a sekvenčními (cpDNA) vyslovit hypotézu o fylogenetických vztazích v rámci indických zástupců rodu *Curcuma*.

Cílem předkládané praktické části této práce je (1) ověření a zhodnocení vhodnosti použití metody AFLP pro odvození vnitrodruhových fylogenetických vztahů v rámci rodu *Curcuma* a (2) aplikace této metody na omezeném počtu vzorků a předběžná analýza získaných dat.

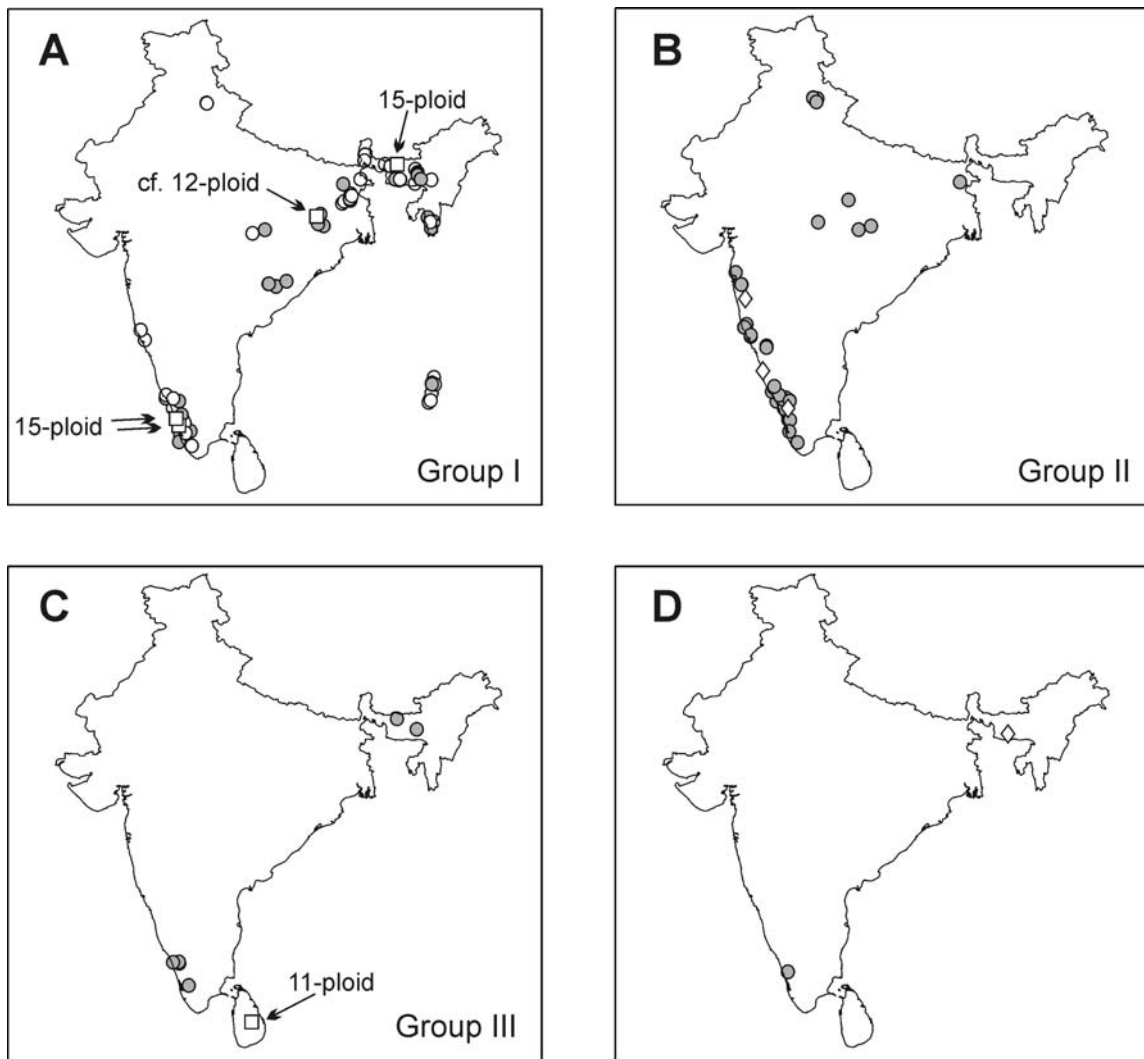
3.2. Materiál

Do analýzy DNA metodou AFLP bylo zahrnuto celkem 164 jedinců ze 34 populací náležících do 22 druhů (20 druhů rodu *Curcuma* a 2 druhy hodnocené jako separované, ale příbuzné rody: *Hitchenia caulina*, *Paracautleya bhatii*). Analyzované jedince je podle studie Leong-Škorničková et al. (2007) možné rozdělit na základě homoploidní velikosti genomu (Cx) a stupně ploidie do skupin (2x; 6x.GI; 6x.GII; 6x.GIII; 9x; 11x; 12x; 15x; a příbuzné druhy), jak shrnuje tabulka 2, přičemž polyploidní taxony 9x, 12x a 15x mají stejnou monoploidní velikost genomu jako taxony skupiny 6x.GI a polyploidní taxony 11x mají obdobnou Cx-hodnotu jako jedinci skupiny 6x.GIII.

Stupeň ploidie/genomová skupina	Počet chromosomů (2n)	2C-hodnota (pg) rozmezí	Cx-hodnota (pg) rozmezí
Curcuma			
2x	22	1.66	0.83
6x – G I	42	1.79 – 1.96	0.30 – 0.33
6x – G II	42	2.15 – 2.35	0.36 – 0.39
6x – G III	42	2.45 – 2.60	0.41 – 0.43
9x	63	2.67 – 2.91	0.30 – 0.32
11x	77	4.76	0.43
12x	> 70	3.71	(≥ 0.31)
15x	105	4.57	0.30
příbuzné druhy			
<i>Hitchenia caulina</i>			
6x	42	2.24	0.37
<i>Paracautleya bhatii</i>			
6x	42	2.18	0.36

Tabulka 2: rozdělení Indických druhů rodu *Curcuma* na základě velikosti genomu a stupně ploidie (upraveno podle Leong-Škorničková et al., 2007).

Z jedné populace bylo analyzováno 4-5 jedinců. Rostliny byly sbírány v různých oblastech indického poloostrova (především v jižní, střední a severovýchodní Indii) během let 2000-2004 (J. Škorničková). Každá populace je jednoznačně označena „sběrným číslem“. Lokality sběru a charakteristika analyzovaných vzorků jsou znázorněny na obrázku 5 a shrnuty v tabulce 3. Herbářové položky jsou uloženy v CALI (University of Calicut, Kerala, India), s duplikáty v MH a SING; nekompletní sady jsou také zachovány v CAL, K a PR; položky *C. oligantha* z ostrova Sri Lanka jsou uloženy v PDA a SING (akronymy podle Index Herbariorum).



Obrázek 5: Geografický původ analyzovaných vzorků rostlin. (A) Druhy z genomové skupiny GI ($1Cx = 0.30 - 0.33$ pg) a $x = 7$; (B) druhy z genomové skupiny GII ($1Cx = 0.36 - 0.39$ pg) a $x = 7$; (C) druhy z genomové skupiny GIII ($1Cx = 0.41 - 0.43$ pg) a $x = 7$; (D) druhy s $1Cx > 0.83$ pg a $x = 11$ (●, *Curcuma vama*;◇, *Stahlianthus involucratus*). Vysvětlivky (pokud nejsou vysvětleny jinak): ●, hexaploidi; ○, nonaploidi; ◇, příbuzné druhy umístěné do jiných rodů; □, vyšší polyploidi, stupeň označen na mapce (podle: Škorníčková et al., 2007)

Studium evoluce indických zástupců rodu *Curcuma* L.

genomová skupina/ druh	Číslo populace	(2n)	Cx (pg)	2C (pg)	počet anal. jed.	lokality sběru	druhové rozšíření	ozn. jed. v pop.
Hexaploidi-skupina GI								
<i>C. montana</i> Roxb.	71484 73425 73474	42	0,3	1,79	4 4 5	Jharkhand, Orissa Chhattisgarh,	<i>V</i> & <i>C</i>	monJ1-J5 nevyhodnoc. monCH1-CH5
<i>C. prakasha</i> S. Tripathi	71443	42	0,31	1,87	5	Meghalaya	<i>SV</i>	praM1-M5
Hexaploidi-skupina GII								
<i>C. angustifolia</i> Roxb.	73453 73480	42	0,36	2,15	5 5	Uttaranchal Chattisgarh	<i>S</i> & <i>V</i>	angU1-U5 angCh1-Ch5
<i>C. decipiens</i> Dalzell	84179	42	0,39	2,35	5	Maharashtra	<i>Z</i>	nevyhodnoc.
<i>C. inodora</i> Blatt.	73403	42	0,38	2,29	5	Maharashtra	<i>Z</i>	indM1-M5
<i>C. karnatakensis</i>	84162	42	0,39	2,34	5	Karnataka	<i>JZ</i>	nevyhodnoc.
Amalraj, Velay. & Mural.	84163 84164				5 5	Karnataka Karnataka		nevyhodnoc. nevyhodnoc.
<i>C. neilgherensis</i> Wight	84174	42	0,38	2,29	5	Tamil Nadu	<i>J</i> & <i>JZ</i>	neilg1
<i>C. pseudomontana</i> J. Graham	73402	42	0,38	2,25	5	Maharashtra	<i>Z</i>	pseuM1-M5
<i>C. reclinata</i> Roxb.	73467	42	0,38	2,29	5	Madhya Pr.	<i>C</i>	sulMP1-MP4
<i>C. reclinata</i> = <i>C. sulcata</i>	73477				5	Chattisgarh		sulCh1-Ch3
<i>C. kannanorensis</i>	84143	42	0,39	2,33	5	Kerala		cann1-4
<i>C. ecalcarata</i> = <i>C. aurantiaca</i> Zijp	84155	42	0,37	2,20	5	Kerala		ecall1-4
Hexaploidi-skupina GIII								
<i>C. mutabilis</i> Škorničk., M. Sabu & Prasanthk.	84145	42	0,42	2,49	5	Kerala	<i>JZ</i>	mutK1-K4
<i>C. sp.</i> 'aff. Prakasha'	71476	42	0,42	2,5	5	W. Bengal		spprakB1-B5
Nonaploidi								
<i>C. aeruginosa</i> Roxb.	84119 84142 71431	63	0,32	2,86	5 5 5	Kerala Kerala Assam	<i>J</i>	aerK1-K5 aerK1*-K5* AerAs1-As4
<i>C. aromatica</i> Salisb. s.l.	84183	63	0,32	2,83	5	Kerala	<i>SV</i>	aroK1-K4
<i>C. leucorrhiza</i> Roxb.	71489	63	0,3	2,7	5	Jharkhand	<i>V</i>	leuJ1-J4
<i>C. longa</i> L.	84160 73222	63	0,3	2,71	5 5	Kerala Sri Lanka	<i>J, C, V, SV</i>	lon1-4 lonSL1-SL5
<i>C. zanthorrhiza</i> Roxb.	84182	63	0,32	2,88	5	Kerala	<i>J</i> & <i>AO</i>	zanK1-K4
11-Ploidi								
<i>C. oligantha</i> Trimen	73223	77	0,43	4,76	5	Sri Lanka	<i>SL</i>	olgSL1-SL5
12-Ploidi								
<i>C. sp.</i> 'ranchi'	71485	>70	0,31	3,71	4	Jharkhand	<i>V</i>	ran1-4
15-Ploidi								
<i>C. raktakanta</i>	84120	105	0,3	4,57	3	Kerala	<i>JZ</i> & <i>SV</i>	rakK1-K2
Mangalay & M. Sabu	71432	105			5	Assam		rakAs1-As5
Příbuzné rody								
<i>Hitchenia caulina</i> (J. Graham) Baker (= <i>C. caulina</i> J. Graham)	84178	42	0,37	2,24	5	Maharashtra	<i>Z</i>	nevyhodnoc.
<i>Paracautleya bhatii</i> R. M. Sm. (= <i>C. bhatii</i> (R.M.Sm.) Škorničk. & M. Sabu)	73446	42	0,36	2,18	5	Karnataka	<i>JZ</i>	bh1-5
Diploid (x = 11)								
<i>C. vamana</i> M. Sabu & Mangaly	84156	22	0,83	1,66	5	Kerala	<i>JZ</i>	vamK1-K5

tabulka 3: (na předchozí straně) Charakteristika analyzovaných vzorků.

2n, počet chromosomů; x, základní chromosomové číslo; Cx, homoploidní velikost genomu (2C DNA/stupeň ploidie)-uváděny průměrné hodnoty; 2C, hodnoty velikosti diploidního genomu (podle Leong-Škorníčková et al., 2007); počet anal. jed. = počet analyzovaných jedinců; ozn. jed. v pop = označení jedinců v populaci; nevyhodnoc. = nevyhodnocené vzorky; C, centrální Indie; J, jižní Indie; S, severní Indie; V, východní Indie; Z, západní Indie; SL, Sri Lanka; AO, Andamanské ostrovy

3.3. Metodika

3.3.1 Extrakce DNA

Ze suchých listových pletiv byla extrahována celková DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kitu od firmy QIAGEN s drobnými modifikacemi v postupu. Pro extrakci DNA bylo použito asi 0,5g suchého materiálu (ze silikagelu). Koncentrace a čistota extrahované DNA byla proměřena na Biophotometru (Eppendorf). Naměřené hodnoty byly zaznamenány. DNA byla pro další použití zředěna na 50-100 ng/μl.

3.3.2 AFLP celkové DNA

Metoda byla prováděna podle standardního protokolu (Vos et al., 1995) za použití komerčního kitu AFLP Core Reagent Kit & AFLP Pre-Amp Primer Mix I od firmy Invitrogen. K selektivní amplifikaci byly použity 3 kombinace selektivních primerů (tab.4). Kombinace tří primerů zpravidla poskytuje 150 – 300 využitelných proužků, které lze úspěšně použít pro další analýzy (Tribsh et al., 2002) Ke konečné vizualizaci fluorescenčně označených fragmentů byl používán automatický kapilární sekvenátor ABI 3100 Avant v sekvenační laboratoři PřF UK. Jako standard byl použit GeneScan-ROX –500 (ABI).

Restrikce: Do 1,5 ml mikrozkušavek byla s použitím AFLP Core Reagent Kit (Invitrogen) připravena restrikční směs (buffer, 1,0 μl; EcoRI/MseI, 0,4 μl; H₂O, 1,1 μl) do které bylo přidáno 2,5 μl extrahované DNA (50-100 ng/μl). Vzorky byly promíchány, krátce zcentrifugovány a po dobu 2-3 hod inkubovány při 37 °C v termocykleru Mastercycler gradient S (Eppendorf).

Ligace: S použitím AFLP Core Reagent Kit (Invitrogen) byla připravena ligační směs (adaptor ligation solution, 4,8 μl; T4 ligase, 0,2 μl). 5 μl premixu bylo přidáno k vzorkům po restrikci. Vzorky byly promíchány, krátce zcentrifugovány a po dobu minimálně 2-3 hod (nejlépe přes noc) inkubovány při 37 °C v termocykleru Eppendorf.

Preamplifikace: S použitím AFLP Pre-Amp Primer Mix I (Invitrogen) byla připravena preamplifikační směs (PA mix, 4,0 μl; 10x buffer for RedTaq JumpStart (Sigma), 0,5 μl; RedTaq JumpStart Polymerase (Sigma), 0,1 μl), ke které bylo přidáno 0,5 ml DNA po restrikci a ligaci. Následovala preselektivní amplifikace v termocykleru Eppendorf s následujícím PCR profilem:

72°C/ 2:00 min.
94°C/ 2:00 min. } 20x
56°C/ 0:30 min. }
72°C/ 2:00 min.
60°C/ 30:00 min.
10 °C/hold

Po proběhnutí PCR bylo ke vzorkům přidáno 45 μl sterilní H₂O, promícháno a krátce zcentrifugováno.

Selektivní amplifikace: Byla připravena amplifikační směs (sterilní H₂O, 5,1 µl; 10x buffer for RedTaq JS (Sigma), 1,0 µl; dNTP, 0,2 µl; *Eco*RI primer (značený), 0,5 µl; *Mse*I primer, 0,5 µl; RedTaq JS Polymerase (Sigma), 0,2 µl), ke které bylo přidáno 2,3 µl DNA po preselektivní PCR. Následovala selektivní amplifikace v termocykleru Eppendorf s následujícím schématem:

94°C/ 2:00
65°C/ 0:30
72°C/ 2:00
94°C/ 0:01 }
64°C/ 0:30 } (v každém kroku -1°C) 8x
72°C/ 2:00 }
94°C/ 0:01 }
56°C/ 0:30 } 23x
72°C/ 2:00 }
60 °C/30:00
10 °C/hold

Precipitace produktu: 1 µl NaOAc (acetátu sodného) byl umístěn na stěnu 1,5 ml eppendorfky, do vzniklé kapky byl přidán 1 µl produktu od každé barvy (kombinace primerů). Kapka byla spláchnuta 25 µl 96% etanolu. Vzorek byl promíchán a ponechán 20 min při -20°C. Poté byl centrifugován 30 minut při 4 °C a 13 200 rpm. Supernatant byl slit a bylo přidáno 100 µl 70% etanolu. Následovaly 5 min centrifugace při 4 °C a 13 200 rpm, supernatant byl slit. Otevřené zkumavky byly ponechány 5 min. při laboratorní teplotě a následně vysušeny 5-10 min. při 65°C na termobloku. Před odnesením vzorků na sekvenátor bylo přidáno 10 µl směsi (10 µl deionizovaného formamidu; 0,25 µl standardu GeneScan-ROX-500), vzorky byly promíchávány na termomixeru 3 min. při 95°C a 300 rpm a poté přepipetovány na platíčko do sekvenátoru.

Vizualizace fragmentů probíhala na automatickém sekvenátoru ABI 3100 Avant v sekvenační laboratoři PŘF UK.

3.3.3 Analýza AFLP dat

Vyhodnocení AFLP fragmentů

Data ze sekvenátoru, která byla automaticky analyzována na počítači sekvenátoru (fragmentům z restrikční analýzy byly přiřazeny délky porovnáním s vnitřním standardem GeneScan-ROX-500), byla dále vyhodnocována pomocí programu Genographer.2.0 (J. Benham, 1998, <http://hordeum.oscs.montana.edu/genographer/>; Kapan a Kapan, 2006). AFLP fragmenty z vybraných, jasně definovaných lokusů byly skórovány jako přítomné/nepřítomné bez ohledu na jejich intenzitu. Pro vyhodnocení byly vybrány fragmenty v délkovém rozmezí 100-400 (-500) bp. Výsledky vyhodnocení byly převedeny do 0-1 matic a dále analyzovány.

Shlukovací metody

Pro výpočet genetických vzdáleností mezi páry jedinců byl použit Nei-Li (Nei-Li, 1979), Jaccardův (Jaccard, 1908), popřípadě Dice; Sorensenův (Dice, 1945; Sorensen, 1948) koeficient podobnosti. Fenogram byl zkonstruován na základě indexů podobnosti pomocí algoritmu neighbour-joining. Shlukovací analýza byla provedena v programu TREECON (Van de Peer a De Wachter 1994) a FAMD (Schlüter, 2006).

PCoA

Nehierarchické hodnocení dat pomocí analýzy hlavních koordinát (PCoA) bylo provedeno programem FAMD (Schlüter, 2006). Pro výpočet podobností byl použit Jaccardův koeficient.

3.4. Výsledky a diskuze

3.4.1 Vyhodnocení fragmentů

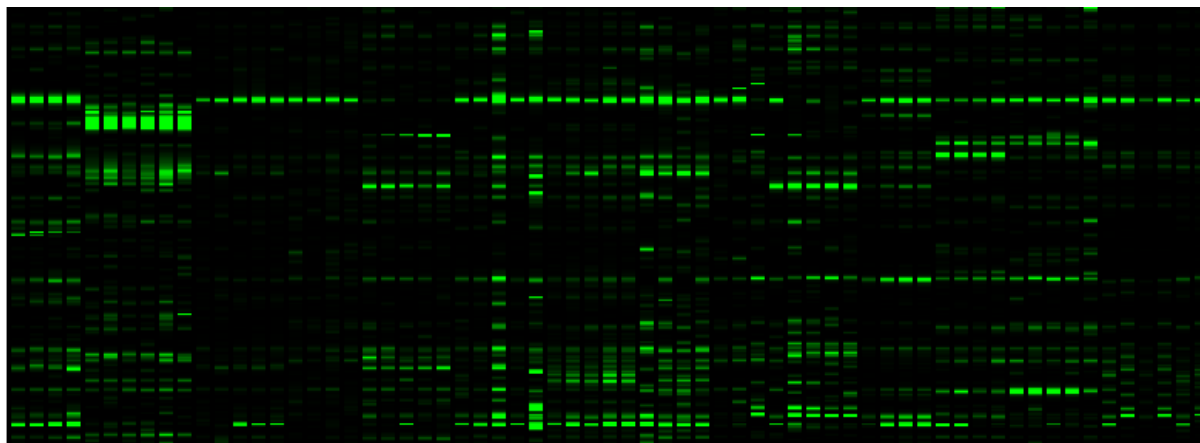
Vyhodnocení AFLP dat bylo provedeno pro celkový počet 120 jedinců z 28 populací. Tři kombinace primerů (tab.4) poskytly celkem 181 polymorfních lokusů (46 lokusů pro kombinaci primerů ACT/CTT (B16); 48 lokusů pro AGC/CTG (Y23) a 87 lokusů pro kombinaci ACA/CAT (G4).

Během vyhodnocování AFLP fragmentů byly některé vzorky odstraněny převážně z důvodu jejich nedostatečné kvality. Pro statistická vyhodnocování byla použita jen data získaná z kombinací primerů G4 a Y23, neboť data z kombinace B16 byla po vizualizaci fragmentů ohodnocena jako nekvalitní. To mohlo být způsobeno např. problémy při amplifikaci.

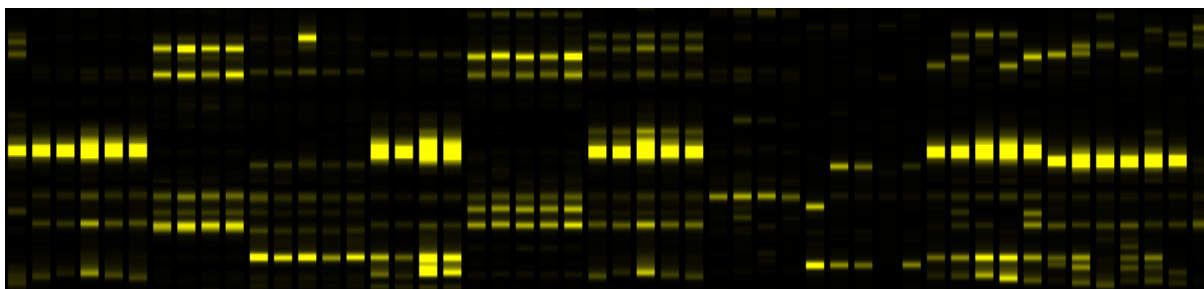
Pro shlukové analýzy a PCoA byly počítány genetické vzdálenosti ze 135 polymorfních lokusů.

Kombinace primerů	značení	<i>Eco</i> RI primer	<i>Mse</i> I primer
G4	HEX	ACA	CAT
B16	FAM	ACT	CTT
Y23	NED	AGC	CTG

tabulka 4: kombinace selektivních primerů použitých při AFLP analýze rodu *Curcuma*.



Obrázek 6: výsek z AFLP gelu z oblasti fragmentů o délkách 80-260 bp z kombinace primerů G4



Obrázek 7: výsek z AFLP gelu z oblasti fragmentů o délkách 120-200 bp z kombinace primerů Y23

3.4.2 Vyhodnocení binárních dat

Shlukovací metody

Ze tří binárních matic (data z kombinace primerů G4, Y23 a jejich kombinace G4+Y23) bylo získáno odpovídající množství matic genetických vzdáleností počítaných podle Nei-Li, Jaccardova nebo Dice; Sorensenova koeficientu podobnosti. Výsledkem shlukovacích N-J analýzy jsou tři nezakořeněné dendrogramy. Dva příkladné dendrogramy jsou vyobrazeny na obrázcích 8 a 9.

Diskuze

Všechny zkonstruované dendrogramy se v podstatě shodovaly v několika větvích na různých úrovních (označení vyhodnocených jedinců viz tab. 3):

Dobře byly vytvářeny shluky charakterizující jednotlivé populace s výjimkou populací č.84164 (*C. longa*= lon1-4) a č. 84120 (*C. raktakanta* = rakK1,K2). U rakK1, K2 byly v analýze zahrnuty pouze dva zástupci a mohlo dojít snáze ke špatnému skórování.

Dalšími dobře vytvořenými větvemi byly shluky populací stejného druhu tj. se stejným chromosomovým číslem, stupněm ploidie a velikostí genomu, které ale mohly mít rozdílné geografické rozšíření. Takové shluky utvořily např. dvě populace druhu *C. angustifolia* (6x, GII) z oblasti Chattisgarh (centrální Indie) a Utaranchal (severní Indie), dvě populace druhu *C. montana* (6x.GI) (C a CV) a dvě populace druhu *C. aeruginosa* (9x.GI) (JZ a SV Indie). To svědčí o korektní taxonomické klasifikaci těchto druhů. U druhu *C. aeruginosa* může být vysvětlením takové blízké příbuznosti populací nízká variabilita, která je dána nonaploidním charakterem tohoto druhu.

Na rozdíl od těchto druhů tvořících kompaktní shluky, u dvou populací druhu *C. aeruginosa* ze stejné oblasti (Kerala) (jedinci označení aerK1-K5, aerK11-K51) se vyskytlo výrazně odlišné pattern a tyto populace jsou od sebe podstatně vzdáleny (aerK1-K5 tvoří shluk s populací stejného druhu, ale z oblasti Assamu (aerAs1-As5) a s *C. raktakanta*(= rakAs1-As2). Toto pattern zatím nelze dobře vysvětlit. Pro vyloučení možnosti záměny vzorků bude provedeno opakování analýzy.

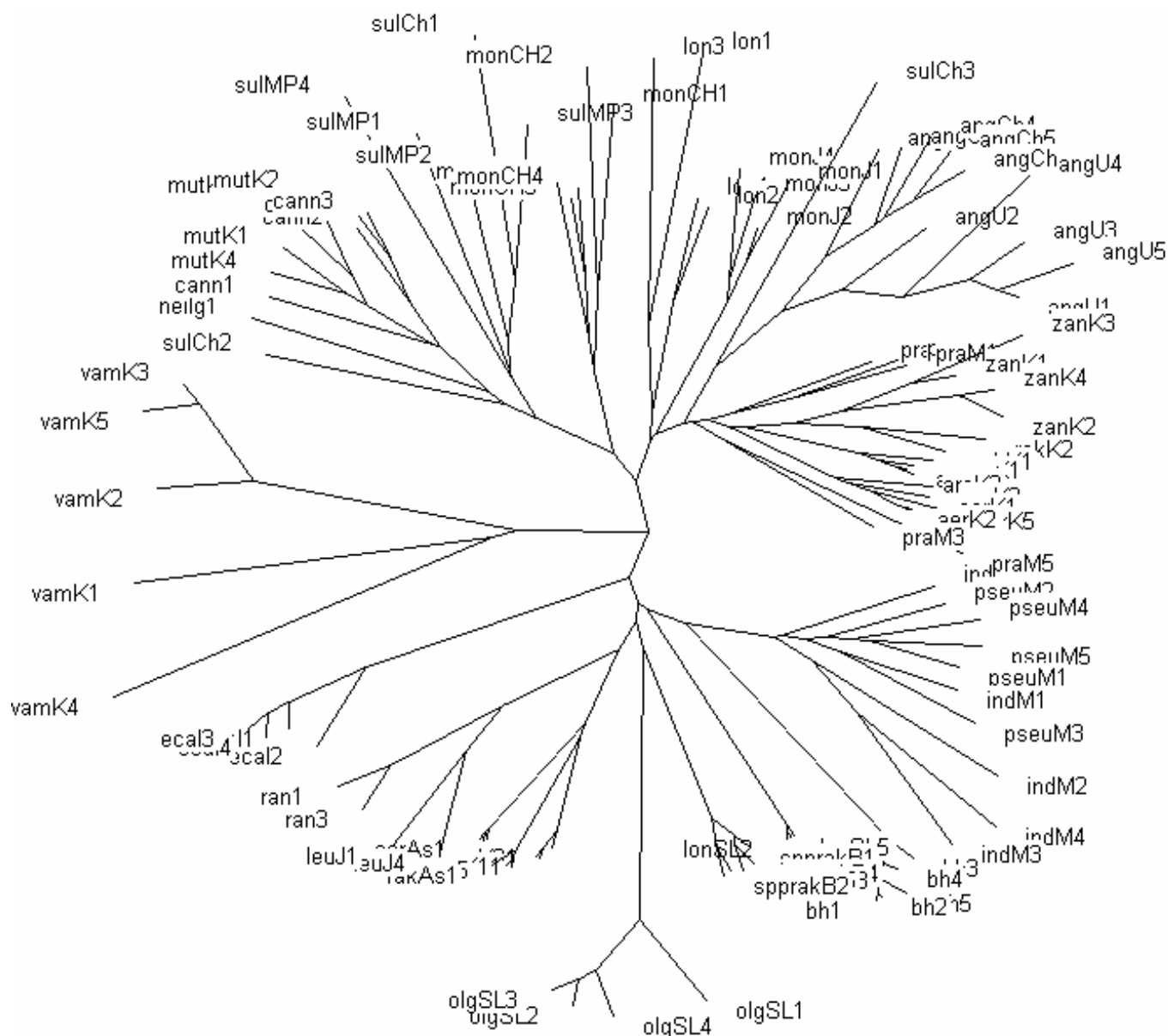
Jiné výrazné větve shlukovaly některé příslušníky stejných genomových skupin o různých stupních ploidie a s různým geografickým rozšířením.

Takový shluk (označený „**GI.a**“) byl tvořen populacemi druhů: *C. montana* (6x.GI) (monJ1-J5), *C. prakasha* (6x.GI) (praM1-M5), *C. aromatica* (9x.) (aroK1-K4), *C. aeruginosa* (9x.) (aerK1-K5) a *C. zanthorrhiza* (9x) (zanK1-K4).

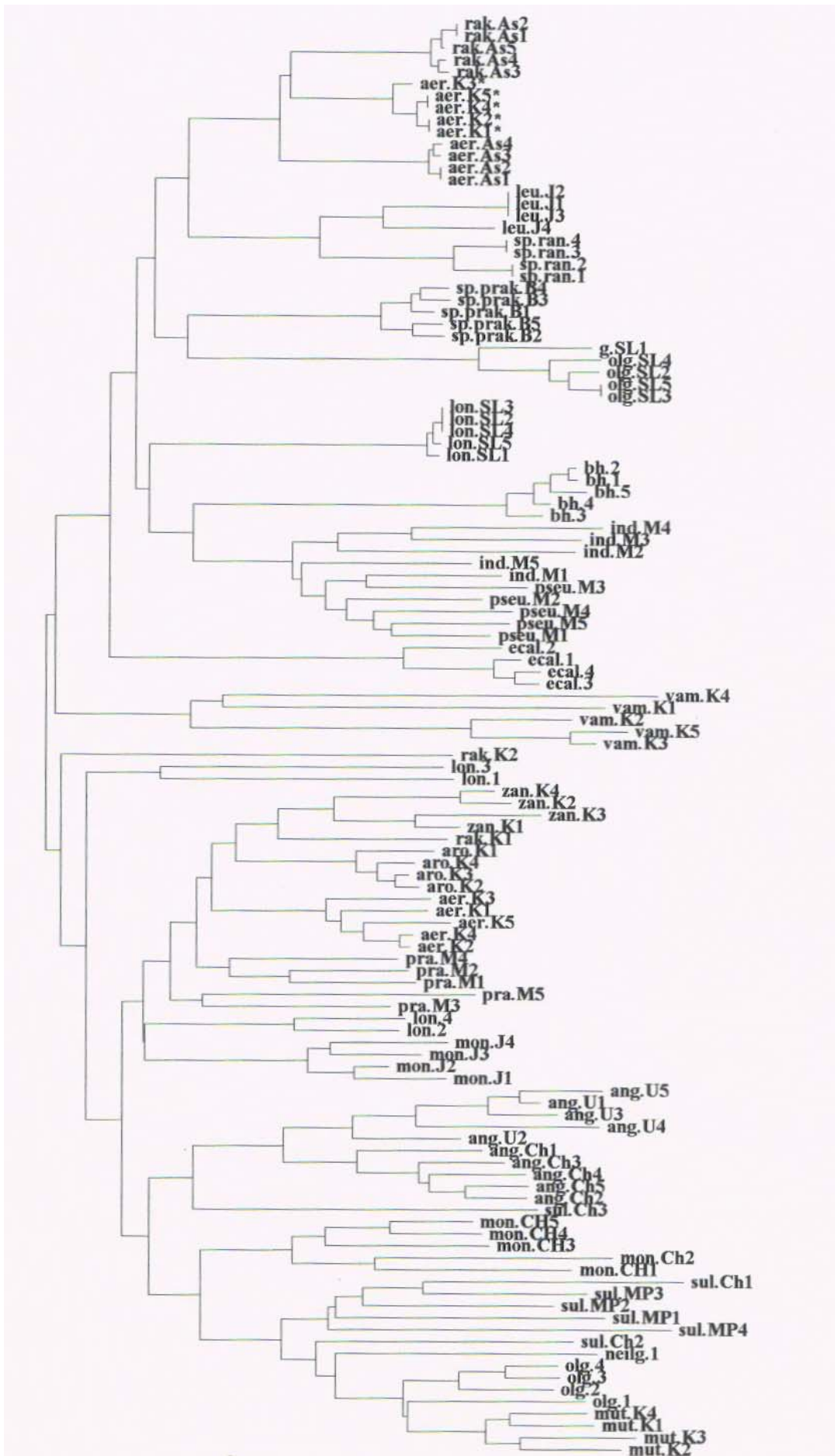
Podobný shluk „**GI.b**“ byl tvořen populacemi druhů *C. leucorrhiza* (9x) (leuJ1-J4), *C. aeruginosa* (9x) (aerK11-K51), *C. ranchi* (12x) (ran1-4) a *C. raktakanta* (15x) (rakAs1-As4).

Taková shlukování by mohla vypovídat o možném vzniku vyšších polyploidů (9x) z hexaploidních druhů *C. montana* nebo *C. prakasha* v případě „GI.a“ nebo v případě „GI.b“ o vzniku vyšších polyploidů (9x, 12x, 15x) z nějakého blízkého společného předka s nižším stupněm polyploidie, který ale nemusel být zahrnut v této analýze.

Další dobře oddělenou větev utvořily druhy sdílející stejnou velikost genomu GII: *C. inodora* (6x, GII)(indM1-M5), *C. pseudomontana* (6x, GII)(pseuM1-M5), *C. bhatii* (6x)(bh1-5), toto shlukování může být dáno i stejnou geografickou oblastí výskytu-západní pobřeží Indie (obr.5.B).



Obrázek 8: Nezakořeněný fenogram vytvořený na základě genetických vzdáleností (podle Dice; Sorensen koeficientu podobnosti) shlukovací metodou neighbour-joining



Obrázek 9: (na předchozí straně) dendrogram zkonstruovaný na základě genetických vzdáleností metodou Neighbor-joining.

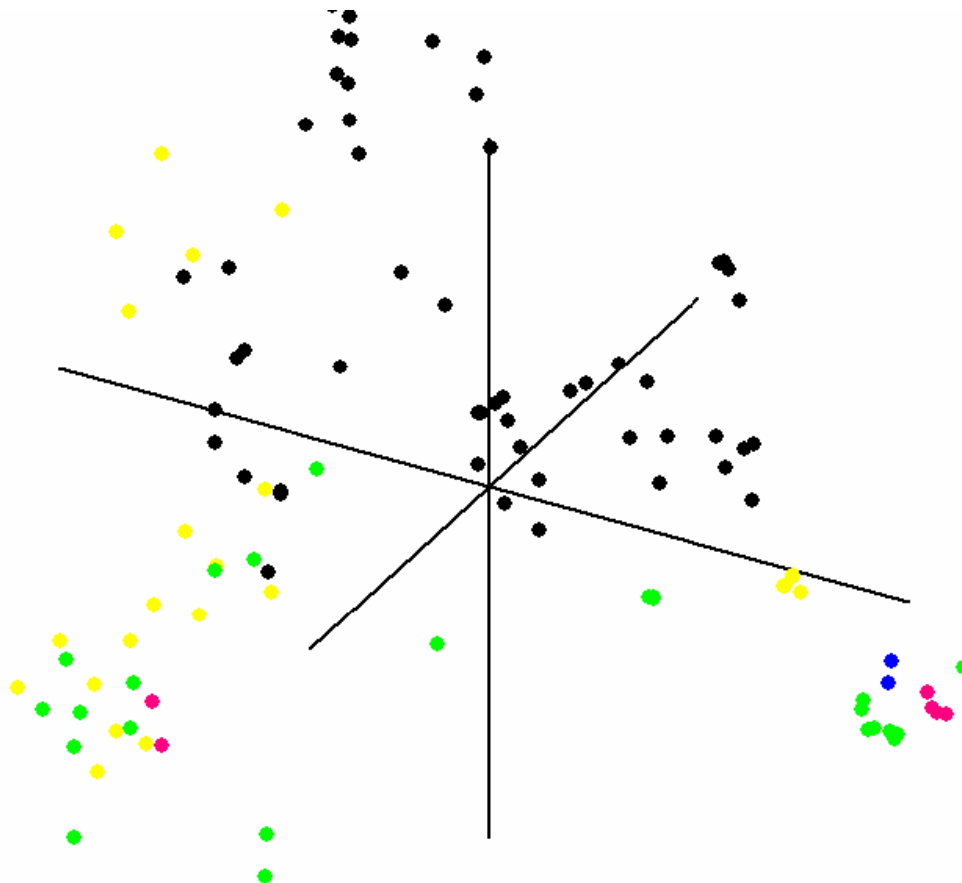
PCoA

Analýza hlavních koordinát, která byla provedena na základě genetických vzdáleností mezi páry jedinců (podle Jaccardova koeficientu), podala v mnoha znacích souhlasné výsledky jako shlukovací metody. Příkladné výsledky z PCoA analýzy jsou naznačeny na obrázcích 10 a 11.

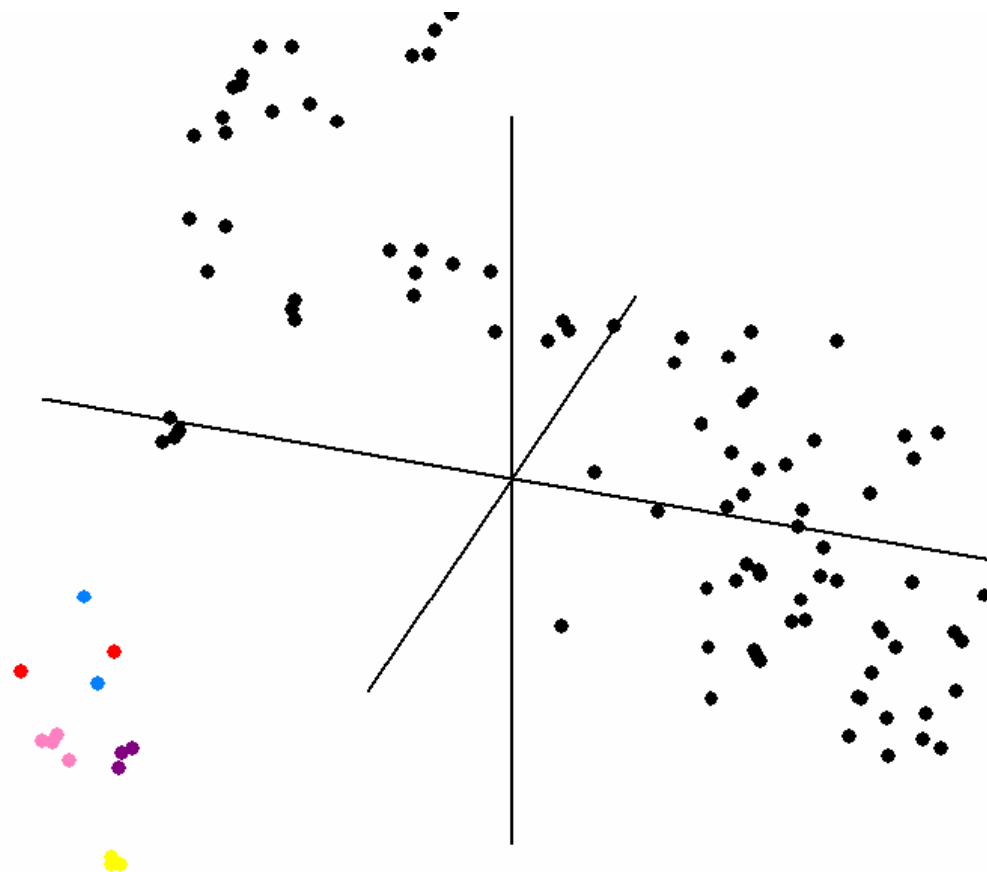
Diskuze

Obrázek 10 naznačuje vztahy mezi všemi analyzovanými populacemi druhů se stejnou monoploidní velikostí genomu $Cx = 0.30 - 0.33$, tj. skupin 6x.GI, 9x, 12x a 15x.

V porovnání s dendrogramem (obr. 9) tento výsledek vystihuje „větve“ výše označené jako „GI.a“ a „GI.b“.



Obrázek 10: PCoA: vztahy mezi polyploidními skupinami z genomové skupiny GI (žluté body, 6x.GI (*C. montana* a *C. prakasha*); zelené body, 9x. (*C. leucorrhiza*, *C. aeruginosa*, *C. zanthorrhiza*, *C. longa*); modré body, 12x. (*C. ,ranchi*); růžové body, 15x. (*C. raktakanta*), černé body značí ostatní vyhodnocené skupiny: GII, GIII, 11x a příbuzné druhy)



Obrázek 11: PCoA: podpora shluku „GI.b“ z dendrogramu (obr. 9) (barevné body: 9x: *C. aeruginosa*, *C. leucorrhiza*; 12x: *C. ranchi*; 15x: *C. raktakanta*; černé body: ostatní populace)“

Obrázek 11 zdůrazňuje podporu větve v dendrogramu označené jako „GI.b“, kde se shluk vybraných nonaploidů, 12-ploidů a 15-ploidů (barevné tečky) výrazně oddělil od ostatních populací (černé tečky).

Ostatní výsledky PCoA (obrázky neuvedeny) charakterizovali shluky podobným způsobem jako tomu bylo u dendrogramů.

Celkově lze shrnout, že jak hierarchické shlukovací analýzy, tak nehierarchické analýzy hlavních koordinát vcelku potvrdily studii Leong-Škorníčková et al. (2007), neboť shluky na vyšší úrovni než populační, které byly výše popsány, byly tvořeny populacemi se stejnou monoploidní velikostí genomu. Navíc se nově vytvořily skupiny shlukující více druhů (např. GI.a, GI.b), které mohou vypovídat o jistých vztazích mezi jednotlivými polyploidními taxony.

Omezený počet analyzovaných populací dovoluje však jen velmi omezené vhledy do vztahů uvnitř celého rodu *Curcuma* a další analýzy jsou proto nezbytné. Nezanedbatelná část analyzovaných vzorků byla také vyloučena před závěrečným vyhodnocováním a je třeba je v budoucnosti zopakovat. Důvody nedostatečné kvality vzorků, která vedla k jejich vyloučení, přisuzují nízké kvalitě extrahované DNA. Ta mohla být způsobena stářím listového materiálu, neboť byla téměř vždy postižena celá studovaná populace a některé z těchto populačních vzorků byly sbírány ke konci vegetační sezóny (*H. caulina*). Dalším důvodem mohou být blíže nevyjasněné problémy při amplifikaci fragmentů.

4. Závěr

Cílem praktické části této práce bylo ověřit a zhodnotit vhodnost použití metody AFLP pro odvození vnitrodruhových fylogenetických vztahů v rámci rodu *Curcuma* a aplikovat tuto metodu na danou množinu populací z různých částí Indie.

V závěru bych proto shrnula, že ačkoli metoda AFLP nebyla prozatím použita jako metoda pro osvětlení fylogenetických vztahů v žádném rodu v čeledi Zingiberaceae, zdá se být pro řešení vztahů uvnitř rodu *Curcuma* přinejmenším slibnou. To podpírá fakt, že provedená předběžná analýza je z velké části ve shodě s cytologickou studií (Leong-Škorníčková et al., 2007), která používala stejný rostlinný materiál (tzn. vzorky byly taxonomicky uniformní s touto studií). Kromě toho jsou pozorovatelná také nová uskupení, která mohou vnést další světlo do vztahů některých taxonů.

Cílem budoucí diplomové práce by bylo navázání na započaté analýzy metodou AFLP pro dokonalejší pohled do evoluce rodu *Curcuma* a pomocí stejné metody také zhodnotit vnitropopulační variabilitu uvnitř a mezi vybranými druhy tohoto rodu. Výsledky takové studie by mohly poskytnout zajímavé informace o genetických rozdílnostech mezi taxony s rozdílnými stupni ploidie a mezi taxony rozmnožujícími se vegetativně a semeny.

Pro dokonalejší rekonstrukci fylogenetických vztahů by bylo možné použít další vhodnou molekulární metodu jako je např. analýza mikrosatelitů, která by poskytla nezávislý zdroj informací o genetickém složení jednotlivých populací. Z dalších molekulárních markerů by mohlo být užitečné i sekvenování některých úseků jaderné DNA (ITS, nebo tzv. low-copy markerů). Výhody použití těchto markerů pro fylogenetické analýzy byly shrnuty v kapitole 2.2.4.

5. Seznam literatury

- Abbott, R.J., Lowe, A.J. 2004. Origins, establishment and evolution of two new polyploid species of *Senecio* in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*. 82: 467-474.
- Adams, K.L., Cronn, R.C., Percifield, R., Wendel, J.F. 2003. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organspecific reciprocal silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100: 4649–4654.
- Adams, K.L., Wendel, J.F. 2004. Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 573-581
- Aggarwal, R.K., Brar, D.S., Nandi, S., Huang, N., Khush, G.S. 1999. Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1320-1328.
- Ainouche, M.L., Baumel, A., Salmon, A. 2004. *Spartina anglica*: a natural model system for studying early evolutionary changes that affect allopolyploid genomes. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 475–484.
- Apavatjirut, P., Sirisawad, T., Sirirugsa, P., Voraurai, P. & Suwanthada, C. 1996. Studies on chromosome number of seventeen Thai *Curcuma* species. *Proceedings of 2nd National Conference on Flower and Ornamental Plant* 2: 86-99.
- Ardiyani, M. 2002. Systematic study of *Curcuma* L.: Turmeric and its allies. PhD thesis, University of Edinburgh. (Unpublished).
- Bachmann, K. 1992. Nuclear DNA markers in angiosperm taxonomy. *Acta Bot. Neerl.* 41:369–384.
- Baker, J.G. 1890. *Curcuma*. The Flora of British India. Vol. 6. L. Reeve & Co., London. Pp. 209—216.
- Barker, J.H.A., Matthes, M., Arnold, G.M., Edwards, K.J., Åhman, I., Larsson, S., Karp, A. 1999. Characterisation of genetic diversity in potential biomass willows (*Salix* spp.) by RAPD and AFLP analyses. *Genome* 42: 173-183.
- Benham, J. Jeung, J-U., Jasieniuk, M., Kanazin, V., Blake, T.K. 1999. Genographer: A Graphical Tool for Automated Fluorescent AFLP and Microsatellite Analysis. *Journal of Agricultural Genomics* 4:3
- Bennett, M. D. & Leitch, I. J. 2003. Plant DNA C-values database (release 2.0, Jan. 2003). – <http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>.
- Bennett, M. D., Leitch, I. J. 1997. Nuclear DNA amounts in angiosperms – 583 new estimates. *Annals of Botany* (London) 80: 169-196.
- Bennett, M.D. 2004. Perspectives on polyploidy in plants - ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 411-423
- Bharathan, G., Lambert, G., & Galbraith, D.W. 1994. Nuclear DNA content of monocotyledons and related taxa. *American Journal of Botany* 81:381-386.
- Bishop, M.J., Rawlings, C.J. 1997. DNA and protein sequence analysis. A Practical approach. IRL Press, Oxford
- Bisson, S., Guillemet, S., Hamel, J.-L. 1968. Contribution a l'étude caryo-taxonomique des Scitamineés. *Memoires du Museum National d'Historie Naturelle. Série B. Botanique* 18: 59-145.
- Blakeslee, A.F., Avery, A.G. 1937. Methods of inducing chromosome doubling in plants. *Journal of Heredity* 28: 393-411.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32:314–331.
- Breiman, A., Graur, D. 1995. Wheat evolution. *Israel Journal of Plant Sciences*, 43, 85-98.
- Bretagnolle, F., Thompson, J.D. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* 129: 1–22.
- Briggs, D., Walters, S. M. 2001. Proměnlivost a evoluce rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Brochmann, C., Nilsson, T., Gabrielsen, T.M. 1996. A classic example of postglacial allopolyploid speciation re-examined using RAPD markers and nucleotide sequences: *Saxifraga osloensis* (Saxifragaceae). *Symbolae Botanicae Upsalienses* 31: 75–89.
- Brown, T.A. 1994. DNA Sequencing. The basics. IRL Press, Oxford
- Burt, B.L. & Smith, R.M. 1972a. Key species in the taxonomic history of Zingiberaceae. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh* 31: 177-228.
- Burt, B.L. & Smith, R.M. 1972b. Tentative keys to the subfamilies, tribes & genera of Zingiberaceae. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh* 31: 171-176.
- Burt, B.L. & Smith, R.M. 1972c. (354) Proposal to conserve 1351 *Curcuma* Roxb. (1810) non Linnaeus (1753). *Taxon* 21: 709-710.
- Burt, B.L. & Smith, R.M. 1972a. Key species in the taxonomic history of Zingiberaceae. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh* 31: 177-228.

Studium evoluce indických zástupců rodu *Curcuma* L.

- Buteler, M.I., Jarret, R.L., LaBonte, D.R. 1999. Sequence characterisation of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 123-132.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C., Sutherland, G.R. 1993. Incidence and origin of "Null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* 52: 922-927.
- Cao, H. & Komatsu, K. 2003. Molecular identification of six medicinal *Curcuma* plants produced in Sichuan: evidence from plastid trnK gene sequences. *Yao Xue Xue Bao* 38: 871-875.
- Cao, H., Sasaki, Y., Fushimi, H. & Komatsu, K. 2001. Molecular analysis of medicinally used Chinese and Japanese *Curcuma* based on 18S rRNA gene and trnK gene sequences. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 24: 1389-1394.
- Cregan, P. B. 1992. Simple sequence repeat DNA length polymorphisms. *Probe* 2:18-22.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Dalzell, N.A. 1850. *Curcuma decipiens*. Contributions to the botany of Western India. Hooker's *Journal of Botany and Kew Gardens Miscellany* 2: 144.
- Darlington, C.D. 1932. Recent advances in cytology. Churchill, London
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., Li, X., Gorzyca, W., Melamed, M. R. 1999. Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications. *Experimental Cell Research* 29: 1-12.
- Das, A.B., Rai, S. & Das, P. 1999. Karyotype analysis and cytophotometric estimation of nuclear DNA content in some members of the Zingiberaceae. *Cytobios* 97:23-33.
- David, J.L., Benavente, E., Brès-Patry, C., Dusautoir, J.-C., Echaide, M. 2004. Are neopolyploids a likely route for a transgene walk in the wild? The *Aegilops ovata* · *Triticum durum* case. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 503-510.
- Demesure, B., Sodzi, N., Petit, R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, 4, 129-131.
- Despres, L., Gielly, L., Redoutet, B., Taberlet, P. 2003. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:185-196.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Dimitrova, D., Ebert, I., Greilhuber, J., Kozuharov, S. 1999. Karyotype constancy and genome size variation in Bulgarian *Crepis foetida* s.l. (Asteraceae). *Plant Systematic and Evolution* 217: 245-257.
- Doležel, J., Bartoš, J., Greilhuber, J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human (Letter to the Editor). *Cytometry* 51A: 127-128.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L., Obermayer, R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany* (London) 82 (Suppl. A): 17-26.
- Durbin, M.L., McCaig, B., Clegg, M.T. 2000. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant Molecular Biology* 42: 79-92.
- Ehrendorfer, F. 1980. Polyploidy and distribution. In: Lewis WH, ed. Polyploidy: biological relevance. New York, USA: Plenum Press, 45-60.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. 1999. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Flegr, J. 2005. Evoluční biologie. Academia, Praha
- Gibby, M. 1981. Polyploidy and its evolutionary significance. The Evolving Biosphere., P. L. Forey (ed.), pp. 87-96, Cambridge University Press
- Goldblatt, P. 1980. Polyploidy in angiosperms: *Monocotyledons*. In: Lewis WH, ed. Polyploidy: biological relevance. New York: Plenum Press, 219-239.
- Goldblatt, P. 1981. Cytology and the phylogeny of the *Leguminosae*. In: R.M.Phill and P.M.Raven [eds.], Advances in legume systematics, 427-463. Royal Botanic Garden, Kew.
- Goldstein, D.B., Schlotterer, C. 1999. Microsatellites: evolution and applications. University Press, Oxford
- Gottlieb, L.D. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 64: 161-180.
- Gottlieb, L.D. 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. *Progress in Phytochemistry* 7: 1-46.
- Gower, J.C., 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53: 325-338.
- Grant, V. 1963. The origin of adaptations. Columbia University Press, New York, USA.
- Grant, V. 1981. Plant speciation. Columbia University Press, New York, USA
- Grant, V. 1982. Periodicities in Chromosome numbers of the angiosperms. *Botanical Gazette* 143: 379-389.

Studium evoluce indických zástupců rodu *Curcuma* L.

- Grodzicker, T., J. Williams, P. Sharp, and J. Sambrook. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposium* 39: 439–446.
- Guo, Y.P., Saukel, J., Mittermayr, R., Ehrendorfer, F. 2005. AFLP analyses demonstrate genetic divergence, hybridization, and multiple polyploidization in the evolution of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae). *New Phytologist* 166 (1), 273–290
- Gupta, S.P. 1981. Folklore about plants with reference to Munda culture. In: Jain, S.K. (ed). *Glimpses of Indian ethnobotany*. Oxford & IBH Publishing Co. Pp. 199–207.
- Harlan, J.R., deWet, J.M.J. 1975. On Ö. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *Botanical Review* 41: 361–390.
- Harris, D.J., Poulsen, A.D., Frimodt-Møller, C., Preston, J. & Cronk, Q.C.B. 2000. Rapid radiation in *Aframomum* (Zingiberaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Edinb. J. Bot.* 57: 377–395.
- Haufler, C. H., Zhongren, W. 1991. Chromosomal analyses and the origin of allopolyploid *Polypodium virginianum* (Polypodiaceae). *American Journal of Botany* 78: 624–630
- Holtum, R.E. 1950. The Zingiberaceae of Malay Peninsula. *Gardens'. Bulletin Singapore* 13: 1–250.
- Horaninow, P. 1862. Prodrromus Monographiae Scitaminearum. Typis Academiae Caesareae Scientiarum. Petropoli. Pp. 1—45.
- Chakravorti, A.K. 1948. Multiplication of chromosome numbers in relation to speciation in Zingiberaceae. *Science and Culture* 14: 137–140.
- Chatterjee, A., Ghosh, S. & Roy, S.C. 1989. A cytological survey of Eastern Himalayan plants III. *Cell and Chromosome Research* 12: 22–29.
- Chen, Y., Bai, S., Cheng, K., Zhang, S. & Nian, L. 1999. Random amplified polymorphic DNA analysis on *Curcuma wenyujin* and *C. sichuanensis*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 24: 131–133.
- Chen, Z.J., Wang, J., Tian, L., Lee, H-S., Wang, J., Chen, M., Lee, J.J., Josefsson, C., Madlung, A., Watson, B., Lippman, Z., Vaughn, M., Pires, J.C., Colot, V., Doege, R.W., Martienssen, R.A., Comai, L., Osborn, T.C. 2004. The development of *Arabidopsis* model system for genome-wide analysis of polyploidy effects. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 689–700
- Chen, Z.Y. & Chen, S.J. 1984. A report on chromosome numbers of Chinese Zingiberaceae. *Guihaia* 4: 13–18.
- Islam, M.A, Meister, A., Schubert, V., Kloppstech, K., Esch, E. 2007. Genetic diversity and cytogenetic analyses in *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe from Bangladesh. *Genetic Research and Crop Evolution* 54: 149–156.
- Islam, M.A, Kloppstech, K., Esch, E. 2005. Population genetic diversity of *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe – a conservation prioritised medicinal plant in Bangladesh. *Conservation Genetics* 6: 1027–1033.
- Islam, M.A. 2004. Genetic diversity of the genus *Curcuma* in Bangladesh and further biotechnological approaches for in vitro regeneration and long-term conservation of *C. longa* germplasm. PhD thesis, University of Hannover. (Unpublished).
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudense des Sciences Naturelles* 44: 223–270.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Evolution and Ecology* 11: 424–429.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., van deWiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, D., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevshi, A., Marmiroli, N., Aert, R., Volchaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., Karp, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381–390.
- Jones, K. 1958. Cytotaxonomic studies in *Holcus*. I. The chromosome complex in *Holcus mollis* L. *New Phytologist* 57: 191–210
- Joseph, R., Joseph, T. & Jose, J. 1999. Karyomorphological studies in the genus *Curcuma* Linn. *Cytologia* 64: 313–317.
- Kardolus, J.P., van Eck, H.J., van den Berg, R.G. 1998. The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 210: 87–103.
- Karp, A., Seberg, O., Buiatti, M. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany (London)* 78:143–149.
- Kashkush, K., Feldman, M., Levy, A.A. 2002. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics* 160: 1651–1659.
- Kihara, M. and Ono, T. 1926. Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-arten. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 4: 475–481
- Koopman, W. J. M. 2005. Phylogenetic Signal in AFLP Data Sets. *Systematic Biology* 54:2, 197 – 217
- Krahulcová, A. 1998. Karyologie cévnatých rostlin při aplikaci metod klasického barvení chromozómů, Příručka praktických cvičení pro posluchače katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Průhonice

- Krauss, S.L., Peakall, R. 1998. An evaluation of the AFLP fingerprinting technique for the analysis of paternity in natural populations of *Persoonia mollis* (Proteaceae). *Australian Journal of Botany* 46: 533-546.
- Kress, J.W. 1990. The phylogeny and classification of the Zingiberales. *Annals of the Missouri Botanic Garden* 77: 698-721.
- Kress, W.J., Liu, A.Z., Newman, M. & Li, Q.J. 2005. The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A complex and polyphyletic genus of ginger. *American Journal of Botany* 92: 167-178.
- Kress, W.J., Prince, L.M. & Williams, K.J. 2002. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. *American Journal of Botany* 89: 1682-1696.
- Kubota, S., Kameyama, Y., Ohara, M. 2006. A reconsideration of relationships among Japanese *Trillium* species based on karyology and AFLP data. *Plant Systematic and Evolution* 261: 129-137.
- Larsen, K. 1972. Studies in the genus *Globba* in Thailand. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh* 31: 229-241.
- Larsen, K., Lock, J.M., Maas, H. & Maas, P.J.M. 1998. Zingiberaceae. In: Kubitzki, K. (Ed.), The families and genera of vascular plants, vol. IV. Pp. 474-495. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Lee, H-S., Chen, Z.J. 2001. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 6753-6758.
- Leitch, I.J., Bennett, M.D. 1997. Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* 2: 470-476.
- Leitch, I.J., Bennett, M.D. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 651-663
- Leong-Škorničková, J., Šída, O., Jarolímová, V., Sabu, M., Fér, T., Trávníček, P., Suda, J. 2007. Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* L. (Zingiberaceae). *Annals of Botany* (in press).
- Levin, D. A. 1975. Minority cytotype exclusion in local plant populations. *Taxon* 24, 35-43
- Levin, D.A. 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *American Naturalist* 122: 1-25.
- Levy, A.A., Feldman, M. 2002. The impact of polyploidy on grass genome evolution. *Plant Physiology* 130: 1587-1593.
- Lewis, K.R., John, B. 1963. Chromosome marker. London: JA Churchill Ltd.
- Lewis, P.O., Snow, A.A. 1992. Deterministic paternity exclusion using RAPD markers. *Molecular Ecology* 1: 155-160.
- Lewis, W.H. 1980. Polyploidy in angiosperms: dicotyledons. In: Lewis WH ed. Polyploidy: biological relevance. New York, USA: Plenum Press, 241-267.
- Li, Ch.D., Rosnagel, B.G., Scoles, G.J., 2000. Tracing the Phylogeny of the Hexaploid Oat *Avena sativa* with Satellite DNAs. *Crop Science* 40: 1755-1763
- Lim, S.N. 1972a. Cytogenetics and taxonomy of the genus *Globba* L. (Zingiberaceae) in Malaya. II. Cytogenetics. *Notes from the Royal Botanic Gardens Edinburgh* 31: 271-284.
- Lim, S.N. 1972b. Cytogenetics and taxonomy of the genus *Globba* L. (Zingiberaceae) in Malaya. IV Distribution in relation to polyploidy. *Gardens' Bulletin Singapore* 26: 115-126.
- Liu, B., Wendel, J.F. 2003. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids genome evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 365-379.
- Lowe, A. Harris, S. H., Ashton, P. A. 2004. Ecological Genetics: Design, Analysis and Application. Blackwell Publishing, Oxford
- Lynch, M., Conery, J.S. 2000. The evolutionary fate of duplicated genes. *Science* 290: 1151-1154.
- Lynch, M., Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Lysák, M. A., Doleželová, M., Horry, J. P., Swennen, R., Doležel, J. 1999. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1344-1350.
- Mace, E.S., Gebhardt, C.G., Lester, R.N. 1999. AFLP analysis of genetic relationships in the tribe Datureae (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 99: 634-641.
- Mahanty, H.K. 1970. A karyological study of the Zingiberaceae with special reference to their taxonomy. *Cytologia* 35: 13-49.
- Mangaly & Sabu, 1993. A taxonomic revision of the South Indian species of *Curcuma* Linn. (Zingiberaceae) *Rheedea* 3:139-171.
- Manly, B.F.J. 1997. Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology. Chapman and Hall, London.
- Manton, I. 1950. Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta. Cambridge University Press, London & New York
- Matzke, M.A., Matzke, A.J.M. 1998. Polyploidy and transposons. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 241.
- McGregor, C. E., Lambert, C.A., Greyling, M.M., Louw, J.H., Warnich, L. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113:135-144.

Studium evoluce indických zástupců rodu *Curcuma* L.

- Meudt, H.M., Clarke, A.C. 2007. Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12: 106–117
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W., Waugh, R. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding* 3:127–136.
- Mood, J. & Larsen, K. 2001. New Curcumas from South East Asia. *The New Plantsman* 8: 207-217.
- Muir, G., Schlötterer, Ch., 1999. Limitations to the phylogenetic use of ITS sequences in closely related species and populations - a case study in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., Which DNA Marker for Which Purpose? (<http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>)
- Mukherjee, I. 1970. Chromosome studies of some species of *Hedychium*. *Botanical Magazine (Tokyo)* 83: 237-241.
- Nakajima, Y., Oeda, K., Yamamoto, T. 1998. Characterisation of genetic diversity of nuclear and mitochondrial genomes in *Daucus* varieties by RAPD and AFLP. *Plant Cell Reports* 17: 848-853.
- Nambiar, M.C., Pillai, P.K.T. & Sharma, Y.N. 1982. Seedling propagation in turmeric (*Curcuma aromatica* Salisb.). *Journal of Plantation Crops* 10: 81-85.
- Nayak, S., Naik, P.K., Acharya, L.K. & Pattnaik, A.K. 2006. Detection and evaluation of genetic variation in 17 promising cultivars of turmeric (*Curcuma longa* L.) using 4C nuclear DNA content and RAPD markers. *Cytologia* 71: 49-55.
- Nei, M., Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 76: 5269-5273.
- Newman, M.F. 1988. Aspects of cytotaxonomy and reproductive biology of some Zingiberaceae. PhD Thesis, University of Aberdeen.
- Ngamriabsakul, C., Newman, M.F. & Cronk, Q.C.B. 2000. Phylogeny and disjunction in *Roscoea* (Zingiberaceae). *Edinburgh Journal of Botany* 57: 39-61.
- Ngamriabsakul, C., Newman, M.F. & Cronk, Q.C.B. 2004. The phylogeny of tribe Zingibereae (Zingiberaceae) based on ITS (nrDNA) and trnL-F (cpDNA) sequences. *Edinburgh Journal of Botany* 57: 39-61.
- Ohno, S. 1970. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag, New York, USA.
- Ohri, D. 1998. Genome size variation and plant systematics. *Annals of Botany* (London) 82 (Suppl. A): 75-83
- Osborn, T.C., Pires, J.C., Birchler, J.A., Auger, D.L., Chen, Z.J., Lee, H-S, Comai, L., Madlung, A., Doerge, R.W., Colot, V., Martienssen, R.A. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* 19: 141–147.
- Otto, S.P., Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34: 401–437.
- Ownbey, M. 1950. Natural hybridization and amphiploidy in the genus *Tragopogon*. *American Journal of Botany* 37: 487–499.
- Ozkan, H., Levy, A.A., Feldman, M. 2001. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Plant Cell* 13: 1735–1747.
- Paisooksantivatana, Y., Kako, S. & Seko, H. 2001. Genetic diversity of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. (Zingiberaceae) in Thailand as revealed by allozyme polymorphism. *Genetic Research and Crop Evolution* 48:459-465.
- Panchaksharappa, M.G. 1962a. Taxonomic evaluation of Zingiberaceae. *Bulletin of the Botanical Survey of India* 4: 129-135.
- Panchaksharappa, M.G. 1962b. Embryological studies in the family Zingiberaceae 1. *Costus speciosus* Smith J. *Phytomorphology* 12: 418-430.
- Pazy, B., Zohary, D. 1965. The process of introgression between *Aegilops* polyploids: natural hybridization between *A. variabilis*, *A. ovata* and *A. biuncialis*. *Evolution* 19: 385-94.
- Pedersen, L.B. 2004. Phylogenetic analysis of the subfamily *Alpinioideae* (Zingiberaceae), particularly *Etilingera* Giseke, based on nuclear and plastid DNA. *Plant Systematic and Evolution* 245: 239-258.
- Popp, M., Oxelman, B. 2001. Inferring the history of the polyploid *Silene aegaea* (Caryophyllaceae) using plastid and homoeologous nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20: 474–481.
- Poulsen A. D. 1993. Two new species of *Boesenbergia* (Zingiberaceae) from Borneo. *Nordic Journal of Botany* 13: 289–294.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225–238
- Prana, M. S. 1977. Studies on some Indonesian *Curcuma* species. PhD. Thesis, University of Birmingham. (Unpublished).
- Prana, M.S. , Sastrapradja, S., Hawkes, J.G. & Lubis, I. 1978. A cytological study of some Indonesian *Curcuma* species. *Journal of Root Crops* 4: 31-35.

Studium evoluce indických zástupců rodu *Curcuma* L.

- Provan, J., Powell, W., Hollingsworth, P.M. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and systematics. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 142-147.
- Provan, J., Russell, J.R., Booth, A., Powell, W. 1999. Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for population and systematic studies in the genus *Hordeum*. *Molecular Ecology* 8: 505-511.
- Quarin, C. L., Hanna, W. W. 1980. Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum* [J]. *Crop Science* 20:69-75
- Rafalski, J.A., Vogel, J.M., Morgante, M., Powell, W., Andre, C., Tingey, S.V. 1996. Generating and using DNA markers in plants. In: Birren B, Lai E (eds.). *Non-Mammalian Genomic Analysis: A Practical Guide*. Academic Press, London. pp. 75-134.
- Raghavan, T.S. & Venkatasubban, K.R. 1943. Cytological studies in the family Zingiberaceae with special reference to chromosome number and cyto-taxonomy. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Series B*. 17:118-132.
- Ramachandran, K. 1961. Chromosome numbers in the genus *Curcuma* Linn. *Current Science* 30: 194-196.
- Ramachandran, K. 1969. Chromosome numbers in Zingiberaceae. *Cytologia* 34: 213-221.
- Ramsey, J., Schemske, D.W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 467-501.
- Rangsiruji, A., Newman, M.F. & Cronk, Q.C.B. 2000a. Origin and relationship of *Alpinia galanga* (Zingiberaceae) based on molecular data. *Edinburgh Journal of Botany* 57: 9-37.
- Rangsiruji, A., Newman, M.F. & Cronk, Q.C.B. 2000b. A study of the infrageneric classification of *Alpinia* (Zingiberaceae) based on the ITS region of nuclear rDNA and the trnL-F spacer of chloroplast DNA. In: Wilson, K.L. & Morrison, D.A. (Eds.). *Monocots: Systematics and Evolution*. Pp. 695-709.
- Reese, G. 1958. Polyploidie und verbreitung. *Zeitschrift für Botanik* 46: 339-354
- Refoufi A., Jahier J. & Esnault M.A. 2001. Genome analysis of a natural hybrid with $2n=63$ chromosomes in the genus *Elytrigia* Desv. (Poaceae) using the GISH technique. *Plant Biology* 3: 386-390.
- Riley, R. 1965. Cytogenetics and evolution of Wheat. In *Essays on crop plant evolution*, ed. J. Hutchinson, 103-22. Cambridge University Press, London.
- Robinson, J.P., Harris, S.A. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective. In: Gillet E.M.[ed.]: *Which DNA Marker for Which Purpose?* (<http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>)
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Roscoe, W. 1824-1828. *Monandrian Plants of the order Scitamineae*. George Smith. Liverpool.
- Roxburgh, W. 1810. Descriptions of several of the monandrous plants of India. *Asiatick Researches* 11: 318-362.
- Russell, J.R., Weber, J.C., Booth, A., Powell, W., Sotelo-Montes, C., Dawson, I.K. 1999. Genetic variation of Calycophyllum spruceanum in the Peruvian Amazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Molecular Ecology* 8: 199-204.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sato, D. 1960. The Karyotype analysis in Zingiberales with special reference to the protokaryotype and stable karyotype. *Science Papers from College of General Education University Tokyo*. 10: 225-243.
- Searle, R.J. & Hedderson, A.J. 2000. A preliminary phylogeny of the Hedychieae tribe (Zingiberaceae) based on ITS sequences of the nuclear r RNA cistron. In: Wilson, K.L. & Morrison, D.A. (Eds.). *Monocots: Systematics and Evolution*. Pp. 710-718.
- Sharma, A.K. & Bhattacharya, N.K. 1959. Cytology of several members of Zingiberaceae. *La Cellule* 59: 297-346.
- Sharma, A.K. 1970. Annual report, 1967-1968. *Research Bulletin of the Univeristy of Calcutta* 2: 1-50.
- Shivas, M. G. 1961. Contributions to the cytology and taxonomy of species of *Polypodium* in Europe and America. 1. Cytology; (2. Taxonomy). *Journal of the Linnean Society* 58: 13-25; 27-38.
- Shore, J.S., Barrett, S.C.H. 1985. The genetics of distyly and homostyly in *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). *Heredity* 55: 167-74.
- Shore, J.S., Barrett, S.C.H. 1987. Inheritance of floral and isozyme polymorphisms in *Turnera ulmifolia* L. *Journal of Heredity* 78: 44-48.
- Schlüter, P.M., Harris, S.H. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 6: 569-572.
- Schumann, K. 1904. Zingiberaceae. In: Engler, A. (Ed.) *Das Pflanzenreich IV*, vol. 46. Pp. 1-458. Leipzig. Germany.
- Simmonds, N. W. 1976. *Evolution of crop plant*. Longmans, London.
- Siriruga, P. & Newman, M. 2000. A new species of *Curcuma* L. (Zingiberaceae) from S.E.Asia. *The New Plantsman* 6: 196-197.

- Sirirugsa, P. 1996. The genus *Curcuma* of Thailand. *Proceedings of the 2nd Symposium on the Family Zingiberaceae*. Guangzhou, China. 39-46.
- Sirisawad, T., Sirirugsa, P., Suwanthada, C. & Apavatjirut, P. 2003. Investigation of chromosome numbers in 20 taxa of *Curcuma*. *Proceedings of the 3rd Symposium on the Family Zingiberaceae*. Khon Kaen, Thailand. Pp. 54-62.
- Sirisawad, T., Sirirugsa, P., Suwanthada, C. & Apavatjirut, P. 2003. Investigation of chromosome numbers in 20 taxa of *Curcuma*. *Proceedings of the 3rd Symposium on the Family Zingiberaceae*. Khon Kaen, Thailand. Pp. 54-62.
- Smartt, J., Simmonds, N. W. 1995. Evolution of crop plants, 2nd edn. Longmans, Harlow.
- Smith, R.M. 1981. Synoptic Keys to the genera of Zingiberaceae pro parte. Royal Botanic Garden Edinburgh. Pp. 1-28.
- Smith, R. M. 1990. *Alpinia* (Zingiberaceae): a proposed new infrageneric classification. *Edinburgh Journal of Botany* 47: 1-75.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Soltis, D.E. 1984. Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae). *American Journal of Botany* 71: 1171-1174.
- Soltis, D. E., Soltis, P.S., Pires, J.C., Kovarik A., Tate, J. A. and Mavrodiev, E. 2004. Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae): Genetic, genomic, and cytogenetic comparisons. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 485-501.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12: 243-273.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. 1999. Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 348-352.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. and Tate, J.A. 2003. Research Review-Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist* 161:173-191.
- Sorensen, T. 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *K. Dan. Vidensk. Selsk. Biol. Skr.* 5: 1-34.
- Stebbins, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley, London, UK
- Stebbins, G.L. 1972. The evolution of the grass family. In: V.B. Youngner & C.B. Mc Kell [eds.], *The biology nad utilization of grasses*, 1-17. Academic Press, New York.
- Stebbins, G.L. 1985. Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 72: 824-832.
- Stephens, S.G. 1951. Possible significance of duplication in evolution. *Advances in Genetics* 4: 247-265.
- Suda, J. 2004. An employment of flow cytometry into plant biosystematics. PhD. Thesis. Charles University, Prague.
- Swift, H. 1950. The constancy of desoxyribose nuclei acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 36: 643-654.
- Škorničková, J. 2007. Taxonomic Studies in Indian *Curcuma* L. PhD. Thesis. Charles University, Prague.
- Škorničková, J. & Sabu, M. 2005a. The recirumscription of *Curcuma* L. to include the genus *Paracautleya* R.M.Sm. *Gardens' Bulletin Singapore* 57:37-46.
- Škorničková, J. & Sabu, M. 2005b. *Curcuma roscoeana* Wall (Zingiberaceae) in India. *Gardens' Bulletin Singapore* 57:187-198.
- Škorničková, J. & Sabu, M. 2005c. The identity and distribution of *Curcuma zanthorrhiza* Roxb. (Zingiberaceae) *Gardens' Bulletin Singapore* 57:199-210.
- Škorničková, J. , Rehse, T. & Sabu, M. 2007. Other economically important *Curcuma* species. In: Ravindran, P.N. (ed.) *Turmeric: the genus Curcuma*. CRC Press, Florida Pp. 451-467 Škorničková, J., Sabu, M. & M.G.Prasanthkumar. 2003a. A new species of *Curcuma* L. (Zingiberaceae) from Mizoram. *Gardens' Bulletin Singapore* 55:89-95.
- Škorničková, J., Sabu, M. & M.G.Prasanthkumar. 2003b. *Curcuma codonantha* (Zingiberaceae) – A new species form the Andaman Islands, India. *Gard. Bull. Singapore* 55:219-228.
- Škorničková, J., Sabu, M. & M.G.Prasanthkumar. 2004. *Curcuma mutabilis* (Zingiberaceae): a new species from South India. *Gardens' Bulletin Singapore* 56: 43-54.
- Takano A. & Okada H. 2002. Multiple occurrence of triploid formation in *Globba* (Zingiberaceae) from molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* 230: 143-159.
- Takano, A. 2001. Cytological analyses of 19 taxa in *Globba* (Zingiberaceae). *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 52: 65-74.
- Thompson, J.D., Lumaret, R. 1992. The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends in Ecology and Evolution* 7: 302-307.
- Thorne, R.F. 1976. A phylogenetic classification of the Angiospermae. *Evolutionary Biology* 9: 35-106.

- Tomlinson, P.B. 1962. Phylogeny of the Scitamineae-morphological and anatomical considerations. *Evolution* 16: 192-213.
- Tribsch, A., Schönswetter, P., Stuessy, T. F. 2002. *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the Ice Age in the Eurépean Alps. *American Journal of Botany* 89:2024-2033.
- Valeton, T. 1918. New notes on the Zingiberaceae of Java and Malaya. *Bulletin du Jardin Botanique de Buitenzorg* 27: 1—167.
- Van de Peer, Y., De Wachter, R. 1997. Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Computer Applications in the Biosciences* 13: 227-230.
- Velayudhan, K.C., Amalraj, V.A. & Muralidharan, V.K. 1996. The conspectus of the genus *Curcuma* in India. *Journal of Economic and Taxonomic Botany* 20: 375-382.
- Velayudhan, K.C., Mralidharan, V.K., Amalraj, V.A., Gautam, P.L., Mandal, S. & Kumar, D. 1999. *Curcuma* genetic resources. NBPGR regional Station Trichur, India. Pp. 1-149.
- Vilhar, B., Greilhuber, J., Koce, J. D., Temsch, E. M., Dermastia, M. 2001. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Annals of Botany (London)* 87: 719-728.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Waugh, R. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs, and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics* 95:714–722.
- Welsh, J., McClelland, A. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18:7213–7218.
- Wendel, J.F. 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42: 225–249.
- deWet, J.M.J. 1980. Origins of polyploids. In: Lewis WH, ed. Polyploidy: biological relevance. New York, USA: Plenum Press, 3–15.
- Wight, R. 1838-1853. *Icones planatarum Indiae orientalis*. J.B. Pharoah. Madras, India.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531–6535.
- Williams, K., Kress, J.W. & Manos, P.S. 2004. The phylogeny, evolution and classification of the genus *Globba* and tribe globbeae (Zingiberaceae): appendages do matter. *American Journal of Botany* 91:100-114.
- Wolffe, A.P., Matzke, M.A. 1999. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286: 481–486.
- Wood, T., Whitten, W.M. & N.H. Williams. 2000. Phylogeny of *Hedychium* and related genera (Zingiberaceae) based on ITS sequenced data. *Edinburg Journal of Botany* 57: 261-270.
- Xia, Y.M., Kress, W.J. & Prince, L.M. 2004. Phylogenetic analyses of *Amomum* (Alpinioideae: Zingiberaceae) using ITS and matK DNA Sequence Data. *Systematic Botany* 29: 334-344.
- Zohary, D., Feldman, M. 1962. Hybridisation between amphidiploids and evolution of polyploids in the Wheat (*Aegilops triticum*) group. *Evolution* 16: 44-61.
- Zohary, D., Hopf, M. 1993. Domestication of plant in the old world: the origin and spread of cultivated plant in West Asia, Europe and Nile Valley, 2nd edn. Clarendon, Oxford