

Rostliny zpod vrcholků rovníkových And 2. *Lasiocephalus* – evoluce a kolonizování párama

V předchozím dílu našeho seriálu jste se mohli seznámit s některými obecnými zákonitostmi vzniku druhově bohaté vysokohorské květeny rovníkových And. V této části obrátíme pozornost na jeden konkrétní rod – *Lasiocephalus*, na němž budeme ilustrovat složitost evolučních procesů, které tuto rozmanitost vytvářejí. Umožníme nahlédnout do rekonstrukčních postupů založených na moderních molekulárních metodách, jež se používají pro objasnění dějů probíhajících ve vzdálené minulosti.

Jihoamerický rod huňatohlávka (*Lasiocephalus*) z čeledi hvězdicovitých (*Asteraceae*; *lasius* – huňatý, *-cephalus* – hlavý = mající úbor) představuje pozoruhodnou skupinu rostlin obývajících střední až vysoké horské polohy rovníkových a subtropických And. Tento rod, patřící do příbuzenstva starčeků (tribus *Senecioneae*), zahrnuje asi 25 druhů rozšířených od Venezuely přes Kolumbii, Ekvádor a Peru až do Bolívie. Největší druhové bohatosti dosahuje v Ekvádoru, na jehož území se vyskytuje také řada endemických druhů. Rod je zajímavý především rozmanitostí růstových forem, jejich poměrně úzkou vazbou na typ obývaného prostředí a také svým geografickým rozšířením. Zatímco v oblasti horského lesa a křovinatého subpárama se uplatňují širokolisté liány, v ještě vyšších nadmořských polohách, v páramu, je nahrazují drobnější, vystoupavé nebo vzpřímené úzkolisté polokeře. Liány reprezentované např. druhy *L. patens*, *L. involucratum* nebo *L. cuencanus* na svých původních stanovištích vyrůstají do korun

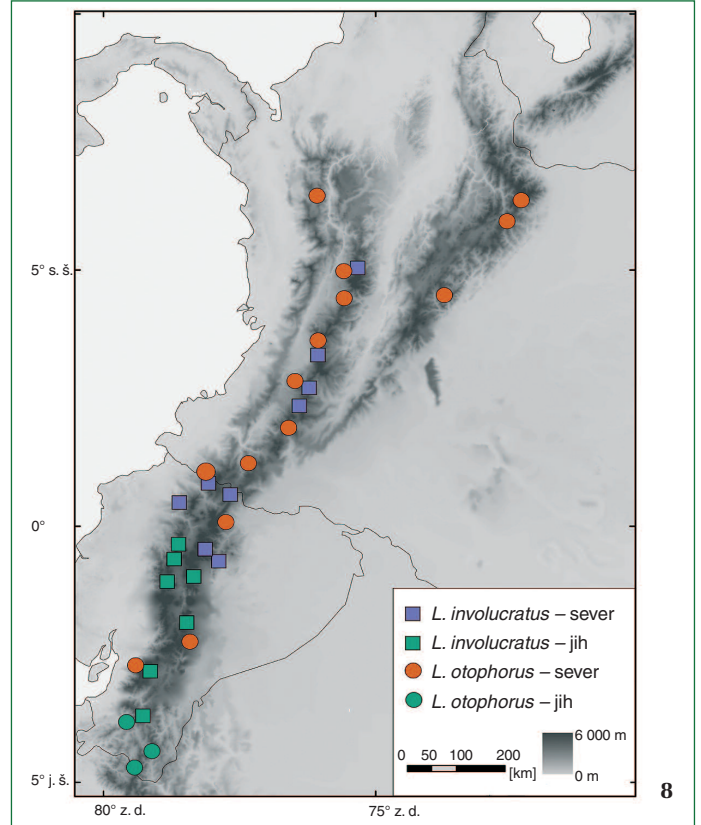
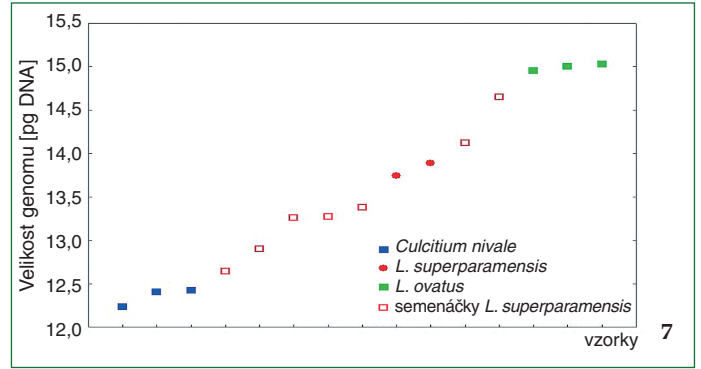
horského lesa a mohou dosahovat délky několika metrů. Jejich květenství jsou složená z velkého počtu drobnějších úborů a široké listy nejsou opatřeny výraznějším oděním (obr. 2–5). Setkáváme se s nimi v celém areálu rodu, tj. v horských lesích od Venezuely (velmi vzácně) po Bolívii. Naproti tomu polokeře zastoupené např. druhy *L. ovatum*, *L. gargantuanum* či *L. linguulatum* svým vzrůstem zřídka přesahují 50 cm. Rostliny jsou zpravidla nevětvené a každý stonek většinou nese pouze jeden nebo několik málo mohutnějších úborů. Listy jsou tuhé s podvinutými okraji a u řady druhů opatřeny dlouhými hustými chlupy, které jim dávají nasivělý vzhled (obr. 6, 10 a 12–15). Tato skupina druhů je nejpočetnější na území Ekvádoru, ale zasahuje i do páramos jižní Kolumbie. Jedinou výjimkou je venezuelský *L. longipenicillatus*. Morfologicky přechodnou formu mezi oběma skupinami tvoří *L. otophorus*, který obývá nižší křovinné polohy párama. Tento druh má relativně široké listy bez výrazného ochlupení a vzrůstem,

počtem úborů i jejich velikostí představuje přechod mezi páramovými a lesními druhy. Zcela ojedinělým typem v rámci rodu je *L. mojanensis* – mohutná, až 1 m vysoká širokolistá bylina osídlující mokřadní biotopy travinného a křovinného párama i polootevřených stanovišť při horní hranici výskytu horského mlžného lesa na území Ekvádoru a Kolumbie (obr. 11).

Existenci dvou hlavních růstových forem můžeme přisoudit adaptivní evoluci spojené s osídlováním nových biotopů. Ale jakým směrem se tato evoluce ubírala? To byla hlavní otázka, která nás v souvislosti s tímto pozoruhodným rodem napadla a inspirovala k projektu snažícímu se proniknout do tajů evolučních procesů této andské skupiny prostřednictvím moderních metod založených na analýze DNA. Rozhodně ale nejsme první, kteří se snaží existenci růstových forem nějak interpretovat. Španělský botanik José Cuatrecasas (1903–96) zasvětil značnou část svého bádání květeně párama, především skupině hvězdicovitých rostlin a v hledáčku jeho zájmů se ocitl i rod *Lasiocephalus*. Výborná znalost andské orogeneze a biogeografie jednotlivých druhů ho vedla k domněnce, že mezi původně lesními druhy se našel jeden, který dokázal osídlit prostředí párama vznikající během pokračujícího vrátnění And. Tento evoluční scénář osídlení párama z horského lesa vycházel z logické úvahy, že horský les je znatelně starším ekosystémem než relativně mladé prostředí párama a lesní druhy zaujímají mnohem širší geografický areál než druhy páramové.

- 1 Laguna Alcohol (Kolumbie) v nadmořské výšce 3 900 m oklopená páramem představuje typický biotop řady zástupců rodu *Lasiocephalus*.
- 2 Několikametrová liána *L. patens* se vyskytuje v Ekvádoru, Kolumbii a Venezuele.
- 3 Složená květenství s větším počtem drobných úborů druhu *L. patens*
- 4 *L. involucratum* – liána ekvádorského a kolumbijského horského lesa. Jednotlivé úbory podepírají výrazné zákrovní listy.
- 5 Výskyt širokolisté liány *L. cuencanus* je omezen na horský les jižního Ekvádoru.
- 6 *L. gargantuanum* – polokeř s úzkými kožovitými listy a nižším počtem větších úborů vyskytující se vzácně na otevřených stanovištích superpárama jižní Kolumbie a severního Ekvádoru
- 7 Velikost genomu domnělého hybridu *L. superparamensis* leží právě mezi hodnotami zjištěnými u jeho předpokládaných rodičů *L. ovatum* a *Culcitium nivale*. Velikost genomu jeho semenáčků je v souladu s domněnkou o zpětném křížení s rodičovskými druhy. Blíže v textu
- 8 Molekulární data rozdělila populace *L. involucratum* a *L. otophorus* do dvou geografických skupin. Zatímco v severní části areálu jsou oba druhy snadno odlišitelné (různé barevné skupiny), v jižním Ekvádoru je nelze na základě AFLP jednoznačně rozlišit (obě vyznačeny zeleně).
- 9 Z polštářovitého porostu jitrocele tuhé (*Plantago rigida*) vyrůstají modré květy hořců, červeně kvetoucí *Castilleja* (zárazovité – *Orobanchaceae*) a *Culcitium nivale* se sivými listy. V pozadí rostou bělokvěté hořečky.







Kolonizace byla spojena s výraznou změnou vzhledu v důsledku adaptace na pravidelné noční mrazy (ochlupení kožovitých listů), nižší úhrn srážek a otevřený typ stanoviště, který neposkytuje možnost liánovitého růstu. Podle Cuatrecasasových představ dal tento úspěšný kolonizátor následně vzniknout celé řadě páramových druhů, které se rozšířily podél horských hřebenů ekvádorských, kolumbijských a v ojedinělém případě i venezuelských And. Ale bylo tomu skutečně tak? Nemohlo ke kolonizaci párama lesními zástupci docházet opakovaně v různých částech areálu? A co když je předpoklad o směru evoluce z lesa směrem do párama úplně mylný? Není možné, že tomu bylo právě naopak a původně páramové rostliny postupně obsadily i lesní biotopy?

Využití metody

Během několika terénních výprav jsme sbírali rostlinný materiál v páramu a horském lese v rámci celého areálu rodu. Přestože jsme o peruánské sběry přišli při požáru univerzitních herbářů ve městě Trujillo, podařilo se nám pro zbývající oblasti nashromáždit rozsáhlou kolekci vzorků rostlin pro analýzy DNA. Ty jsme analyzovali různými metodami zkoumajícími genetickou variabilitu s cílem objasnit příbuzenské vztahy mezi jednotlivými druhy.

● Průtoková cytometrie – metoda využívající měření fyzikálních a chemických vlastností buněk nebo buněčných jader během průchodu silným zdrojem světla, např. laserovým paprskem; v botanice se používá hlavně pro zjišťování obsahu DNA v buněčném jádře (viz Živa 2005, 1: 46–48).

Cytometrická měření poskytují pouze nepřímé důkazy o možných příbuzenských vztazích a evolučních trendech. Pro odhalení mezidruhových vazeb v mnohem jemnějším měřítku slouží sekvenování DNA.

● Sekvenování DNA – umožňuje zjistit pořadí nukleotidů, rozdíly u různých druhů se následně využívají ke stanovení genetické podobnosti; pro sekvenování je možné použít nejen jadernou, ale i chloroplastovou a mitochondriální DNA.

Čeď hvězdicovitých patří mezi vývojově nejmladší skupiny rostlin, což se odráží v menších genetických rozdílech, hlavně na mezidruhové úrovni. To přináší

řadu úskalí při výběru vhodné molekulární metody. Zatímco u starobylších skupin rostlin je možné použít sekvenování širokého spektra úseků jaderné i chloroplastové DNA, pro čeď hvězdicovitých zpravidla vhodné nejsou. Dlouhodobým testováním variability desítek různých úseků DNA jsme pro rod *Lasiocephalus* jako nejvhodnější vybrali jaderný úsek ITS (Internal Transcribed Spacer). U blízce příbuzných druhů, kde jsou sekvenováním odhaleny pouze malé rozdíly (to byl přesně náš případ), se s úspěchem používá metoda AFLP.

● AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – polymorfismus v délce namnožených fragmentů) – je metoda, při níž je DNA z buňky (jaderná, chloroplastová i mitochondriální) rozštěpena speciálními enzymy na kratší úseky a vybraná část těchto úseků se namnoží. Pro každý vzorek je získán soubor desítek až stovek fragmentů s přesně stanovenou délkou. Porovnáním délek fragmentů různých vzorků se zjišťuje jejich genetická podobnost.

Zatímco některé z našich výsledků jsou ve shodě s Cuatrecasasovou teorií a našimi očekáváními vycházejícími z terénního pozorování, jiné přinesly poměrně překvapivé poznatky o genetické struktuře rodu.

Vztahy mezi lesními a páramovými druhy

Cytometrická měření rovněž umožňují zjistit polyploidizaci (proces zmožení celých sádek chromozomů), která je v rostlinné říši velice rozšířená a patří k hlavním speciálním dějům (viz také Živa 2009, 5: 204–208). Nám se u tří druhů podařilo odhalit několik triploidních rostlin (tj. majících v jádře tři sádky chromozomů místo obvyklých dvou). Vždy ale šlo o ojedinělé exempláře v jinak diploidních populacích. Zdá se tedy, že polyploidizace v mikroevolučních procesech studovaného rodu nehraje významnější roli.

Zjistili jsme, že existuje přímý vztah mezi velikostí genomu daného druhu a typem obývaného stanoviště. Nejmenší velikost genomu byla nalezena u druhů osídlujících superpáramo (nejvyšší nadmořské výšky těsně pod hranici věčného ledu), postupně se zvětšovala u druhů travinného a křovitého subpárama. Největší byla zjištěna

10 *L. longipenicillatus* je druh omezený na venezuelské Andy. Ačkoli obývá páramo a superpáramo, molekulární a cytometrické analýzy ho řadí do blízkosti lesních druhů.

11 *L. mojandensis* představuje v rámci studovaného rodu neobvyklou životní formu. Tato mohutná širokolistá bylina osídluje mokřadní biotopy horského lesa a párama.

12 *L. superparamensis* – nově popsany taxon objevený při našem terénním výzkumu. Molekulární a cytometrická data naznačují, že jde o křížence mezi druhy *L. ovatus* a *C. nivale*.

13 V páramu jižního Ekvádor se podařilo objevit nový druh, který jsme na počest Josého Cuatrecasase nazvali *Lasiocephalus josei*.

14 Ekvádorský *L. lingulatus* je typický představitel úzkolistých polokeřů vázaných na páramos.

15 Společný výskyt *L. ovatus* (hustě olistěné lodyhy) a *C. nivale* (přízemní růžice listů). Snímky P. Sklenáře, E. Duškové (1, 9, 15), orig. F. Koláře (7, 8)

u lesních druhů. Jedinou výjimkou, která toto schéma porušuje, je *L. longipenicillatus* (obr. 10), který (přestože obývá superpáramo) se velikostí genomu blíží lesním druhům. *L. longipenicillatus* je vůbec do značné míry výjimečným zástupcem páramových druhů. Zatímco areály ostatních jsou omezeny na Ekvádor a jižní Kolumbii (s výjimkou *L. otophorus* pokrývajícího také převážnou část kolumbijských And), *L. longipenicillatus* je venezuelským endemitem. Charakterem vzrůstu, stavbou listu a velikostí a počtem úborů také nezapadá mezi typické druhy párama. Všechny zmíněné skutečnosti naznačují, že ačkoli sám obývá páramo, jeho bližší příbuzní jsou patrně lesní druhy. Tuto domněnku podporují i výsledky sekvenování úseku ITS, které rozdělily páramové a lesní druhy do dvou samostatných skupin. Výjimečné postavení má opět *L. longipenicillatus*, který je spolu s výše zmíněným širokolistým, avšak páramovým „přechodně“ vyhlížejícím *L. otophorus* jednoznačně zařazen do skupiny jinak lesních druhů. Na zvláštní postavení těchto dvou druhů poukazují i výsledky analýzy AFLP, které rozdělily



všechny vzorky do tří skupin. První z nich (A) svým složením odpovídá skupině páramových druhů odhalené sekvenováním úseku ITS – obsahuje úzkolisté druhy (tedy nikoli *L. longipenicillatus* a *L. otophorus*). Skupina lesních druhů zjištěná sekvenováním ITS se v analýze AFLP rozpadla na dvě. Jednu z nich (B) tvoří dva lesní druhy a širokolistý páramový *L. otophorus*. Poslední skupina (C) představuje zvláštní směs druhů – najdeme zde typické lesní liány, venezuelský superpáramový polokeř *L. longipenicillatus*, mohutnou širokolistou bylinu mokřadních stanovišť *L. mojanensis* a jeden druh z blíže příbuzného rodu *Culcitium* (*C. nivale*).

Křížení mezi rody

Rod *Lasiocephalus* je blízké příbuzný rodům *Culcitium* a starček (*Senecio*). Podle některých autorů bývá do těchto rodů dokonce zařazován. Na mnoha ekvádorských lokalitách byl nápadný společný výskyt tří druhů – *L. ovatus*, *L. superparamensis* a *C. nivale*. Navíc jsme si povšimli, že *L. superparamensis* má mnoho vnějších morfologických znaků, jako např. tvar a oděnění listů, přechodných mezi dvěma zbylými druhy. Během terénního průzkumu jsme nenarazili na žádnou lokalitu, kde by se *L. superparamensis* vyskytoval bez současné přítomnosti obou dalších druhů. Všechny tyto skutečnosti nás vedly k domněnce, že jde o druh vzniklý mezidrodovou hybridizací *L. ovatus* a *C. nivale*. Proto jsme se na tyto tři druhy podrobně zaměřili i při cytometrických analýzách. Výsledky měření ukazují, že domnělý hybrid má množství jaderné DNA ležící právě mezi hodnotami zjištěnými u předpokládaných rodičů, což je v shodě s naší hypotézou. Zvědavost nás vedla ještě dál. Ze semen *L. superparamensis* jsme v laboratoři vypěstovali semenáčky a zahrnuli jsme je do analýz. Velikost genomu semenáček naznačuje, že v přírodě dochází ke zpětnému křížení hybridu *L. superparamensis* s oběma rodičovskými druhy (obr. 7). Protože hodnoty u vypěstovaných semenáček nebyly pozorovány u dospělých rostlin nalezených v terénu, předpokládáme, že zpětným křížením klesá životaschopnost vzniklých jedinců, kteří na přirozených stanovištích zanikají ve stadiu semenáček.

Výsledky sekvenování úseku ITS ukázaly, že rody *Culcitium* a *Lasiocephalus* k sobě mají skutečně velmi blízko, a dokonce i to, že *C. nivale* vytváří nerozlučnou dvojici s druhem *L. superparamensis*, což jenom podporuje naši domněnku o mezidrodové hybridizaci. Rovněž analýza AFLP poukazuje na blízké vazby. Zajímavé je, že se v některých analýzách vzorky *L. superparamensis* rozdělily do dvou menších skupin – první se držela pohromadě s jedním z předpokládaných rodičů mezi páramovými druhy (skupina A), zatímco druhá se přimkla ke *C. nivale* (C). Pokud jsme z analýz *C. nivale* vyloučili, všechny vzorky *L. superparamensis* vytvořily kompaktní celek s *L. ovatus*, což lze chápat jako další podporu naší domněnky o hybridizaci.

Geografické rozšíření genetické variability

V dalším kroku jsme se zaměřili na genetickou strukturu jednotlivých skupin. A tady se začaly objevovat výsledky, které jsme jenom na základě terénního pozorování očekávat nemohli. Ve skupině páramových druhů (A) jsou mimo jiné zahrnuty *L. ovatus* a *L. lingulatus*. Oba jsou morfologicky dobře odlišitelné a nedochází mezi nimi k záměně. Vyskytují se v Ekvádoru (často na společných lokalitách) a *L. ovatus* zasahuje i do jižní Kolumbie. Výsledky AFLP ukázaly, že zatímco v severní části Ekvádoru jsou tyto dva druhy geneticky dobře rozlišitelné, v nejnižnějších částech Ekvádoru jsou si nečekaně blízké. Podobnou situaci jsme našli i ve skupině lesních druhů (B). *L. involucratum* a *L. otophorus* mají podobné areály zahrnující jak Ekvádor, tak Kolumbii. I tady se ukázalo, že v severní části výskytu (Kolumbie a severní Ekvádor) jsou druhy geneticky dobře vymezené, zatímco v jižní části (jižní a střední Ekvádor) takové vymezení není možné (obr. 8). Na základě popsané situace si lze představit, že jižní Ekvádor koresponduje s místem vzniku těchto druhů, což se odráží ve vysoké míře jejich genetické podobnosti. Teprve během nezávislé migrace jednotlivých druhů směrem na sever došlo ke vzniku a fixaci nových genotypů, takže lze odlišit dvě samostatné linie. Objevená genetická struktura by mohla být i důsledkem intenzivní hybridizace v ob-

lasti jižního Ekvádoru. Vzhledem ke společnému výskytu druhů i v severních částech jejich areálů se toto vysvětlení zdá ale méně pravděpodobné.

Závěrem

Pokud spojíme dohromady všechny zjištěné indicie, obrázek evoluční historie studovaného rodu získává ostřejší rysy. Výsledky ukazují, že venezuelský *L. longipenicillatus* se od ostatních páramových druhů liší nejen oblastí výskytu, ale i geneticky. Je tedy vysoce pravděpodobné, že jde o dvě nezávislé linie a lze předpokládat, že k osídlení párama došlo v evoluci rodu opakovaně, a to nejméně dvakrát. Směr kolonizace naše data bohužel nemohou jednoznačně určit, ale s ohledem na rozdílné stáří lesních a páramových biotopů se zdá být pravděpodobnější, že páramové druhy jsou odvozené od lesních. Zatím ale nelze vyloučit ani možnost přechodu z párama do lesa a zpět (v případě *L. longipenicillatus*). Otázkou zůstává, jak si vysvětlit odlišnou míru endemismu mezi oběma skupinami druhů. Zatímco lesní druhy mají zpravidla rozsáhlé areály, ty páramové jsou omezeny na menší území. To by se dalo interpretovat jako důsledek nedávného vzniku páramových druhů, které se ještě nestihly po Andách rozšířit jako jejich starší příbuzní z horského lesa. Toto vysvětlení sice zapadá do mozaiky důkazů podporujících hypotézu o kolonizaci párama lesními druhy, ale ve vědě je nutné hledat všechna možná vysvětlení pozorovaných jevů, nejen ta, která nám nejlépe vyhovují. Je tedy třeba přiznat, že zmiňované rozdíly v rozšíření mohou být způsobeny i dalšími faktory. Patří mezi ně např. možnost, že šíření mezi jednotlivými ostrovy párama na nejvyšších vrcholcích a hřebenech hor může být obtížnější než v rámci spojitějšího prostředí horského lesa. Výzkum rovněž odhalil, že významnou roli v evoluci rodu hrají hybridizační procesy a změna velikosti genomu. Například polyploidizace ve studovaném rodu zřejmě k důležitým evolučním mechanismům nepatří. Zvláštní distribuce genetické variability v různých částech areálů některých druhů (zejména genetická podobnost v jižním Ekvádoru) otvírá prostor pro jiné otázky, které si zaslouží další studium.