Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Botanika

Bc. Monika Pospíšilová

EVOLUCE VELIKOSTI GENOMU V RODĚ *GLOBBA* (ZINGIBERACEAE)

Genome size evolution in tropical tribe *Globba* (Zingiberaceae)

Diplomová práce

Školitel: Tomáš Fér, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 08. 2012

Podpis

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli za vstřícnost, motivaci a příjemnou spolupráci a Elišce Záveské za její nadstandardní péči při zaučování v DNA laboratoři, metodické konzultace a pomoc při sběru materiálu v Edinburghu. Dalšími, kterým bych chtěla poděkovat za odbornou pomoc, jsou Vlasta Jarolímová, které vděčím za zasvěcení do karyologických technik, Ota Šída, se kterým jsem strávila pohodový čas ve skleníku a u cytometru, Mark Newman, který mi poskytl mnoho jedinečných informací o studovaném materiálu a báječně se o nás staral při návštěvách Edinburghu, Helen Yeats, která nám velmi usnadnila sběr materiálu ve skleníku v Edinburghu, Jana Leong-Škorničková ze Singapuru, laborantka Lenka Flašková a všichni, kteří shromažďovali rostlinný materiál. Dále můj vděk patří rodině za podporu a klidné zázemí a partnerovi navíc za software na míru. A na závěr bych zde ráda vyjádřila své díky i kamarádům, kteří se mnou byli při vznikání této práce, podporovali a motivovali mě. Jsou to Honza Prančl, Lenka Musilová, Kristýna Šemberová, Dominik Mokriš, Míša Králová a další.

(http://web3.dnp.go.th)

Abstrakt

Variabilita velikosti genomu dosahuje u rostlin několika řádů i v rámci poměrně příbuzných skupin. Studiem velikosti genomu ve fylogenetickém kontextu je dosahováno zajímavých výsledků charakterizující evoluci jednotlivých skupin rostlin. V tomto směru doposud nebyly zkoumány tropické rostliny.

Tropický rod *Globba* (cca 100 druhů) patří do ekonomicky významné čeledi Zingiberaceae. Centrum diverzity rodu se nachází v Thajsku, ale rozšíření sahá od východní Indie a jižní Číny až po Indonésii a Filipíny. Jedná se o polyploidní komplex s výskytem dvou cytotypů v rámci jednoho druhu (2n = 32 a 2n = 48) charakteristickým minimálně ve třech ze sedmi rozlišovaných sekcí.

Cílem této práce byla rekonstrukce fylogeneze skupiny, zjištění role polyploidie a zhodnocení evoluce velikosti genomu rodu *Globba* ve fylogenetickém kontextu, k čemuž bylo využito moderních biosystematických metod (průtoková cytometrie, počítání chromozómů, sekvenování jaderných a chloroplastových DNA úseků). Ke zpracování a vyhodnocení dat bylo použito četných softwarů a statistických metod.

Velikost genomu byla v této skupině měřena poprvé. Z 87 jedinců byla nejmenší velikost genomu naměřena u druhu *Globba nuda* (2C = 1,11 pg). Největší velikost genomu byla zjištěna u druhu *Globba sp.* E20110277 (2C = 3,84 pg). Průměrná hodnota činila 2C = 2,35 pg a medián 2C = 2,14 pg. Nejmenší monoploidní velikost genomu byla naměřena též u druhu *Globba nuda* (C_x = 0,139 pg), největší u druhu *Globba sessiliflora* (C_x = 0,475 pg), průměr činil C_x = 0,262 pg a medián C_x = 0,255 pg. Nové chromozómové počty byly zjištěny pro druhy *Globba siamensis* (2n = 32), *G. atrosanguinea* (2n = 32) *G. nisbetiana* (2n = 20–24) a *G. sp. novum* E20081114 (2n = 32). Fylogenetické analýzy jsou oproti dřívějším rozšířeny o druhy *G. purpurascens, G. unifolia, G. corneri, G. kerrii, G. nisbetiana* a *G. sp. novum* (E20081114).

Bylo zjištěno, že v evoluci této skupiny nedochází k obecnému trendu zvětšování ani zmenšování velikosti genomu, že množství DNA je úzce spojeno s fylogenezí (taxony nejsou nezávislé), a že změny jsou plynulé (ne skokové). Velikost genomu společného předka byla odhadnuta na 2C = 1,46 pg a $1C_x$ = 0,21 pg.

Klíčová slova: *Globba*, evoluce velikosti genomu, C-hodnota, fylogeneze, chromozómy, Zingiberaceae

Abstract

The variability of the genome size reaches several grades even within relatively close groups of plants. The study of the genome size in the phylogenetic context provides interesting results which characterize the evolution of the individual groups of plants. In this respect, tropical plants have yet not been studied.

Tropical genus *Globba* (ca. 100 species) belongs to an economically significant family Zingiberaceae. The diversity centre is found in Thailand but it spreads from east India and southern China up to Indonesia and the Philippines. It is a polyploid complex which exists in two cytotypes within one genus (2n = 32 a 2n = 48); it is characteristic minimally in three out of seven distinguished sections.

The aim of this thesis has been a reconstruction of the group phylogeny, discovering the role of the polyploid and evaluation of the genome size evolution of the *Globba* genus in the phylogenetic context. To this end, modern biosystematic methods were used (flow cytometry, chromosome counting, sequencing of the nuclear and chloroplast DNA regions). Many types of software and statistical methods were used to process and interpret the data.

In this group, the genome size was measured for the first time. Out of 87 individuals, the smallest size was measured with *Globba nuda* (2C = 1.11 pg). The largest genome size was discovered with *Globba sp.* E20110277 (2C = 3.84 pg). The smallest monoploid genome size was measured also with *Globba nuda* (C_x = 0.139 pg), the largest monoploid genome size was in *Globba sessiliflora* (C_x = 0.475 pg), the average amounts to C_x = 0.262 pg and the median is C_x = 0.255 pg. New chromosome counts were discovered with *Globba siamensis* (2n = 32), *G. atrosanguinea* (2n = 32), *G. nisbetiana* (2n = 20-24) and *G. sp. novum* E20081114 (2n = 32). Unlike in earlier studies, the phylogenetic analyses were enriched with *G. purpurascens, G. unifolia, G. corneri, G. kerrii, G. nisbetiana* and *G. sp. novum* (E20081114).

It has been found out that in this group evolution, there does not occur the general tendency to enlarge or reduce the genome size, that the DNA amount is closely connected to the phylogeny (taxa are not independent), and that changes are gradual (not punctual). The genome size of a common ancestor was estimated at 2C = 1.46 pg and $1C_x$ = 0.21 pg.

Keywords: *Globba*, genome size evolution, C-value, phylogeny, chromosomes, Zingiberaceae

Seznam zkratek

BI	Bayesian inference, Bayesovská analýza
bp	Base pair, komplementární páry bazí (Mbp – megabase pair, milion párů bazí)
CI	Consistency index, konzistenční index
CI	Confidence interval, konfidenční interval
GLS	Generalized least squares
ILD	Incongruence lenght difference
ITS	Internal transcribed spacer
Lh	Likelihood
LR	Likelihood ratio
LRT	Likelihood ratio test
ML	Maximum likelihood, maximální věrohodnost
MP	Maximum parsimony, maximální parsimonie
RI	Retention index, retenční index
SAT-chrom.	Satelitní chromozómy
sp.	Z latinského species, značí druh z určeného rodu či vyšší taxonomické jednotky

Obsah

1 Úvod 1
1.1 Kladené otázky 3
1.2 Velikost genomu 4
1.3 Evoluce velikosti genomu 6
1.3.1 Polyploidie 7
1.3.2 Chromozómové přestavby 7
1.3.3 Studium evoluce velikosti genomu 10
1.3.3.1 Statistická analýza velikosti genomu 14
1.4 Rekonstrukce fylogeneze 16
1.4.1 Vybrané úseky DNA 16
1.4.2 Bayesovská analýza 17
1.4.3 Maximální parsimonie 18
1.4.4 Maximum likelihood 18
1.5 Zingiberaceae 20
1.5.1 Karyologie a velikost genomu 23
1.6 Tribus Globbeae 24
1.6.1 *Hemiorchis* Kurz 25
1.6.2 *Gagnepainia* K. Schum. 25
1.6.3 *Mantisia* Sims. 26
1.6.4 *Globba* 26
1.6.4.1 Reprodukční systém a morfologie květu 29
1.6.4.2 Karyologie 31
1.6.4.3 Geografie 36
2 Materiál a metodika 38
2.1 Materiál 38
2.2 Metodika 38
2.2.1 Velikost genomu a průtoková cytometrie 38
2.2.2 Počty chromozómů 40
2.2.3 Fylogenetické analýzy 40
2.2.4 Vyhodnocení evoluce velikosti genomu 46
3 Výsledky 49
3.1 Fylogenetické analýzy 49
3.1.1 ITS soubor dat 49
3.1.2 *mat*K soubor dat 50
3.1.3 Rozdíly mezi ITS a *mat*K soubory 50
3.1.4 Spojený soubor *mat*K-ITS 51
3.2 Počty chromozómů 61
3.3 Velikost genomu 62
3.4 Evoluce velikosti genomu 66
3.4.1 Statistické testování 68
3.4.1.1 Test trendu evoluce 69
3.4.1.2 Odhady škálovacích parametrů 69
4 Diskuze 72
4.1 Fylogenetické analýzy 72
4.1.1 Synonymika jmen 72
4.1.2 Srovnání s dosavadní fylogenezí 72
4.1.3 Hybridizace a její důsledky 73
4.1.4 Zařazení nových a neurčených druhů 73
4.2 Polyploidie 74

4.2.1 Počty chromozómů 74
4.2.2 Vznik různých cytotypů 76
4.2.3 Velikost genomu 76
4.2.3.1 C_x-hodnota a ploidní stupeň 76
4.3 Charakter evoluce velikosti genomu 77
4.3.1 C_x versus 1C-hodnoty 77
4.3.2 Přítomnost trendu v evoluci 78
4.3.4 Ancestrální velikost genomu 79
4.4 Plány do budoucnosti 80
5 Závěr 81
Seznam použité literatury 82
Přílohy 88

1 Úvod

Velikost genomu a stupeň ploidie se v posledních desetiletích staly v biosystematické botanice velmi užitečnými a často studovanými charakteristikami rostlin. V souvislosti s tím vzrostl zájem o rozluštění charakteru evoluce velikosti genomu. Tento jev je zkoumán v různých taxonomických úrovních, jako jsou například celá skupina krytosemenných rostlin (Soltis *et al*., 2003), čeledi (Brassicaceae - Lysák *et al*., 2009; Orchidaceae - Leitch *et al*., 2009) nebo rody (*Orobanche* - Weiss-Schneeweiss *et al*., 2006; *Hieracium* - Chrtek *et al*., 2009; *Allium* - Gurushidze *et al*., 2012).

Variabilita ve velikosti genomu je u rostlin obrovská a to i na vnitrorodové úrovni (velikost genomu se u krytosemenných liší 2400 násobně, Pellicer *et al.,* 2010) a často nekoreluje s evoluční odvozeností organismu. Tyto velké rozdíly ve velikostech genomu jsou způsobovány několika mechanismy, z nichž ke zvětšování genomu nejvíce přispívá zmnožování transponovatelných elementů a polyploidizace a ke zmenšování genomu vedou chyby při rekombinaci (Grover *et* Wendel, 2010). I přes vysokou efektivitu mechanismů zvětšujících genom má většina rostlin malý genom (Leitch *et al*., 2005), protože se zdá, že velké genomy jsou evolučně nevýhodné (Knight *et al*., 2005). Názor na charakter evoluce velikosti genomu stále provází mnoho nejasností. K jejich rozklíčování je třeba se zabývat velikostí genomu u co nejširšího spektra rostlin. V tomto směru jsou velmi málo prozkoumané například tropické a subtropické skupiny. Ačkoli jsou tropy významným centrem diverzity, bývají často v moderních biosystematických projektech opomíjeny (především z důvodu obtížné dostupnosti).

Existují odhadem desítky prací na téma evoluce velikosti genomu určité skupiny v souvislosti s fylogenezí. Tyto publikace mají různé závěry s rozdílnými hypotézami. Nevyplývá z nich žádný obecný model evoluce velikosti genomu. Nicméně v několika případech byl pozorován nějaký trend jako například zmenšování genomu v odvozených taxonech u *Festuca* (Šmarda *et al*., 2008), *Allium* (Ricroch *et al*., 2005) nebo naopak zvětšení genomu v odvozených skupinách u Liliaceae (Leitch *et al*., 2007). Velmi často je pozorována alespoň podobná velikost genomu v rámci jednotlivých fylogenetických skupin, což bylo pozorováno například u rodu *Lupinus* (Naganowska *et al*., 2003), *Hieracium* (Chrtek *et al*., 2009), *Lasiocephalus* (Dušková *et al*., 2010) a *Echinops* (Sánchez-Jiménez *et al*., 2012). V některých případech se souvislost velikosti genomu s fylogenezí neprokázala, ale byly nalezeny korelace spíše s jinými faktory, například ekologickými. Mezi takové patří rod *Gossypium* (Wendel *et al*., 2002) nebo *Veronica* (Albach *et* Greilhuber, 2004). V současnosti probíhá výzkum evoluce velikosti genomu v čeledi Zingiberaceae, který vede O. Šída (Botanické oddělení Národního muzea, Horní Počernice). Tento projekt bude jako první v tomto směru zkoumat tropickou skupinu rostlin.

Předmětem této práce je analýza evoluce velikosti genomu v tropickém rodě *Globba* (Zingiberaceae). Čeleď zázvorovitých je z fylogenetického hlediska poměrně kvalitně prozkoumána

(Kress *et al*., 2002). Reprezentuje ji 53 rodů a přibližně 1200 druhů. Tribus Globbeae a Zingibereae, každý přibližně se 100 druhy, patří mezi dva menší. Alpinieae a Hedychieae, po řadě přibližně s osmi sty a třemi sty druhy, jsou dvěma většími. V rámci čeledi byla velikost genomu zkoumána pouze u rodu *Curcuma* (Leong-Škorničková *et al*., 2007; Záveská *et al*., 2011). Rod *Globba* L. (cca 100 druhů) patří do tribu Globbeae, který zahrnuje ještě 2 malé rody *Hemiorchis* Kurz (3 druhy) a *Gagnepainia* K. Schum. (3 druhy). Dříve sem patřil i rod *Mantisia* Sims. (4 druhy), ale ten se stal součástí rodu *Globba* (Williams *et al*., 2004). Do této práce byly zapojeny mimo rodu *Globba* i tyto příbuzné taxony. Nedávná fylogenetická studie tribu Globbeae pracuje se 7 molekulárně a geograficky vymezenými sekcemi (Williams *et al*., 2004). Přirozená stanoviště se nachází v jihovýchodní Asii, sahá od jižní Číny, přes Indii, až po Sumatru a Borneo s centrem diverzity v Thajsku (Larsen, 1996). Ačkoli známe přibližnou fylogenezi tribu Globbeae, nikdy nebyla měřena velikost genomu. Přestože se má za to, že polyploidie je v tropických oblastech poměrně vzácná, podobně jako i další rody z čeledi Zingiberaceae (např. *Hedychium*, *Kaempferia*, *Curcuma*) je *Globba* polyploidním komplexem (Takano *et* Okada, 2002). V literatuře je dohledatelných přibližně 10 různých chromozómových počtů pro rod *Globba*. Nejčastěji bylo zjištěno 32 a 48 chromozómů. Zajímavostí je, že tyto dva počty se běžně vyskytují jako dva cytotypy v rámci jednoho druhu. V případě, kdy je 2n = 48 se může jednat o triploidní (Takano, 2001) nebo hexaploidní jedince (Lim, 1972). S největší pravděpodobností došlo k několikanásobnému vzniku cytotypu 2n = 48 (Okada *et* Takano 2002).

K vypracování tématu bylo použito vhodných metod současné biologie rostlin, zahrnující zejména molekulární techniky. Vytvoření představy o fylogenezi bylo dosaženo sekvenováním vybraných úseků rnDNA a cpDNA. Velikost genomu byla stanovena průtokovou cytometrií. Chromozómové počty byly zjištěny klasickou roztlakovou metodou. Ke zpracování dat bylo použito rozličných softwarů. S těmito údaji bylo možné určit monoploidní velikost genomu (= velikost genomu vydělená ploidií) a tu dále zkoumat a vyhodnotit v kontextu fylogenetického stromu.

Tato práce si klade za cíl vyřešit otázku fylogenetických vztahů uvnitř tribu Globbeae a rozšířit tak dosavadní fylogenezi (Williams *et al*., 2004), zhodnotit vývoj velikosti genomu tribu Globbeae ve fylogenetickém kontextu a analyzovat karyologické a polyploidizační procesy.

1.1 Kladené otázky

1) **Jaké jsou fylogenetické vztahy v tribu Globbeae?**
    a. Jsou sekce monofyletické?
    b. Jaké jsou vztahy mezi sekcemi?
2) **Jakou roli hraje polyploidie?**
    a. Je přítomna ve všech sekcích nebo omezena jenom na některé?
    b. Jaké stupně ploidie jsou ve skupině přítomny?
    c. Je nějaký rozdíl v monoploidních velikostech genomů u různě ploidních jedinců?
3) **Existuje patrný trend v evoluci velikosti genomu daného tropického tribu?**
    a. Pokud ano, existuje tendence ke zvětšování či naopak zmenšování velikosti genomu?
    b. Je evoluční změna velikosti genomu spíše dokladem adaptivní radiace nebo druhově specifické evoluce?
    c. Jsou změny postupné nebo skokové?
    d. Jaká je ancestrální velikost genomu?

1.2 Velikost genomu

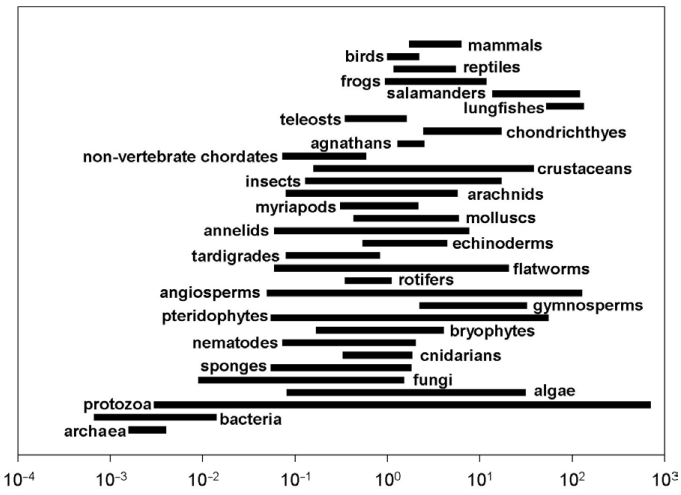
Genom je celková sekvence nukleotidů v organismu. Je známo, že sekvence kódujících genů se na velikosti genomu podílejí pouze malým procentem a úseky neobsahující geny můžou zaujímat 90–99 % genomu (Flavell, 1980). Velké genomy obsahují přibližně stejné množství genů, jako je obsaženo v malých genomech. Vysoká variabilita ve velikosti genomu je způsobena množstvím oblastí DNA, které jsou bez genů, mezi takové patří tandemové repetice a transponovatelné elementy (TE). Samotné TE mohou reprezentovat více než polovinu celého genomu (Kubis *et al*., 1998; Vicient, 2010; Harrison *et* Schwarzacher, 2011).

Pojmem C-hodnota se rozumí množství DNA v jádře buňky s nereplikovanou haploidní sadou chromozómů (Swift, 1950, Greilhuber *et al*., 2005). Její velikost se nejčastěji vyjadřuje jako hmotnost v pikogramech (pg), ale existuje i převod na počet párů bazí: **1 pg = 978 Mbp** (Doležel *et al*., 2003). Vzhledem k různým výkladům termínů „velikost genomu" a „množství DNA" Greilhuber *et al*. (2005) navrhli ustálení terminologie. Pro monoploidní obsah DNA (tj. somatický obsah DNA vydělený stupněm ploidie) byl zvolen termín „**C_x-value**" (kde x je základní chromozómové číslo, *value* = hodnota) a pro obsah DNA bez ohledu na ploidii termín „**C-value**". Nejčastěji se používá „1C-value" pro množství DNA v haploidním stavu (gamety) a „**2C-value**" pro množství DNA v somatických buňkách. Velikost genomu se nejsnáze zjišťuje průtokovou cytometrií (Doležel *et al*., 2007).

Za posledních 60 let byly nashromážděny údaje o velikosti genomu pro 6287 druhů, které jsou dostupné v internetové databázi „*Plant DNA C-values Database*" (Bennett *et* Leitch, 2010). Toto množství druhů odpovídá přibližně 1,8 % z celkem 352 tisíc odhadovaných druhů krytosemenných rostlin (Paton *et al*., 2008).

Nejmenší známý genom má drobná masožravá rostlina *Genlisea margaretae* z čeledi Lentibulariaceae (1C = 0,063 pg ≈ 63 Mbp, 2n = c 52; Greilhuber *et al*., 2006) a největší *Paris japonica* z čeledi Melanthiaceae (1C = 152,20 pg ≈ 149 000 Mbp, 2n= 8x = 40; Pellicer *et al*., 2010). Rozpětí C-hodnot krytosemenných rostlin se spočte jako největší hodnota vydělená nejmenší, tedy jako 152,2/0,063 = 2 415,87. Zatímco pro krytosemenné rostliny je rozpětí velikosti genomu téměř 2 500 násobné, pro eukaryotickou říši se uvádí 40 000 násobek. Živočichové představují rozpětí přibližně 3 300 násobné (od 1C = 0,04 pg u vločkovce *Trichoplax adhaerens* po 1C = 133 pg u ryby *Protopterus aethiopicus*). Savci mají rozpětí pouze čtyřnásobně (Gregory, 2005).

Skutečnost, že komplexita organismu nekoreluje s velikostí genomu, se nazývá paradox C-hodnoty (Thomas, 1971). Na obrázku 1.1 je znázorněna situace pro několik hlavních skupin organizmů. Paradox přestal být paradoxem, když se zjistilo, že za variabilitou ve velikosti genomu stojí nekódující DNA. Problém se proto přejmenoval na „*C-value enigma*“ (enigma = záhada) a nyní je otázkou jak a proč se nekódující DNA tak úspěšně množí a eliminuje.

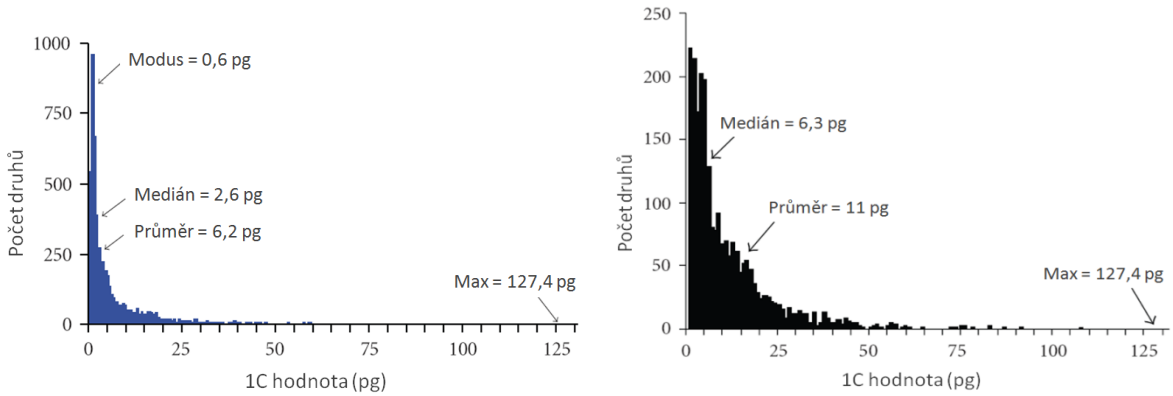


Obr. 1.1: Paradox C-hodnoty – rozpětí obsahu DNA v pg u různých organismů nekoreluje s jejich evoluční odvozeností (Gregory, 2004).

U rostlin se zjistilo, že v rámci druhu je velikost genomu zpravidla konstantní, ale mezi druhy, i v rámci rodu, se často může výrazně lišit, třeba i několikanásobně (Bennett *et al*., 2000).

Ačkoli variabilita velikosti genomu je obrovská, většina druhů má podle nadefinovaných kategorií (Soltis *et al*., 2003) malý genom (1C < 3,5 pg, obr. 1.2). Velké genomy jsou obvykle evolučně nevýhodné kvůli obtížnému zpracování velkého množství genetické informace (Knight *et al*., 2005). Toto je zajímavé vzhledem k převládajícímu názoru, že genom snáze roste, než se zmenšuje (Bennetzen *et* Kellogg, 1997; Bennett *et al*., 2000; Wendel *et al*., 2002; Bennetzen *et al*., 2005).

Z údajů C-hodnot pro 6288 druhů krytosemenných rostlin byl stanoven modus 1C = 0,6 pg a medián 1C = 2,6 pg (Leitch *et al*., 2010).



Obr. 1.2: Histogram množství DNA u 6288 krytosemenných (vlevo) a 2527 jednoděložných (vpravo) rostlin. Vyznačen je modus, medián, průměr a maximální hodnota (upraveno, Leitch *et al*, 2010).

Bylo odhaleno několik jevů související s velikostí genomu. Pozitivní korelace velikosti genomu byla zjištěna například s velikostí buňky (Beaulieu *et al*., 2008), délkou buněčného cyklu, minimální generační dobou (Bennett, 1971; Francis *et al*., 2008), hmotností semen (Beaulieu *et al*., 2007), velikostí průduchů (Hogson *et al*, 2010), mírou rekombinace (Ross-Ibarra, 2007), sklonem k extinkci

(Bennett *et* Leitch, 2000; Vinogradov, 2003), typem prostředí (Dušková *et al*., 2010) apod. Negativní korelace je známa v souvislosti s hustotou průduchů (Beaulieu *et al*., 2008), schopností speciovat (Vinogradov, 2003) a maximální rychlostí fotosyntézy (Knight *et al*., 2005). Různé výsledky byly získány při srovnávání velikosti genomu se zeměpisnou šířkou, délkou a nadmořskou výškou (shrnuto v Knight *et* Ackerly, 2002; Knight *et al*., 2005).

Vztah byl zjištěn i mezi velikostí genomu a životní formou. Efemérní druhy a jednoleté rostliny nikdy nemají velký genom. Dosud neznáme druh s životním cyklem kratším než 6 týdnů, který by neměl velmi malý genom, tzn. 1C < 1,4 pg (Bennett, 1998). Vytrvalé rostliny můžou, ale nemusí mít velký genom (Bennett, 1972). Také bylo pozorováno, že dřeviny mají menší genom než byliny (Ohri, 2005) a epifytické orchideje nikdy nemají velký genom (Leitch *et al*., 2009). Rostliny s velkým genomem se vyskytují na extrémních stanovištích jen minimálně, mají omezenou škálu ekologických podmínek, které jim vyhovují (Knight *et al*., 2005), najdeme je spíše v temperátním pásu než v tropech (Ohri, 2005) a spíše v oblastech s průměrnou teplotou a srážkami (Knight *et* Ackerly, 2002). Rody s malým genomem mají větší druhovou bohatost než příbuzné rody s velkým genomem (Knight *et al*., 2005). Rostliny s malým genomem jsou ekologicky i evolučně flexibilnější, obývají rozmanitější stanoviště, mají větší variabilitu různých znaků a snáze podléhají speciaci.

1.3 Evoluce velikosti genomu

Velikost genomu ovlivňují genetické a ekologické faktory. Mezi genetické patří polyploidie, epigenetické procesy, homogenizace a (retro)transpozice. Do ekologických faktorů je řazena například generační doba nebo růstová forma (Leitch *et* Leitch, 2012).

Evoluce velikosti genomu nevykazuje na první pohled žádný zjevný trend v souvislosti s evoluční odvozeností organismu. Například Soltis *et al*. (2003) vynesli velikost genomu na fylogenetický strom krytosemenných rostlin, kde je dynamika změn velikosti genomu názorně zobrazena. Například extrémně velký genom (> 35 pg) se objevuje pouze u zástupců dvou skupin, fylogeneticky poměrně vzdálených, a to u jednoděložných a v řádu Santalales. Malé a středně velké genomy jsou zastoupeny poměrně rovnoměrně po celém stromě.

Je dobře známo, že rostlinný genom daleko snáze roste, než se zmenšuje (Bennetzen *et* Kellogg, 1997; Bennett *et al*., 2000; Wendel *et al*., 2002; Bennetzen *et al*., 2005). Co udržuje genomy malé, není zřejmé. Podle současného modelu evoluce velikosti genomu dochází k různě rychlému nárůstu genetického materiálu (v závislosti na evoluční linii) a občasným poklesům (Leitch *et al*., 2005; Vitte *et* Panaud, 2005; Hawkins *et al*., 2009). Tyto evoluční procesy jsou způsobovány několika mechanismy, z nichž nejefektivnější je zmnožování transponovatelných elementů a polyploidizace, obojí vedoucí ke zvětšení genomu (Hawkins *et al*., 2008; Grover *et* Wendel, 2010). O mnoho méně se ví o mechanismech zmenšující velikost genomu. Patří mezi ně procesy založené na dvouvláknových

zlomech (nehomologická rekombinace a nerovnoměrná homologická rekombinace) (Devos *et al*. 2002; Vitte *et* Panaud, 2003, 2005; Vitte *et* Bennetzen, 2006; Grover, 2008).

1.3.1 Polyploidie

Nejsnazší způsob jak rychle a efektivně zvětšit velikost genomu je polyploidie. Rostliny se s polyploidií vyrovnávají velice dobře. Výskyt se předpokládá u většiny krytosemenných rostlin (Leitch *et* Bennett, 1997). Dokonce se spekuluje, že všechny rostliny (i ty, co jsou dnes považovány za diploidní) pravděpodobně v minulosti prošly polyploidní událostí, a že jedinou výjimkou by mohla být *Amborella*, u které se žádné známky duplikace genomu nenašly. U všech ostatních zkoumaných rostlin je důvod se domnívat, že paleopolyploidizaci podstoupily (Cui *et al*., 2006; Soltis *et al*., 2009).

K polyploidním událostem nejčastěji dochází poruchami při meióze. Chromozómová sada, která by se měla rozdělit do dvou buněk, zůstane v jedné (2n gamety). Poruchy při prvním i při druhém meiotickém dělení mají podobné následky. Liší se v poměru vyprodukovaných normálních haploidních a mutantních diploidních gamet. Splýváním haploidních a diploidních nebo dvou diploidních gamet vznikají v přírodě různě ploidní jedinci, kteří jsou často neplodní, protože se potýkají s potížemi při párování homologních chromozómů.

Zjistilo se, že polyploidizace má kromě zvětšení holoploidní velikosti genomu (C-hodnota) i vliv na monoploidní velikost genomu (C_x-hodnota). Množství DNA základní sady chromozómů (C_x) má s rostoucí ploidií tendenci klesat (Leitch *et* Bennett, 2004). Tedy výsledná velikost genomu allopolyploida je menší než součet C-hodnot rodičů, což znamená, že po polyploidní události dochází k redukci velikosti genomu. A navíc čím vyšší je ploidie, tím menší je monoploidní velikost genomu. Leitch *et* Bennett (2004) při této studii využili již výše zmíněnou databázi „Angiosperm DNA C-values database“ a závěry vycházely z analýzy více než dvou tisíc diploidních a 800 polyploidních jedinců.

1.3.2 Chromozómové přestavby

Nezanedbatelnou roli ve změnách velikosti genomu a počtu chromozómů hrají chromozómové přestavby.

DNA je uspořádaná do chromozómů, jejichž počet se u rostlin pohybuje od 2n = 4 po 2n = 1440 (Harrison *et* Schwarzacher, 2011; Khandelwal, 1990). Čtyři chromozómy v diploidním stavu má například *Viola modesta* (Erben, 1996), *Haplopappus gracilis* z čeledi Asteraceae (Tanaka *et* Terasaka, 1972), *Zingeria biebersteiniana* z čeledi Poaceae (Bennett *et al*., 1986), nebo *Rhynchospora tenuis* z čeledi Cyperaceae (Vanzela *et al*., 2000). Největší počet chromozómů se udává 2n = 1440 u kapradiny *Ophioglossum reticulatum* (Khandelwal, 1990) a u kvetoucích rostlin byl zjištěn počet 2n = 640 u *Sedum suaveolens* (Uhl, 1978).

Poměrně překvapivě mezi počtem chromozómů a velikostí genomu neexistuje přímá souvislost. Příčinou je vysoká variabilita ve velikosti chromozómů. Příklad 440 Mbp genomu rýže je

rozděleno do 12 chromozómů, zatímco na 4900 Mbp ječmene stačí pouze sedm chromozómů (Kellogg *et* Bennetzen, 2004).

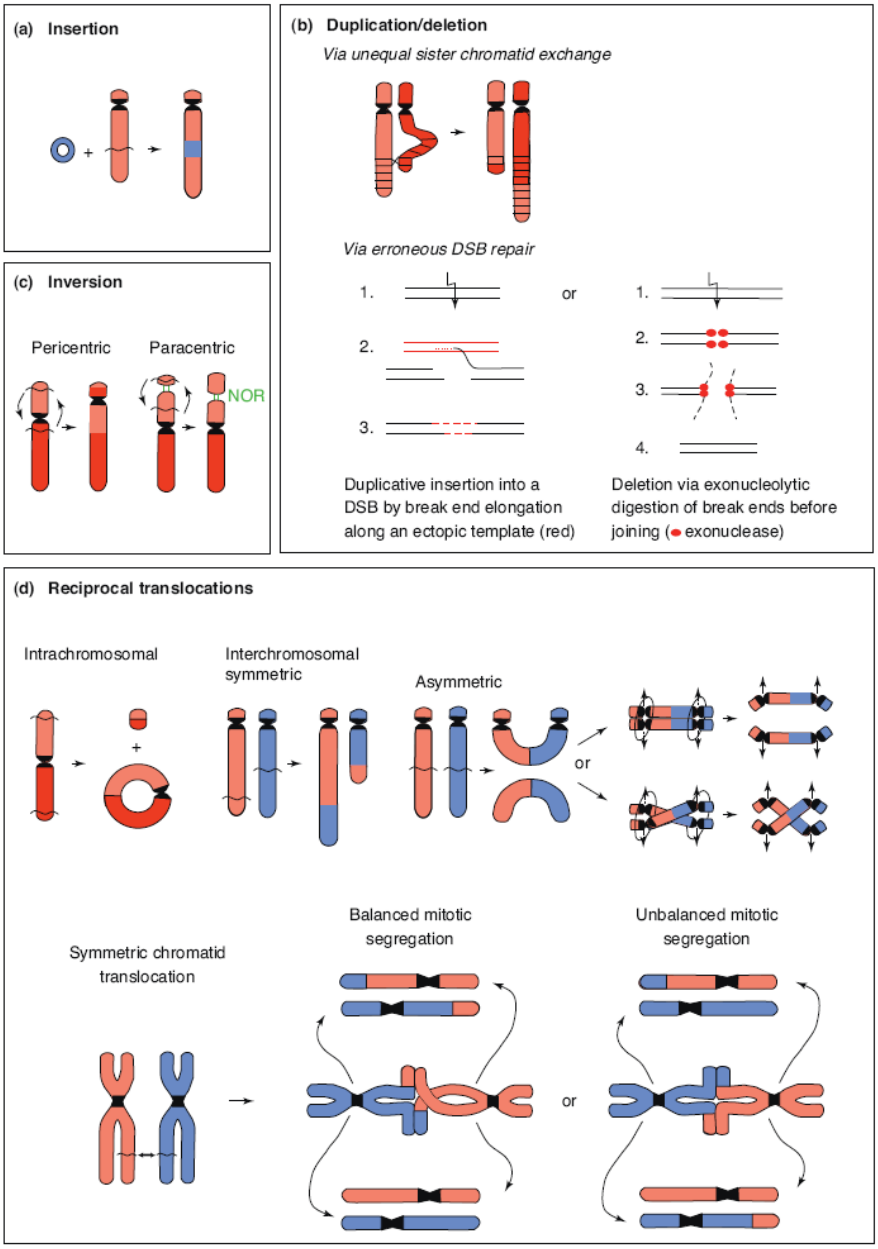
Počty chromozómů můžou být v rámci rodů stejné, ale mohou být i velice variabilní jako například u rodu *Pelargonium* (Weng *et al*., 2012) nebo v čeledi Asteraceae, kde jsou základními chromozómovými čísly celé série čísel (Jones, 1985).

Podle moderních výzkumů pravděpodobně v evoluci opakovaně dochází k polyploidizaci (paleoploidizace) následované diploidizací. Diploidizace je proces, kdy se allopolyploidní taxony musí vyrovnat s nadbytečnými kopiemi genů a zajistit si funkční genom (Ma *et* Gustavson, 2005). Neznamená to zbavit se nové sady chromozómů, nýbrž nový genetický materiál přeuspořádat a stabilizovat do funkční formy. Hlavními procesy účastnící se diploidizace jsou eliminace sekvencí a chromozómové přestavby. Z pohledu nadbytečných genů jsou tři hlavní způsoby jak s nimi naložit. První je ztráta funkce, druhá je redukce exprese na původní úroveň a třetí je získání nové, výhodné funkce. Ztráta funkce může být způsobena bodovými mutacemi, inzercemi, delecemi nebo epigenetickými procesy (DNA metylace, deacetylace histonů, strukturní přestavba chromatinu) (Ma *et* Gustavson, 2005).

Obrovský průlom ve studiu chromozómových přestaveb umožnila metoda chromozómového barvení CCP (*comparative chromosome painting*, srovnávací barvení chromozómů). Rozlišují se **primární přestavby** (obr. 1.3, což jsou výsledky ilegitimní rekombinace – inzerce, delece, duplikace, inverze, reciproká translokace) a **sekundární přestavby** (u původního karyotypu dojde k translokacím případně i inverzím, poté při meiotickém párování dojde ke crossing-overu, čímž vzniknou nové karyotypy nebo znovu sestavený původní karyotyp) (Schubert, 2007; Schubert *et* Lysák, 2011).

Mezi balancované chromozómové přestavby patří inverze a translokace. Daleko závažnější dopady na organismus mají nebalancované změny, jako jsou delece a inzerce, při kterých dochází ke změně dóze genů.

Chromozómové přestavby mohou být příčinou změny počtu chromozómů (= dysploidie). Způsoby dysploidie jsou 1) fúze chromozómů (ve smyslu reciproké translokace, protože fúze ve smyslu připojení telomery na zlom nebo na telomeru je velice nepravděpodobný) a následná inaktivace jedné centromery 2) nerovnoměrná reciproká translokace 3) centrická fúze 4) komplikace při meiose, kdy homologní chromozómy jdou spolu k jednomu pólu (Guerra, 2008; Schubert *et* Lysák, 2011).

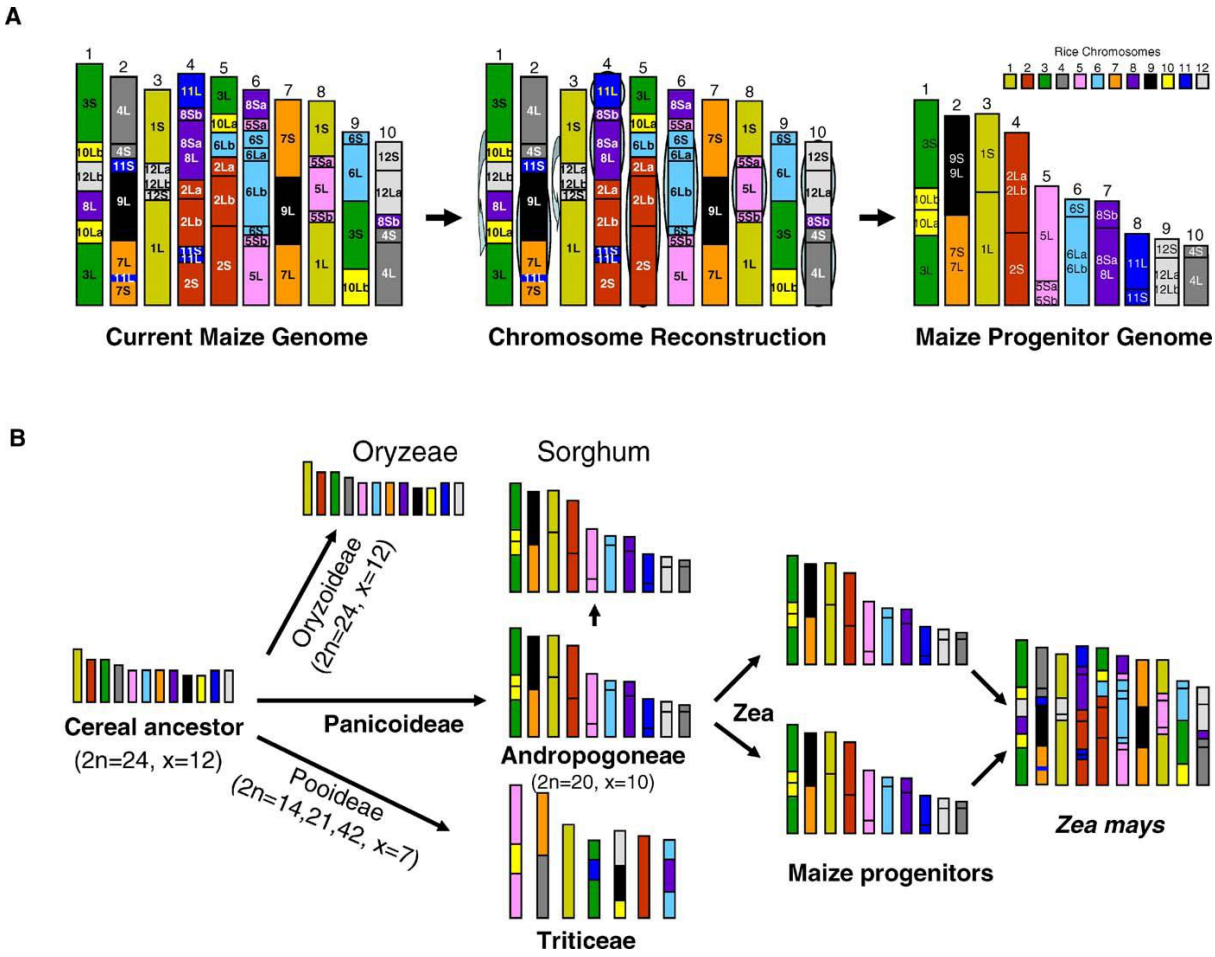


Obr 1.3: Primární chromozómové přestavby: (a) inzerce mimochromozómové kruhové DNA, (b) typy delece a duplikace, (c) typy inverze, (d) typy reciprokých translokací, (Schubert *et* Lysák, 2011).

Dvouvláknové zlomy (DSB - *double-strand break*) jsou hlavní příčinou chromozómových přestaveb. Pro buňku jsou přirozené, protože jsou nezbytné například pro rekombinaci. Nejčastěji vznikají při replikaci, zvláště pak při replikaci repetitivních úseků DNA. V ideálním případě se tyto zlomy podaří opravit pomocí homologní rekombinace, kdy je sesterská chromatida použita jako předloha pro opravu. Častěji ale dojde k ilegitimní (nehomologní) rekombinaci, kdy se na zlom napojí jiný „volný“ konec dvouvláknové DNA (Schubert *et* Lysák, 2011).

Ukázka evoluce karyotypu a konzervace chromozómových přestaveb je vyjádřená na obrázku č. 2.3. Tisíc bazí genomu rýže v kolineárních oblastech odpovídá 3200 bazím kukuřice. Je známo, že kukuřice má přibližně šestinásobně větší genom než rýže. Většina úseků z rýže koresponduje s dvěma

úseky z kukuřice. To znamená, že po evolučním oddělení rýže a kukuřice došlo v linii s kukuřicí k polyploidní události (Wei *et al*., 2007).



Obr. 1.4: Chromozómové přestavby vedoucí ke změnám počtů chromozómů u obilnin. Pomocí barevně kódovaných oblastí chromozómů rýže byly zrekonstruovány genomy kukuřice a jejího předka (A) a dalších obilnin (B), (Wei *et al*., 2007),

1.3.3 Studium evoluce velikosti genomu

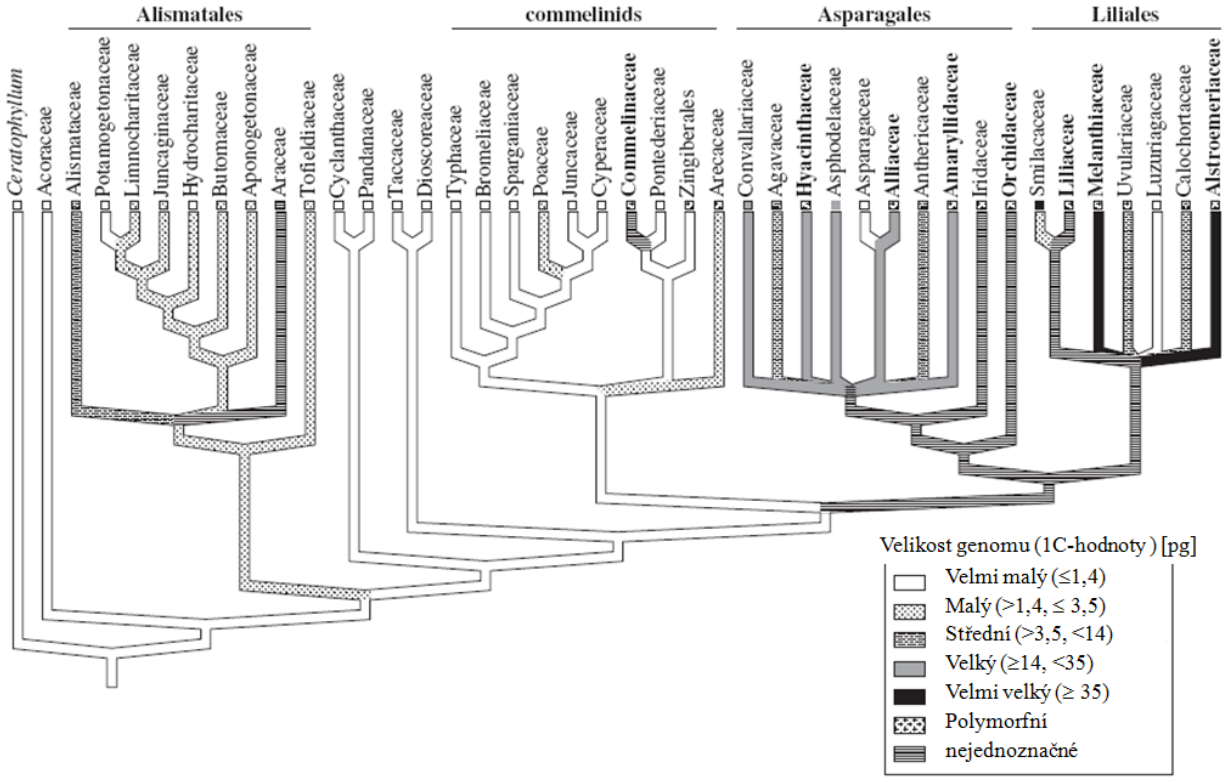
Mnoho autorů vyvozovalo závěry o charakteru evoluce pozorováním vynesených velikostí genomu vedle fylogenetického stromu (Cox *et al*., 1998; Wendel, 2002; Jacob *et al*., 2004; Price *et al*., 2005; Chase *et al*., 2005; Leitch *et al*., 2005, 2009; Kaur *et al*., 2012). Brzy přišla potřeba určit a prokázat charakter evoluce statistickými metodami, což provází mnoho omezení a komplikací (kapitola 1.3.3.1).

Při studiu evoluce velikosti genomu je zásadní otázkou, jakou velikost genomu do statistických výpočtů použít. Nejvhodnější je C_x-hodnota, která není zkreslená polyploidií a nejlépe tak vysvětluje charakter evoluce genomu. Pokud polyploidie přítomna není, C-hodnota dá stejné výsledky. Pokud se používá C-hodnota a polyploidie se ve zkoumané skupině vyskytuje, je nutné získané výsledky správně interpretovat. Výsledky pak vypovídají o evoluci jak růstu a zmenšování velikosti genomu, tak

(a to hlavně) intenzitě polyploidizace. Z různých důvodů s C-hodnotou pracovali např. Weiss-Schneeweiss *et al*. (2006) u rodu *Orobanche*, Lysák *et al*. (2009) u čeledi Brassicaceae, Chrtek *et al.* (2009) u rodu *Hieracium*, Gurushidze *et al*. (2012) u rodu *Allium*.

Různé studie evoluce velikosti genomu ve fylogenetickém kontextu došly k různým výsledkům. Nedávno byl specifikován charakter evoluce velikosti genomu u jednoděložných jako spíše plynulý než skokový, s převahou změn v krátkých větvích, což znamená, že na delších větvích změny probíhají pomaleji a s většinou změn orientovaných do počátečních stadií evoluce (Leitch *et al*., 2010). Tento rychlejší vývoj v raných fázích diferenciace je v souladu s evolucí velikosti genomu pozorované u zárazy *Orobanche* (Weiss-Schneeweiss *et al*., 2006) a naopak je jiný než v čeledi Liliaceae (Leitch *et al*., 2007), kde došlo k rychlé radiaci velikosti genomu v evolučně mladých skupinách. Pro eukaryota bylo zjištěno, že evoluce velikosti genomu je úměrná velikosti genomu, tedy že u organismů s velkými genomy je přítomen trend ve zrychlování růstu velikosti genomu (Oliver *et al*., 2007).

Velikost genomu předka jednoděložných rostlin byla odhadnuta na 1C = 1,9 pg (Leitch *et al*., 2010). Na obrázku 1.5 je graficky znázorněn vývoj velikosti genomu u jednoděložných rostlin (Leitch *et al*., 2005).



Obr. 1.5: Graficky znázorněný vývoj velikosti genomu na fylogenetickém stromě jednoděložných rostlin (Leitch *et al*., 2005).

V několika případech byl pozorován zřetelný trend v evoluci velikosti genomu, například zmenšování genomu v odvozených taxonech u *Festuca* (Šmarda *et al*., 2008), *Allium* (Ricroch *et al*., 2005) nebo zvětšení genomu v odvozených skupinách u Liliaceae (Leitch *et al*., 2007). Velmi často je

pozorována alespoň podobná velikost genomu v rámci jednotlivých fylogenetických skupin, což bylo pozorováno například u rodu *Lactuca* (Doležalová *et al*., 2002), *Lupinus* (Naganowska *et al*., 2003), *Sorghum* (Price *et al*., 2005), *Hieracium* (Chrtek *et al*., 2009), *Lasiocephalus* (Dušková *et al*., 2010), *Echinops* (Sánchez-Jiménez *et al*., 2012) a čeledi Orchidaceae (Leitch *et al*., 2009). U mnoha studií se trend v evoluci velikosti genomu neprokázal, ale byly nalezeny korelace s jinými faktory. Mezi takové patří například *Gossypium* (Wendel *et al*., 2002), Brassicaceae (Lysák *et al*., 2009), Oncidiinae (Orchidaceae) (Chase *et al*., 2005), *Orobanche* (Weiss-Schneeweiss *et al*., 2006) nebo *Veronica* (Albach *et* Greilhuber, 2004). V tabulce 1.1 jsou shrnuty charakteristiky a výsledky vybraných studií evoluce velikosti genomu ve fylogenetickém kontextu.

Tab. 1.1: Srovnání některých charakteristik několika vybraných studií. Uvedeny jsou minimální a maximální 1C-hodnota, rozpětí (= max1C/min1C), sekvence použité pro tvorbu stromu, počet zkoumaných objektů (#), přítomnost polyploidie, počet chromozómů, způsob vyhodnocení a trend ve změně velikosti genomu (šedý text). →

	zdroj	min 1C (pg)	max 1C (pg)	Roz pětí	úsek DNA	#	polyploidie	2n	způsob vyhodnocení
Cypripedioiidae	Cox *et al* ., 1998	**6,10**	**34,53**	5,7	--	27	✓	nejčastěji 26, 18 až 42	Pozorování
	Dochází k fragmentaci chromozómů, při které se velikost genomu nemění								
Gossipieae	Wendel *et al* ., 2002	**0,60**	**4,10**	7	CesA1	13	1 druh	20, 22, 24, 26 .42	Pozorování
	Vzhledem k fylogenetickému stromu se velikost genomu 4x zmenšila a 3x zvětšila								
Lupinus	Naganowska *et al* ., 2003	**0,49**	**1,22**	2,5	ITS, rbcL	18	✓	32, 36, 38, 40, 42, 48, 50, 52	Rozdíly mezi fylog. skupinami - ANOVA
	Příbuzné druhy podobně velký genom, jedna ze 4 fylogen. skupin má výrazně větší genom								
Veronica	Albach *et* Greilhuber, 2004	**0,32**	**2,26**	7,1	trnL-F	49	✓	12 až 64	BayesTraits, Independent contrast - CAIC (R)
	Cx-hodnoty neukázali souvislost s fylogenezí, ale 1C ano (lambda = 0,99), změny dříve v evoluci, skokový charakter,větší genom u trvalek (ale jen 1C ne cx) a horských druhů								
Oncidiinae	Chase *et al* ., 2005	**1,70**	**4,65**	2,7	--	54	✓	nejčastěji 28, ale 18 až 42	Pozorování
	Ve většině fylogenetických skupin došlo k redukci velikosti genomu, počet chromozómů nekoreluje s velikostí genomu, menší genom u epifytů a jednoletek								
Sorghum	Price *et al* ., 2005	**0,64**	**5,15**	8,1	ITS, ndhF	21	✓	10, 20, 30, 40	Pozorování
	Velikost genomu nekoreluje s počtem chromozómů, jedna ze dvou hlavních fylogen. skupin má výrazně menší Cx-hodnoty, menší genom (pouze 2C) u jednoletek								
Allium	Ricroch *et al* ., 2005	**7,00**	**31,50**	3,3	ITS	43	✓	14, 16, 32	Mesquite
	Genom se celkově zmenšuje, tetraploidní druhy mají menší genom (Cx) než diploidní								
Orobanche	Weiss-Schneeweiss *et al.* , 2006	**1,45**	**9,95**	6,9	ITS	76	✓	24,38,48,76,114	BayesTraits
	Fylogeneze souvisí s velikostí genomu, změny jsou skokové (nezávislé na délce větví), vývoje rychlejší v ranných stádiích evoluce, není přítomen obecný trend růstu ani poklesu								
Liliaceae	Leitch *et al* ., 2007	**3,40**	**87,20**	26	--	78	✓	16, 24, 36	AOT modul ve PHYLOCOMu, BayesTraits
	Fylogeneze má vliv, změny probíhaly evolučně nedávno a spíš skokově než plynule, předek měl malý genom ačkoli většina druhů ma velký genom, analyzováno 1C i 1Cx								
Festuca	Šmarda *et al* ., 2008	**1,94**	**4,89**	2,5	ITS, trnL-F	115	✓	14 až 70	Porovnávání Cx a C/n - t-test, faktorová ANOVA
	Došlo k expanzi genomu u bazálních skupin a následné redukci u odvozených taxonů.								
Orchidaceae	Leitch *et al* ., 2009	**0,33**	**55,40**	168	--	327	✓	18 až 170	Pozorování
	Fylogeneze souvisí s velikostí genomu, změny jsou skokové (nezávislé na délce větví), vývoje rychlejší v ranných stádiích evoluce, není přítomen obecný trend růstu ani poklesu								
Hieracium	Chrtek *et al* ., 2009	**3,52**	**8,34**	2,4	ETS	215	✓	18, 27, 36	BayesTraits
	Rozdíly u východních a západních druhů, které jsou zároveň fylogenetiky podpořenými skupinami, redukce Cx po polyploidní události, kappa > 1 => dlouhé větvě přispívají více.								
Brassicaceae	Lysák *et al.* , 2009	**0,16**	**2, 43**	16	matK, chs, adh, trnLF, ITS	185	✓	8 až 56	BayesTraits, t-testy
	Zmenšení genomu nastalo u 52 % druhů a nárůstu u zbylých 48 %, povaha změn je pozvolná a závislá na délce větví, změny probíhají rychleji na dlouhých větvích								
Lasiocephalus	Dušková *et al* ., 2010	**6,91**	**11,35**	1,7	ITS	20	✓	40, 60	Rozdíly mezi fylog. skupinami skupiny - Mann-Whitney test, Kruscal-Wallis test (Statistika
	Různá velikost genomu u dvou hlavních fylogen. skupin, větší genom u lián								
Echinops	Sánchez-Jiménez *et al.* , 2012	**3,26**	**4,69**	1,4	ITS, trnL-F	24	×	28, 30, 32	PGLS = phylogenetically based generalised least squares, Phylogr (R)
	Průměrná velikost chromozómu roste s klesajícím počtem, jedna ze dvou hlavních fylogen. skupin má výrazně menší a variabilnější velikost genomu								
Allium	Gurushidze *et al* ., 2012	**13,13**	**36,37**	2,8	ITS	160	✓	16, (18, 20), 32	BayesTraits
	Velikost genomu je v souladu s fylogeneticky rozpoznanými skupinami, bazální skupina má menší genom, jádrová skupina má genom vetší, variabilita zřejmě vznikla v odvozenejších skupinách, charakter evoluce je skokový (ne pozvolný)								
Pelargonium	Weng *et al* ., 2012	**0,32**	**2,54**	8	rbcL, matK, ndhF, rpoC1, trnL-F, nad5	58	✓	16 - 88, série šesti zákl. chrom. č.	geiger (R)
	Velikost genomu není závislá na fylogenezi, koreluje s velikostí chromozomů, ale ne s počtem, docházelo tedy spíše k fúzím a rozpadům chromozómů než k duplikacím a delecím.								

1.3.3.1 Statistická analýza velikosti genomu

Pro vyhodnocení charakteru evoluce velikosti genomu je potřeba porovnat kvantitativní proměnnou s topologií stromu, což vyžaduje speciální statistické zpracování. Existuje několik softwarů, které toto umožňují. Patří mezi ně například **BayesTraits** [Pagel *et al*., 2004, součástí tohoto balíku je Continuous (Pagel, 2004)], **Mesquite** (Maddison *et* Maddison, 2007), balíky **caper** (Orme, 2012), **geiger** (Harmon *et al*. 2008) a **ape** (Paradis, 2004) do statistického programu R (R Development Core Team., 2011) a **Phylocom** (Webb *et al*., 2008) s modulem AOT (Ackerly, 2006). Snadné návody na práci s některými z těchto programů jsou dostupné na internetové stránce *The AnthroTree Website* nebo v knize *The Comparative Method in Evolutionary Anthropology and Biology* obojí od britského odborníka na primáty Charlese Nunna (http://nunn.rc.fas.harvard.edu/groups/pica/; Nunn, 2011).

Statistické metody obvykle předpokládají nezávislost objektů, což v případě fylogenetické příbuznosti splněno není. Jedním ze způsobů, jak fylogenetický signál odhalit, je použít metodu zobecněných nejmenších čtverců (*generalized least squares* = GLS; Felsenstein, 1985) nebo na této metodě založený výpočet fylogeneticky nezávislých kontrastů (*phylogenetically independent kontrast).* Pokud vliv fylogeneze ošetřen není, dochází k neefektivním odhadům evolučních parametrů, snižuje se pravděpodobnost, že budou vztahy odhaleny a jsou nadhodnoceny stupně volnosti, čímž dochází k chybě prvního druhu (test odmítne pravdivou nulovou hypotézu). Metoda fylogeneticky nezávislých kontrastů se od GLS liší tím, že nepracuje s transformacemi délek větví a neumožňuje odhadovat další parametry popisující charakter evoluce (Orme, 2012).

Parametry charakterizující evoluci proměnné jsou tři: λ (lambda), κ (kappa) a δ (delta) (Pagel, 1997, 2004). Pro vyjádření vlivu fylogeneze (v tomto případě na velikost genomu) se používá parametr nazvaný **lambda** (**λ**). Lambda odhaduje, zda jsou taxony při dané fylogenezi a hodnotách proměnné nezávislé. Lambda = 1 znamená, že se proměnná vyvíjela v souladu s danou topologií a zvoleným modelem, tudíž topologie hraje významnou roli. Lambda = 0 odpovídá stromu ve tvaru hvězdy, tedy nezávislosti taxonů. Existují ještě další dva parametry (kappa a delta) vyjadřující charakter a tempo evoluce na základě délky a uspořádání větví. Parametr **kappa** (**κ**) zkoumá vliv délky větví, čímž lze rozlišit významný či nevýznamný vliv délky větví na charakter evoluce dané proměnné (gradualismus změn). Kappa >1 znamená, že delší větvě se podílí na charakteru evoluce výrazněji než krátké. Naopak více změn na kratších větvích převažuje, pokud kappa <1. Kappa = 0 znamená, že charakter evoluce je nezávislý na délce větví a nazývá se punktualistický (tj. teorie přerušovaných změn, skokový). Je-li kappa přibližně jedna, charakter evoluce je gradualistický (pozvolný, plynulý). Parametr **delta** (**δ**) proměřuje vzdálenosti taxonů od kořene a udává, zda se evoluce proměnné zrychlila či zpomalila vzhledem k topologii daného stromu. Delta <1 značí adaptivní radiaci (rychlou počáteční evoluci následovanou pomalejšími změnami). Naopak delta >1 říká, že delší cesty přispívají

k evoluci výrazněji, což vypovídá o víceméně konstantním množství změn za určitý čas a adaptaci (druhově specifické evoluci) jednotlivých taxonů. Delta = 0 není definováno (Pagel, 1999, 2004). Defaultně jsou tyto tři parametry nastaveny jako 1. Pokud se liší od jedné, evoluce studovaného znaku neodpovídá topologii stromu nebo délce větví. Přehledná interpretace parametrů je v tabulce 4.1 v kapitole 4.3.3 Pro odhad těchto parametrů se využívá technik založených na maximální věrohodnosti (ML) nebo na Bayesovském principu (MCMC). Druhá metoda umožňuje prohledávat i více stromů zároveň a obsáhnout tak i jisté nespolehlivosti v rekonstrukci fylogeneze.

Většiny zmíněných softwarů umožňuje odhadování ancestrálního stavu znaku. Pro výpočet se používá například metoda zobecněných nejmenších čtverců (GLS - *generalized least squares*), parsimonie (*squared-change parsimony*, Maddison, 1991) nebo maximální věrohodnost (Maximum likelihood). *Squared-change* parsimonie rekonstruuje evoluci tak, aby došlo k co nejméně změnám (přesněji hledá nejmenší hodnotu součtu čtverců změn) a to buď s ohledem na délku větví (*weighted*) nebo bez (*unweighted*) (např. Mesquite). Maximální věrohodnost hledá nejpravděpodobnější evoluci (např. BayesTraits, caper, ape, Mesquite). Mimo výše zmíněné softwary existuje ještě například Compare (Martins, 2004). Hodnota odhadující původní velikost znaku (tedy hodnotu v kořeni studovaného zakořeněného stromu) se někdy označuje jako alfa (např. BayesTraits).

Software BayesTraits umožňuje analyzovat charakter evoluce pod dvěma modely nazvanými model A (náhodný, *random walk*) a model B (usměrněný, *directional random walk*). Druhý model má dva parametry, prvním je rozptyl a druhým je směr změny (v modelu A je roven nule). Druhý parametr měří regresi zkoumané proměnné vůči celkové délce cesty od kořene stromu ke koncové větvi a určí tak, zda má proměnná tendenci se v celkovém rámci zmenšovat nebo zvětšovat. Pro model B je nutné použít stromy s uloženými délkami větví (Pagel, 1997, 1999, 2004; Nunn, 2011). Pokud je ve zvoleném souboru dat při dané fylogenezi přítomný obecný trend (v tomto případě pokles či nárůst velikosti genomu) vyjde model B signifikantně lépe než model A.

K testování hypotéz lze použít test porovnávající pravděpodobnosti modelů (LRT, *Likelihood ratio test*), který má v tomto případě (kdy H_1 je speciální případ H_0) přibližně stejné rozdělení jako χ^2 (chí kvadrát) s počtem stupňů volnosti rovnému rozdílu počtu parametrů testovaných modelů. Počet stupňů volnosti je obvykle 1, protože při nulové hypotéze H_0 jsou všechny parametry nastaveny na defaultní hodnoty a při alternativní hypotéze H_1 se nechá jeden z parametrů odhadnout. Z χ^2 se pak určí, zda je pravděpodobnostní hodnota signifikantní či nikoli. LRT se spočte jako LR = 2[log-likelihood(lepší model) – log-likelihood(horší model)]. Pravděpodobnost modelů lze zjistit například Markov chain Monte Carlo (*mcmc*) metodu nebo maximum likelihood (ML) metodu. Obdobou *Likelihood ratio* testu je Bayesův faktor, který se liší v tom, že neporovnává maximální věrohodnost, ale marginální věrohodnosti. Marginální věrohodnost lze aproximovat harmonickým průměrem věrohodností za jednotlivé generace počítané *mcmc* metodou. Bayesův faktor se spočítá jako BF = 2[log[harmonický průměr (lepší model)] – log[harmonický průměr (horší model)]]. Srovnáním

zlogaritmovaných pravděpodobností jsou testovány hypotézy o charakteru evoluce a ancestrálním stavu. Testuje se model A proti modelu B, odhady parametrů lambda, kappa a delta proti modelům, kdy jsou tyto parametry nastaveny na 1 (případně na nula).

Jednotlivé softwary se liší v požadavku na vstupní data. Často bývá vyžadován strom bez polytomií s uloženou délkou větví (BayesTraits). Tyto dva požadavky nejsou potřeba např. v programu Phylocom nebo caper (doplněk do R).

Evoluci velikosti genomu pro statistické zpracování je vhodnější uvažovat jako proporční změnu znaku, čehož se dosáhne logaritmickou transformací dat. Tím se totiž zamezí případům, kdy by například jedinec s 1C = 0,5 pg měl stejnou pravděpodobnost, aby mu jeden pg přibyl i ubyl, což by nedávalo smysl, protože nemůže mít zápornou velikost genomu (O'Meara *et al*., 2006; Oliver *et al.,* 2007).

1.4 Rekonstrukce fylogeneze

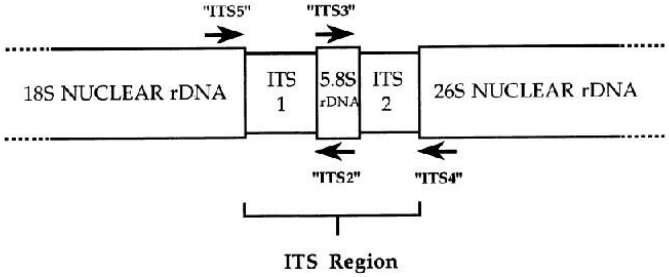
Fylogeneze se snaží najít pořadí větvení taxonů (kladogenezi) a průběh vzniku evolučních novinek (anagenezi) a toto graficky znázornit jako fylogenetický strom. Ke konstrukci fylogenetických stromů jsou využívány dva druhy metod. První je rekonstrukce na základě znakových (kvalitativních) dat (typicky DNA sekvence). Do této skupiny patří např. metoda maximální parsimonie a maximální věrohodnosti. Druhou metodou je rekonstrukce založená na distančních (kvantitativních) datech (matice vzdáleností – lze spočítat i na základě DNA sekvence, ale obvykle se používá na morfologické znaky). Sem patří například shluková analýza, ordinační metody a diskriminační analýza.

V této kapitole jsou shrnuty základní informace o vybraných úsecích DNA a fylogenetických metodách použitých v této práci.

1.4.1 Vybrané úseky DNA

Prvním byl zvolen úsek *mat*K (gen kódující enzym *maturasu*). Tento úsek je dlouhý přibližně 1500 bp a je součástí chloroplastové DNA. Chloroplastová DNA (cpDNA) je kruhová molekula o délce asi 70-230 kbp, nesoucí okolo 120 genů, která se v chloroplastu vyskytuje v několika desítkách kopií. Tato DNA je haploidní a většinou se dědí po mateřské linii. Další zásadní vlastností je, že cpDNA nerekombinuje. Fixace alel je v chloroplastu rychlejší (právě díky haploidii), proto je na vnitrodruhové úrovni poměrně málo variabilní. Ve fylogenetických studiích allopolyploidních komplexů vypovídá cpDNA o příbuznosti pouze s jedním rodičem (typicky matkou) a navíc se ani neodhalí, že k případné hybridizaci došlo. Kódující úseky jsou vhodné pro studium na úrovni čeledí, ale intergenové oblasti jsou vhodné i pro mezidruhové analýzy (Krak, 2011). Výhody oblasti *mat*K pro rekonstrukci fylogeneze shrnuje Shaw *et al*. (2005).

Druhým úsekem je ITS (*internal transcribed spacer*), který je součástí ribozomální jaderné DNA a uplatňuje se při formování ribozómových podjednotek. Ribozomální jaderná DNA (nrDNA) je v genomu v několika stovkách až tisících kopií v několika lokusech. Základní stavební jednotka nrDNA je úsek ITS nesoucí geny pro ribozomální DNA (obr. 1.6). Ribozomální DNA se na potomstvo přenáší biparentálně, tedy potomek nese kopie obou rodičů, které se mohou lišit, což komplikuje fylogenetické analýzy. Nicméně je známo, že tyto kopie se v rámci jedince postupem času homogenizují do jedné sekvence. Tento jev se nazývá koncertovaná evoluce (Elder *et* Turner, 1995). U hybridních taxonů, kde ještě nedošlo k úplné homogenizaci tohoto úseku je možné (např. pomocí rozklonování) zjistit obě rodičovské varianty sekvence a tím tvořit hypotézy o možných rodičích. Vzhledem k variabilitě tohoto úseku je ITS vhodný především pro studium na mezidruhové a mezirodové úrovni (Krak, 2011).



Obr. 1.6 : Schéma ITS úseku. (Krak, 2011)

Z dosavadních vědeckých poznatků vyplývá, že oblasti ITS a *matK* vystihují evoluci poměrně dobře (Alvarez *et* Wendel, 2003; Shaw *et al*., 2005). Ale ať už se pro rekonstrukci fylogeneze vybere jakýkoli úsek DNA je potřeba mít na paměti, že získaný strom zobrazuje pouze jednu z možných evolucí zkoumaného úseku DNA (tzv. *gene tree*), nikoli skutečnou evoluci druhů (tzv. *species tree*).

1.4.2 Bayesovská analýza

Tato metoda je založená na výpočtu posteriorní pravděpodobnosti topologie stromu za podmínky, že máme danou matici sekvencí (tzv. *multiple alignment*). Bayesův teorém (Ronquist *et al.*, 2009) říká, že podmíněnou pravděpodobnost lze vypočítat z obrácené podmíněné pravděpodobnosti, na čemž je celá metoda založená. Tedy, že pravděpodobnost topologie stromu za předpokladu použití našich dat ze sekvencí [P(topologie|data)] lze vypočítat pomocí pravděpodobnosti našich sekvenčních dat za předpokladu, že platí vybraná topologie [P(data|topologie)]. Informace je založená na posteriorní pravděpodobnosti, která se na výsledném stromu používá podobně jako bootstrapová hodnota, ačkoli její hodnoty jsou obvykle o něco vyšší.

Vzhledem k velkému počtu možných topologií je třeba vybrat vhodný způsob hledání stromů s nejvyšší posteriorní pravděpodobností. Takovou metodou je Markov chain Monte Carlo (MCMC).

Pro fylogenetické analýzy je vhodná varianta MCMCMC (Metropolis coupling Markov chain Monte Carlo), která kombinuje několik Markovových řetězců. Hledání nejlepší topologie stromu lze přirovnat k hledání nejvyššího kopce, který představuje nejvyšší posteriorní pravděpodobnost, v „krajině" s mnoha různě hlubokými údolími a různě vysokými kopci. Obvykle se prvních 25 % nalezených stromů do analýzy nezahrnuje (tzv. *burn-in*), protože analýza začne s náhodným stromem, který se velmi rychle zkvalitňuje.

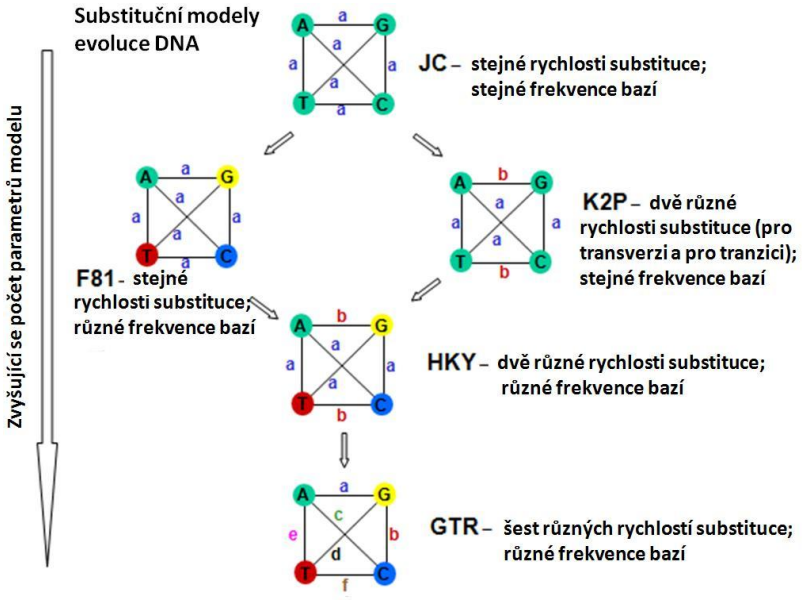
Nejdůležitější hodnotou, kterou je možno při analýze sledovat je „*average standard deviation of split frequences*" (Ronquist *et al*., 2009). Tato hodnota říká, nakolik si jsou dvě zároveň běžící analýzy podobné, čím je menší tím dostáváme pravděpodobnější topologie stromů. Přijatelné jsou hodnoty < 0,05, ale ideální jsou < 0,01 (Ronquist *et al*., 2009).

1.4.3 Maximální parsimonie

Maximální parsimonie je metoda, při které je hledán nejkratší strom ve smyslu nejmenšího počtu změn stavů znaků. Pro více než cca 11 taxonů lze vyzkoušet všechny možné topologie, ale pro více taxonů je to časově extrémně náročné a je potřeba hledání stromů nějak optimalizovat (například postupným přidáváním taxonů nebo výměnami větví). Takové způsoby se nazývají heuristické a jsou běžnou součástí softwarů (např. PAUP). Kluge a Farris (1969) zavedli konzistenční index (*consistency index*, CI) jako měřítko toho, do jaké míry topologie stromu odpovídá informaci obsažené v matici dat. Ti samí autoři zavedli i retenční index (*retention index*, RI) jako měřítko množství synapomorfií, které se zachovají na stromě.

1.4.4 Maximum likelihood

Při této metodě se hledají nejvěrohodnější topologie stromů. Věrohodnost evolučního stromu (*L*) je pravděpodobnost, že se vyvinou pozorované sekvence DNA při dané topologii stromu a při daném evolučním modelu. Cílem metody největší věrohodnosti je najít strom s co největší hodnotou *L*. U této metody je zcela zásadní vybrat správný model evoluce DNA (obr. 1.7), který nejlépe odpovídá zkoumanému souboru dat. Nejlepší substituční model je možné zjistit například v programu Modeltest (Posada *et* Crandall, 1998).



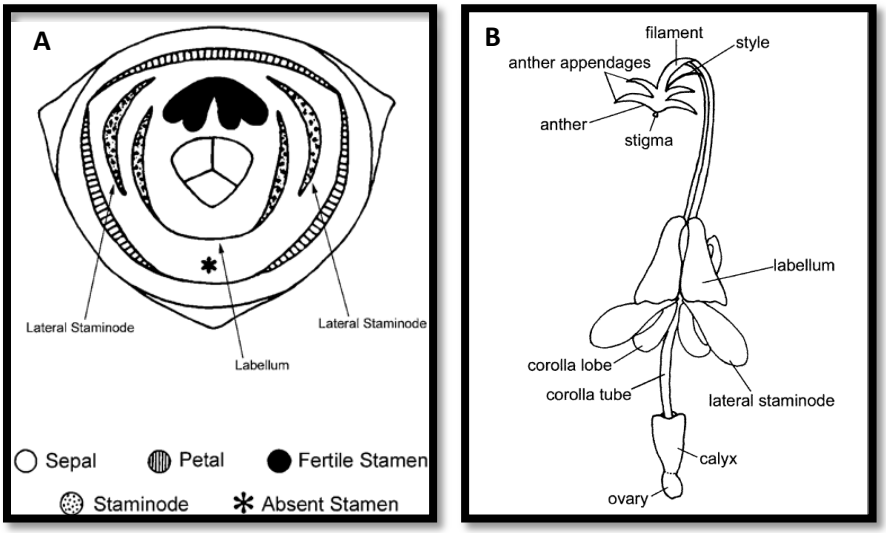
Obr 1.7: Základní substituční modely evoluce DNA. JC = Jukes-Cantor, F81 = Felsenstein (1981) K2P = Kimura 2 parametry, HKY = Hasegawa, Kishino *et* Yano, GTR = General time-reversible model. Podle Karola Marholda.

1.5 Zingiberaceae

Řád Zingiberales (obr. 1.8) je jednou z nejodvozenějších skupin jednoděložných rostlin. Zástupci jsou obvykle statné byliny s řapíkatými listy, zygomorfními květy a rozšířením v tropických oblastech. V osmi čeledích tohoto řádu najdeme mnoho ekonomicky významných plodin (banány, zázvor), koření (kurkuma, kardamom) a nespočet okrasných květin (*Heliconia, Strelitzia, Canna, Costus, Calathea,*…).

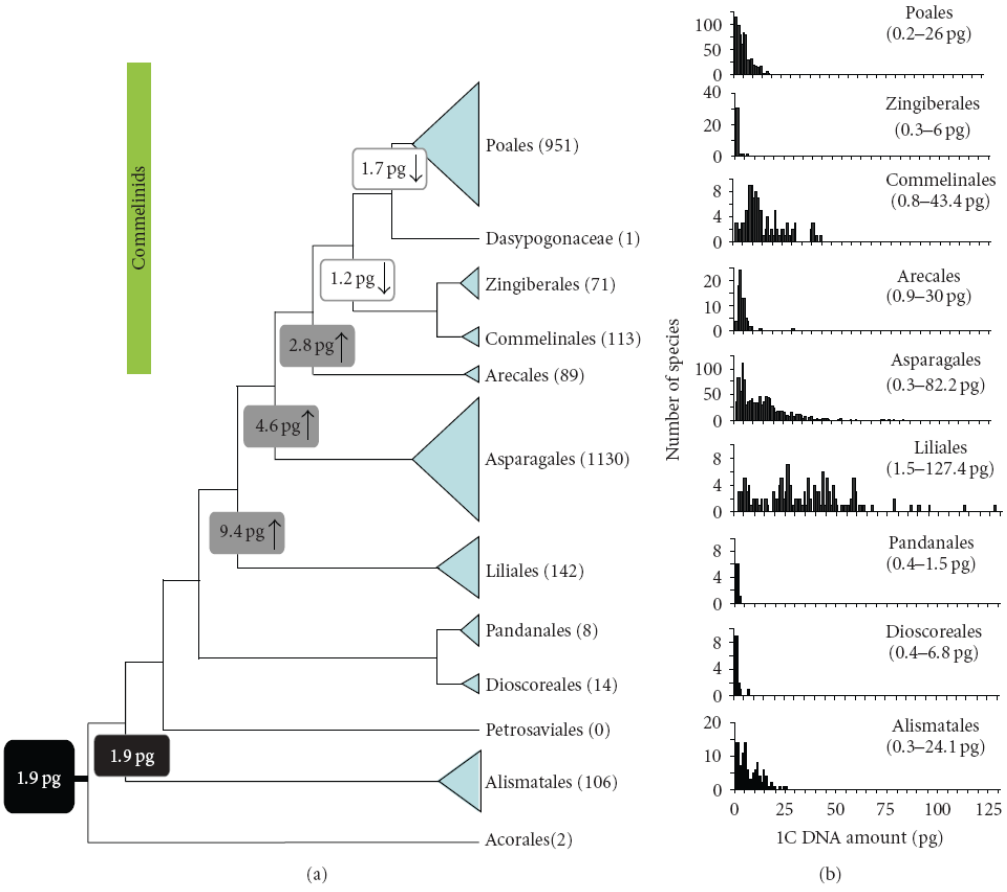
Obr. 1.8: Kladogram řádu Zingiberales (převzato z Simpson, 2005; namalovala Ilda Lopez).

U této skupiny dochází k významné evoluci počtu a funkce tyčinek. U čeledí Musaceae, Heliconiaceae, Strelitziaceae a Lowiaceae je vyvinuto 5 tyčinek, zanikla jedna tyčinka vnitřního kruhu. Čeledi Zingiberaceae a Costaceae mají fertilní pouze jednu tyčinku, další čtyři jsou obvykle petaloidní a jedna tyčinka vnějšího kruhu zanikla (obr. 1.9). Čeledi Marantaceae a Cannaceae mají oproti předchozím fertilní jenom polovinu tyčinky (tzn. pouze jeden prašný váček). Morfologie tyčinek je důležitým taxonomickým znakem i na vnitrorodové úrovni.



Obr. 1.9: A) Květní diagram čeledi Zingiberaceae (Kress *et al.*, 2002); B) Kresba květu rodu *Globba,* popsány jsou nitka (filament), čnělka (style), prašníkové výčnělky (anther appendages), blizna (stigma), pysk (labellum), korunní lístek (corolla lobe), korunní trubka (corolla tube), postraní staminodia (laterál staminoides), kalich (calyx) a semeník (ovary), Takano *et* Okada, 2003.

Rozpětí velikosti genomu i průměrná velikost u tohoto řádu jsou oproti jiným jednoděložným řádům malé. Hodnoty (1C) se pohybují od 0,3 pg do 6 pg (obr. 1.10; Leitch *et al.*, 2010).



Obr. 1.10: Fylogeneze jednoděložných rostlin s vyznačenými poklesy a nárůsty velikosti genomu (a) a histogramy jednotlivých řádů jednoděložných rostlin ukazující rozložení velikostí genomů (b) na základě 2527 druhů se známými C-hodnotami (Leitch *et al.*, 2010).

Zástupci čeledi Zingiberaceae jsou aromatické vytrvalé byliny s oddenky, lodyhy jsou obvykle krátké, ale vytváří se nepravá lodyha z listových pochev, která u některých druhů umožňuje dorůst výšky cca 6 metrů. V současné době je známo přibližně 50 rodů a 1200 - 1500 druhů (Kress, 1990; The Plant List, 2010).

Centrum diverzity se nachází v jihovýchodní Asii (Indonésie, Malajsie), čtyři rody se vyskytují v Africe (*Renealmia, Aframomum, Aulotandra, Siphonochilus*) a jeden je zastoupen v Americe *(Renealmia*). Ve vlhkém vždyzeleném lese a na stále vlhkých místech opadavého lesa si zázvorovité rostliny ponechávají zelené listy po celý rok. Na ostatních stanovištích se při suchých obdobích stahují pod zem a přežívají v podobě podzemních oddenků. Zázvorovité jsou známé především pro svůj ekonomický užitek. Z významných plodin sem patří například zázvor (*Zingiber officinale*), kurkuma (*Curcuma longa*), kardamom (*Elettaria cardamomum*) a z řezaných květin např. zástupci rodů *Alpinia, Globba, Etlingera* a *Curcuma*. Další využití je známo ve farmaceutickém průmyslu, jako barvivo a parfémy.

Typickou vlastností čeledi je speciální svinutí listů, kterému se říká ptyxis. Zygomorfní květy (obr. 1.9) jsou charakteristické přítomností jedné fertilní a čtyř petaloidních tyčinek, které po dvou srůstají a vytváří pysk a vnější staminodia. Podobně jako u jiných čeledí řádu Zingiberales květy vytrvávají jen přibližně jeden den. Nejčastější typ květenství je thyrsoid. Semeník je trilokulární s axilární placentací nebo unilokulární s parietální placentací. Septální nektária známá například u Costaceae byla nahrazena postraními kuželovitými nektárii na bázi květní trubky. Přítomnost unilokulárních semeníků a parietální placentace je se ztrátou septálních nektárií úzce spojena. Některé rody (*Curcuma, Camptandra, Roscoea*) mají na bázi tyčinek výběžky, které slouží jako mechanická páka, která při dosednutí opylovače ohne tyčinku s pestíkem, a generativní orgány květu se otřou o záda opylovače. Jako opylovači byli pozorováni ptáci (čeleď Meliphagidae), můry, motýli, včely (Euglossini), ale celkově je o opylování známo jen velmi málo (Endress, 1994).

Kress *et al.* (2002) analyzovali 104 zástupců, 41 rodů a navrhli novou klasifikaci (tab. 1.2, obr. 1.11), která rozděluje čeleď do čtyř podčeledí a šesti tribů.

Tab. 1.2: Zařazení rodů čeledi Zingiberaceae do podčeledí (Kress *et al.*, 2002). Hvězdičky označují rody, které nebyly zahrnuty do molekulární analýzy a jsou zařazeny na základě morfologické podobnosti.

Zingiberaceae						
Podčeleď	**Siphonochiloideae** (W. J. Kress)	**Tamijioideae** (W. J. Kress)	**Alpinioideae** (Link)		**Zingiberoideae** (Haask.)	
Tribus	**Siphonochileae**	**Tamijieae**	**Alpinieae**	**Riedelieae**	**Zingibereae**	**Globbeae**
Rody	*Siphonochilus*	*Tamijia*	*Aframomum*	*Burbidgea*	*Boesenbergia*	*Gagnepainia*
			Alpinia	*Pleuranthodium*	*Camptandra*	*Globba*
			Amomum	*Riedelia*	*Cautleya*	*Hemiorchis*
			**Aulotandra*	*Siamanthus*	*Cornukaempferia*	*Mantisia*
			**Cyphostigma*		*Curcuma*	
			**Elettaria*		*Curcumorpha*	
			Elettariopsis		*Distichochlamys*	
			Etlingera		*Haniffia*	
			**Geocharis*		**Haplochorema*	
			**Geostachys*		*Hedychium*	
			Hornstedtia	Incertae Sedis	*Hitchenia*	Incertae Sedis
			**Leptosolena*	*Siliquamomum*	*Kaempferia*	*Caulokaempferia*
			Paramomum		**Laosanthus*	
			Plagiostachys		**Nanochilus*	
			Renealmia		**Paracautleya*	
			Vanoverberghia		**Parakaempferia*	
					Pommereschea	
					Pyrgophyllum	
					Rhynchanthus	
					Roscoea	
					Scaphochlamys	
					Smithatris	
					**Stadiochilus*	
					Stahlianthus	
					Zingiber	

1.5.1 Karyologie a velikost genomu

Chromozómy v čeledi Zingiberaceae jsou poměrně malé, jejich velikost se pohybuje od 0,7 µm do cca 6 µm (Sharma et Bhattacharya, 1959), což studium karyotypu značně ztěžuje. V mitotických preparátech většinou není možné pozorovat umístění centromery ani satelity a všechny chromozómy se obvykle jeví stejně velké. S ohledem na tyto faktory lze ze somatických buněk získat jedinou informaci o karyotypu a to počet chromozómů. Sledováním meiose je možné získat o něco více informací. Sato (1960) cytologicky studoval 48 druhů z 11 rodů čeledi Zingiberaceae a zjistil široké spektrum základních chromosomových čísel x = 8, 9, 11, 12, 13 a 17.

Nejmenší známý počet chromozómů 2n = 20 je znám u rodu *Globba*, sekce Mantisia (Datta *et* Sarkar, 1980; Newman *et* Jong, 1986) a *Boesenbergia* (Beltran *et* Kiew, 1984). Naopak nejvyšší počet byl zjištěn u druhu *Curcuma raktakanta*, kde 2n = 105 (Leong-Škorničková *et al.*, 2007).

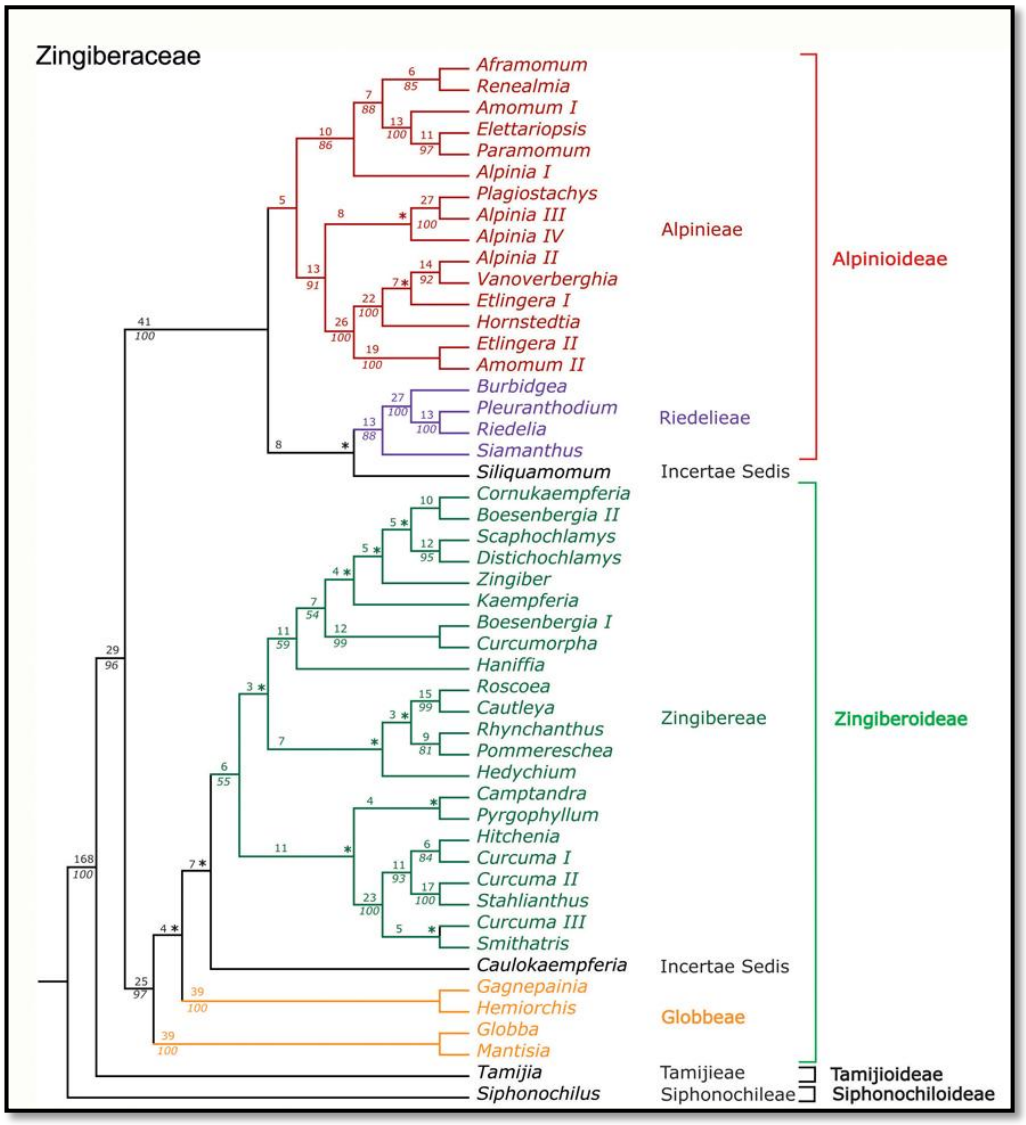
U několika rodů (především z podčeledi Zingiberoideae) byl zjištěn výskyt několika ploidií. Patří mezi ně rody *Globba, Curcuma, Hedychium, Kaempferia, Boesenbergia a Zingiber*. Podčeleď Alpinioideae je mnohem uniformnější, většina rodů má 2n = (44), 48.

Velikost genomu doposud nebyla známa téměř pro žádné zástupce čeledi. V nejznámější databázi shromažďující záznamy o velikosti genomu rostlin *„Plant DNA C-value database“* (http://data.kew.org/cvalues/) je momentálně uvedeno 39 údajů pro čeleď Zingiberaceae, z toho 33 pro rod *Curcuma* ze studie Jany Leong-Škorničkové a kol. (2007). Rozpětí velikosti genomu z této databáze sahá od 2C = 1,66 pg u *Curcuma vamana* do 12,05 pg u *Zingiber officinale.* Mimo rod *Curcuma* jsou v databázi uvedeny druhy *Paracautleya bhatii* (2C = 2,18 pg), *Hitchenia caulina* (2C = 2,24 pg), *Stahlianthus involucratus* (2C = 3,11 pg), *Kaempferia scaposa* (2C = 2,33 pg) a *Alpinia speciosa* (2C = 5,50 pg). Další údaje jsou známy pro *Amomum subulatum* (4C = 5,88–6,22 pg), *Zingiber officinale* (4C = 10,15 pg) a *Z. rubens* (4C = 8,33 pg) (Das *et al.*, 1999). U rodů *Globba, Hemiorchis* a *Gagnepainia* velikost genomu dosud měřena nebyla.

Malé množství údajů o velikosti genomu brzy změní v současnosti probíhající výzkum evoluce velikosti genomu v čeledi Zingiberaceae, v rámci kterého bude publikováno vyhodnocení cca 200 nových cytometrických údajů ve fylogenetickém kontextu. Předběžné výsledky ukazují na minimální 2C = 0,984 pg u *Hemiorchis rhodorhachis*, maximální 2C = 15,520 pg u *Elettariopsis sp*., průměrná 2C = 3,82 pg a medián 2C = 3,52 pg (Šída *et al.*, in prep.).

1.6 Tribus Globbeae

Tribus Globbeae je bazální skupinou čeledi (obr. 1.11). Tvoří ji rody *Globba* (včetně dříve samostatného rodu *Mantisia*; Williams *et al.*, 2004), *Hemiorchis* a *Gagnepainia*. Poslední dva mají každý pouze 3 druhy. Monofýlie tribu není molekulárně podpořená a vyžaduje další studium (Kress *et al*, 2002; Williams *et al.*, 2004). Determinace rodů tohoto tribu je založená na pozici květenství, tvaru plodu, délce nitky a postavení petaloidních tyčinek. Synapomorfií skupiny je unilokulární semeník s parietální placentací (oproti trilokulárnímu semeníku s axilární placentací u zbylých zástupců čeledi) a dlouhá nitka jediné fertilní tyčinky. Petaloidní tyčinky nejsou srostlé s pyskem koruny. Ve většině případů se jedná o oddenkové geofyty do 1 m výšky rostoucí v tropických oblastech jihovýchodní Asie.



Obr. 1.11: Fylogeneze čeledi Zingiberaceae (Kress *et al.*, 2002).

1.6.1 *Hemiorchis* Kurz

Malý rod *Hemiorchis* má tři druhy (*H. burmanica* (obr. 1.12 C)*, H. pantlingii, H. rhodorrhachis*) a roste v severovýchodní Indii, Bangladéši a Barmě. Na rozdíl od rodu *Globba* vyrůstá květenství toto rodu na krátké lodyze s redukovanými listy, prašníky nemají přívěsky, nitka je krátká, pysk je volný, květ není prohnutý a oddenek je dlouhý a úzký.

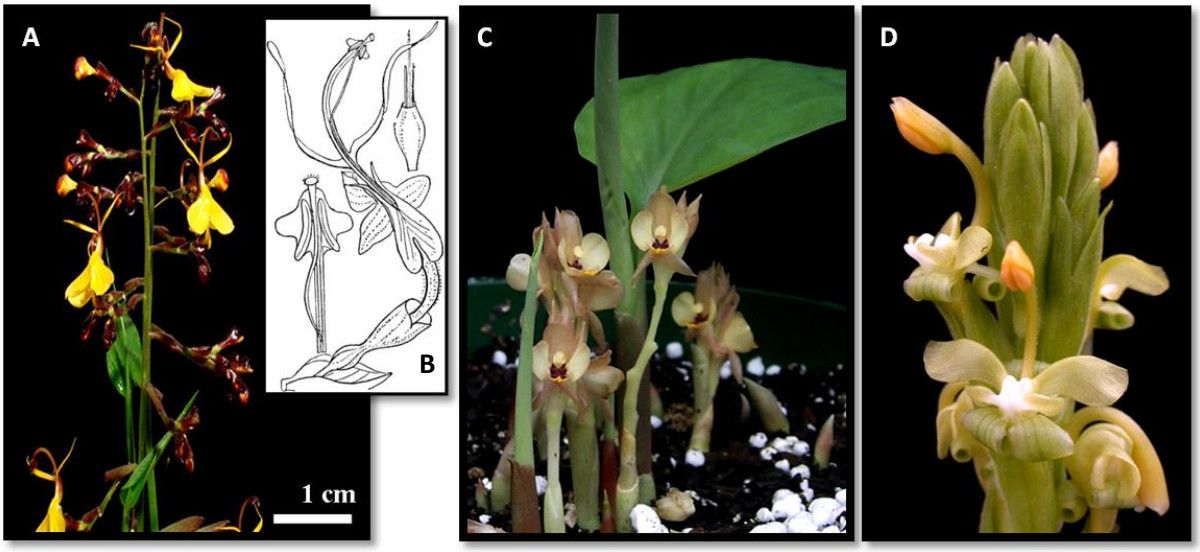
1.6.2 *Gagnepainia* K. Schum.

Gagnepainia má taktéž pouze tři druhy (*G. godefroyi, G. harmandii* (obr 1.12 D), *G. thoreliana*). Rod je znám z Thajska, Laosu, Vietnamu a Kambodži. Na rozdíl od rodu *Globba* je květenství na krátké lodyze s redukovanými listy, prašníky nemají přívěsky, nitka je dlouhá, pysk je volný a květ není

prohnutý. *Hemiorchis* a *Gagnepainia* jsou sesterskými taxony, ale monofýlie tribu Globbeae se na základě molekulárních dat (ITS a *mat*K sekvencí) nepotvrdila (Kress *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004).

1.6.3 *Mantisia* Sims.

Rod *Mantisia* (*M. radicalis, M. wardii, M. salarkhanii, M. spathulata, M. wengerii*) je dnes součástí rodu *Globba*, klasifikovaná jako jedna ze sedmi sekcí rodu nazvaná Mantisia (Williams *et al.,* 2004). Poslední dva jmenované druhy jsou kriticky ohrožené (Sharma *et al.*, 2012). Jedná se vytrvalé byliny endemické v hornatých oblastech severovýchodní Indie, Barmy a Bangladéše. Od rodu *Globba* se *Mantisia* se liší hlavně připojením bočních staminodií, které jsou nad pyskem, nikoli pod ním. Lidově se rodu *Mantisia* říká tančící dívka, protože velkolepé květy tanečnici připomínají (obr. 1.12 A, B).

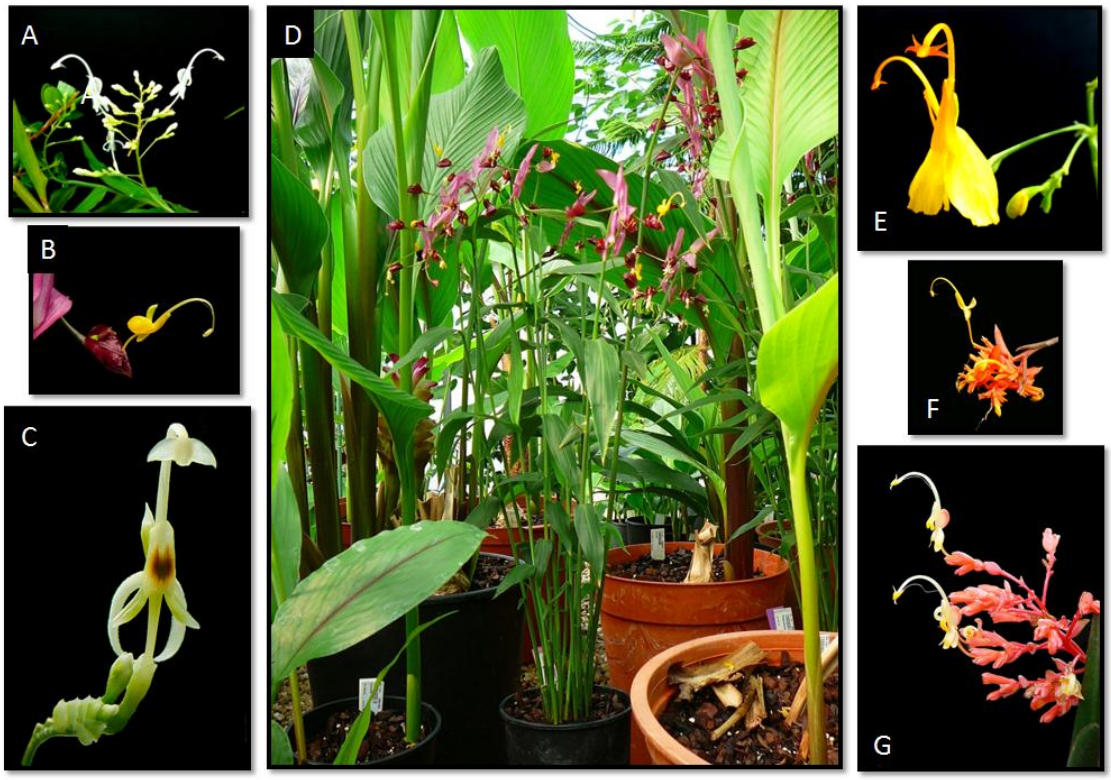


Obr. 1.12: A) květenství *Mantisia wengerii* (Bhowmik *et al*., 2010), B) ilustrace květu *M. sanatoria* (http://etc.usf.edu/clipart/54000/54028/54028_danc_ginger.htm), C) *Hemiorchis burmanica* (http://botany.si.edu) D) *Gagnepainia harmandii* (http://botany.si.edu).

1.6.4 *Globba*

Globba (obr. 1.13) patří s více než 100 druhy k jednomu z největších rodů v celé čeledi. Rozšíření sahá od východních Himálají a jižní Číny, přes Indii a Indočínu po Malajsii a Filipíny. Hlavním centrem diverzity je Thajsko (Larsen, 1996). Druhy severně od pevninské šíje „*Isthmus of Kra*" na pomezí Thajska a Malajsie přečkávají suchá období v dormantním stavu (zhruba od listopadu do dubna), druhy rostoucí jižně od tohoto bodu zůstávají zelené po celý rok.

Rod *Globba* je polyploidním komplexem s mnoha publikovanými chromozómovými počty [2n = 20, 22, 24, 28, 32, 34, 44, 48, 64, 80; shrnuto v Takano (2001)]. Nejčastějšími počty jsou 32 a 48 chromozómů, které se také běžně vyskytují jako dva různé cytotypy jednoho druhu (Takano, 2001).

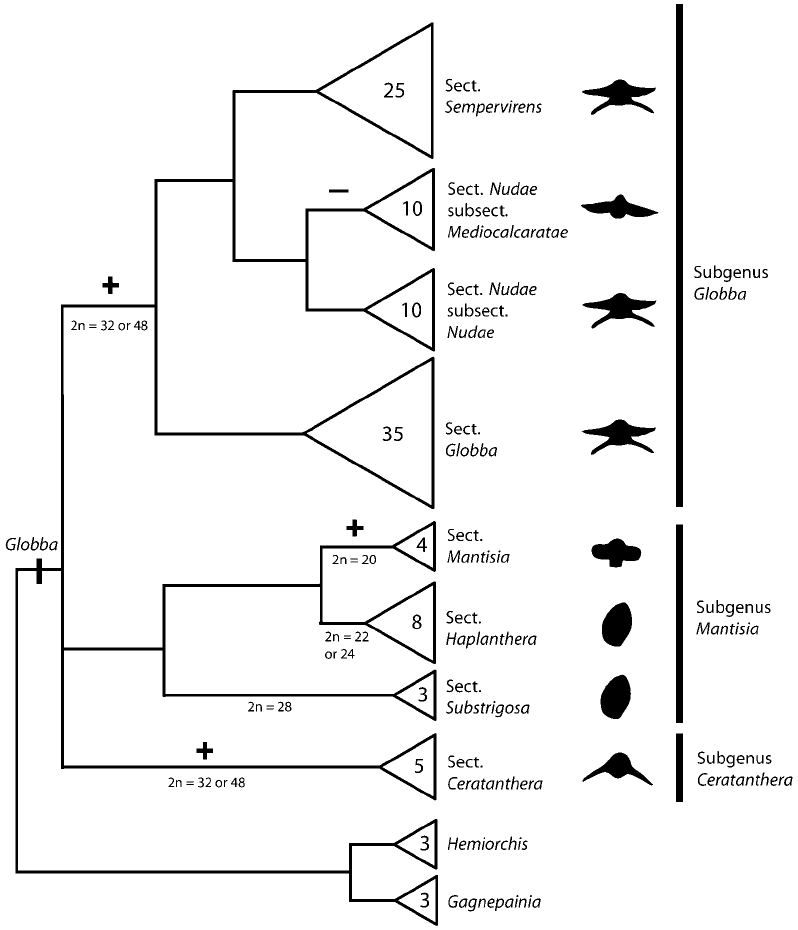


Obr. 1.13: Fotky rodu *Globba*. A - *G. sp* (E19972553A); B, D – G. siamensis; C - *G. sp* (E20010323)*;* E – *G. atrosanguinea;* F – *G. nuda*; G – *G. brachyanthera,* (zdroj: vlastní fotografie).

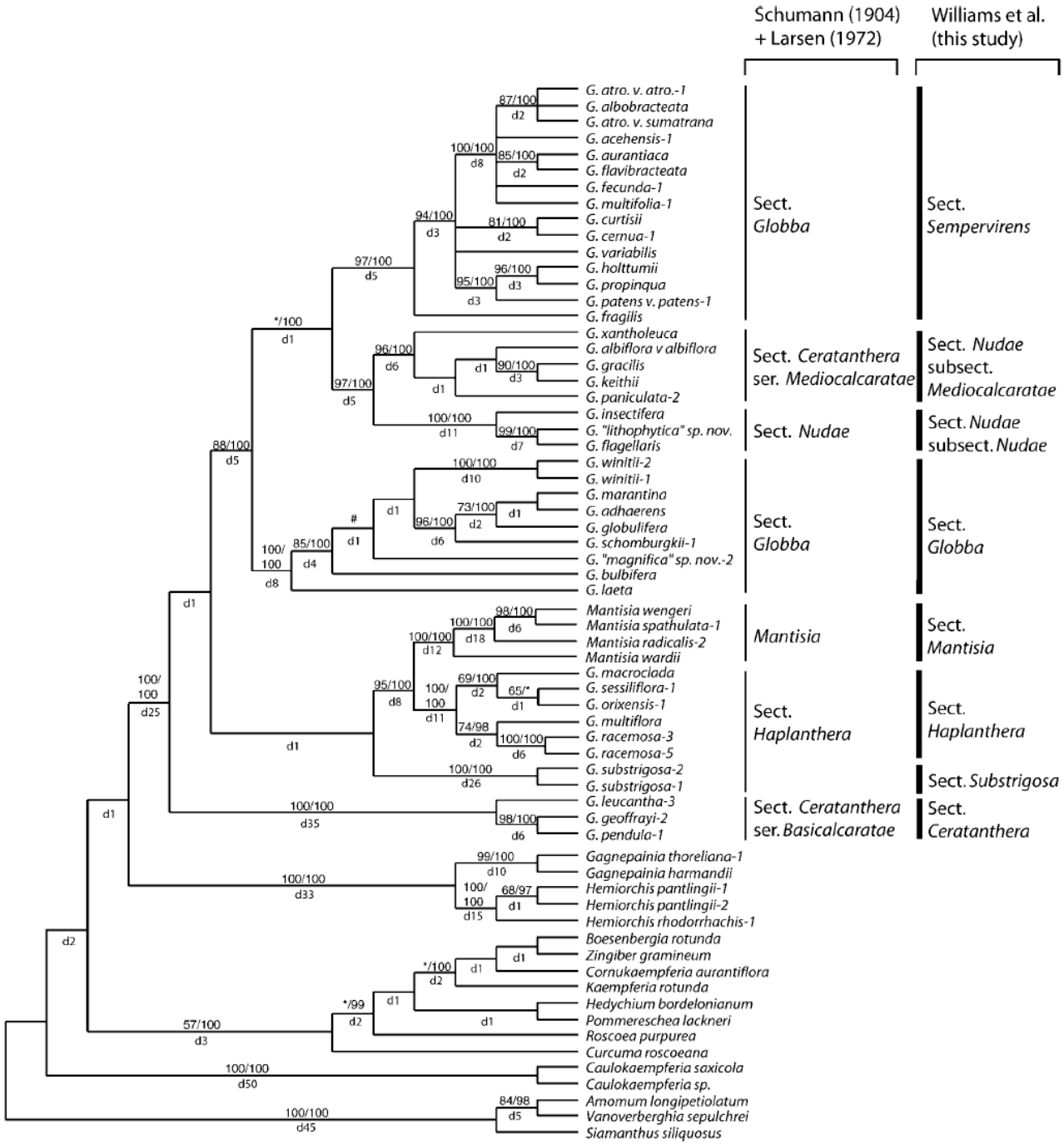
V poslední monografii rodu (Schumann, 1904), bylo zahrnuto 74 druhů a byly stanoveny tři sekce podle počtu prašníkových výběžků (tab. 1.3). Na základě molekulárních dat bylo vhodné některé sekce rozdělit. Dnes je rod rozčleněn do 7 sekcí: Haplanthera, Mantisia, Substrigosa, Sempervirens, Ceratanthera, Globba a Nudae (Obr. 1.15). Sekce Nudae má podsekce Nudae a Mediocalcaratae (Williams *et al.*, 2004; tab. 1.3). Vývoj prašníkových výběžků v kontextu fylogeneze ukazuje obr. 1.14.

Tab. 1.3: Počet prašníkových přívěsků rodu *Globba* u jednotlivých sekcí *sensu* Schumann (1904) + Larsen (1972) a v současném pojetí sekcí *sensu* Williams *et al.* (2004).

Systém sekcí	**Sekce**	**Počet přívěsků**	**Redukce listenů**
Schumann (1904) + Larsen (1972)	Haplanthera	0	-
	Ceratanthera	2	-
	Globba	4	Ne
	Nudae	4	Ano
Williams *et al.*, 2004	**Haplanthera**	0	
	Substrigosa	0	
	Mantisia	2	
	Ceratanthera	2	
	Globba	4	
	Nudae subsect. **Mediocalcaratae**	2	
	Nudae subsect. **Nudae**	4	
	Sempervirens	4	



Obr 1.14: Fylogeneze sekcí tribu Globbeae s počty chromozómů a grafickým znázorněním tvaru a počtu prašníkových výběžků. Číslo v trojúhelníku vyjadřuje přibližný počet druhů v linii (Williams *et al.*, 2004).

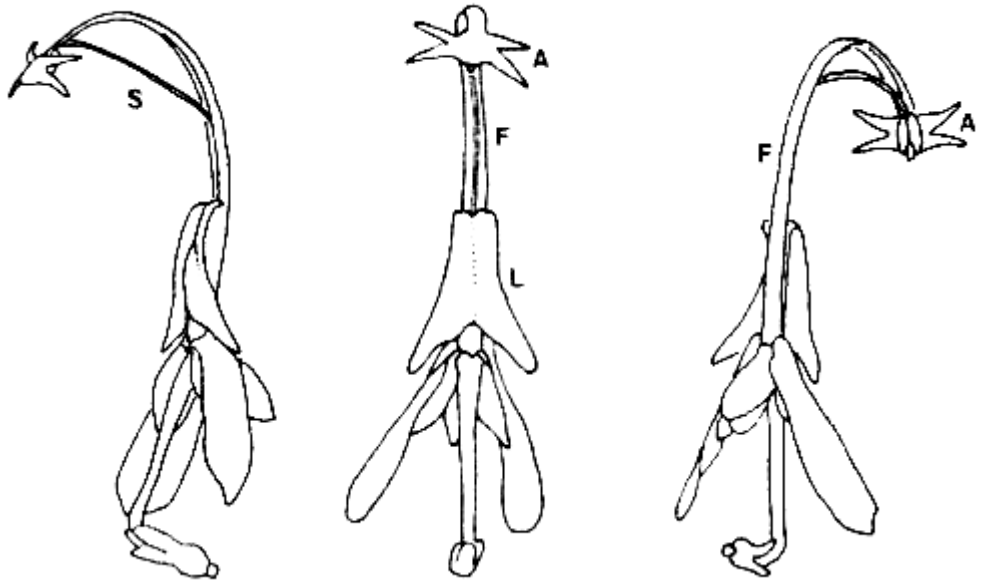


Obr. 1.15: Striktní konsenzuální strom získaný metodou maximální parsimonie z ITS a *mat*K úseků DNA. Čísla nad větvemi představují bootstrap a Bayesovskou posteriorní pravděpodobnost, čísla pod větvemi vyjadřují Bremerovu podporu (Williams *et al.*, 2004).

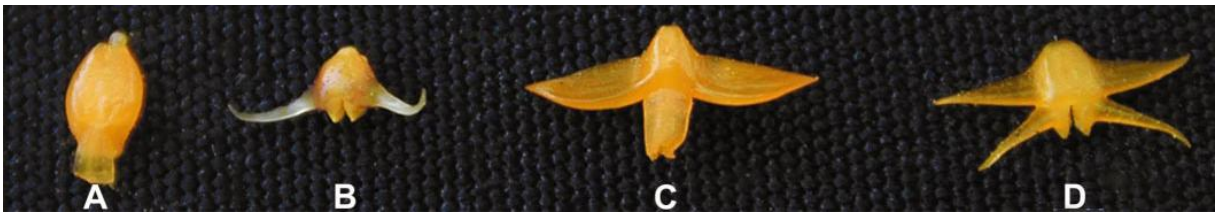
1.6.4.1 Reprodukční systém a morfologie květu

Většina druhů je schopna vegetativní reprodukce pacibulkami, které se vytvářejí ve spodní části květenství. Bylo zjištěno, že u druhů s 2n = 48 tento způsob rozmnožování převažuje nad sexuálním rozmnožováním (Takano, 2001; Williams *et al.*, 2004). Tento způsob rozmnožování není u tropických rostlin úplně běžný, ale nalezneme ho v čeledi ještě u některých druhů rodů *Hedychium* a *Alpinia* (M. Newman, osobní sdělení).

Zkoumání sexuálního rozmnožování začíná u unikátní morfologie květu rodu *Globba*. Květy na první pohled zaujmou výraznou obloukovitou nitkou a bočními výběžky prašníků (obr. 1.16, 1.17). Květenství je svěšený nebo vztyčený thyrsoid. Listeny v květenství bývají výrazně zbarvené, oranžové, růžové, červené nebo zelené a často kontrastují s barvou květu, která bývá bílá, žlutá, oranžová nebo fialová. Povrch uvnitř trubice je vybaven vlásky, které slouží jako kapilární systém pro nektar (Muller, 1931). Jako u všech zázvorovitých je blizna sevřena prašníkem a v poupěti je uložena ve ventrální brázdě nitky. A protože čnělka je kratší než ohnutá nitka, vznikne útvar připomínající luk s tětivou (obr. 1.16). Blizna, která se nachází v těsné blízkosti prašníku, je vydutá a lemována tuhými vlásky (Endress, 1994).



Obr 1.16: Květ druhu *Globba winitii*, pohled z boku, zpředu a zezadu. A (Anther) = prašník svírající bliznu, F (Filament) = nitka tyčinky objímající čnělku, L (Lip) = spodní pysk, S (Style) = čnělka. Zdroj Endress, 1994.



Obr. 1.17: Typy prašníkových přívěsků u rodu *Globba.* A) Sekce Haplanthera (bez přívěsků). B) Sekce Ceratanthera ser. Basicalcaratae (dva přívěsky připojené na bázi). C) Sekce Nudae ser. Mediocalcaratae (dva široce napojené přívěsky). D) Sekce Globba a Nudae (čtyři přívěsky). Zdroj: Williams *et al.*, 2004.

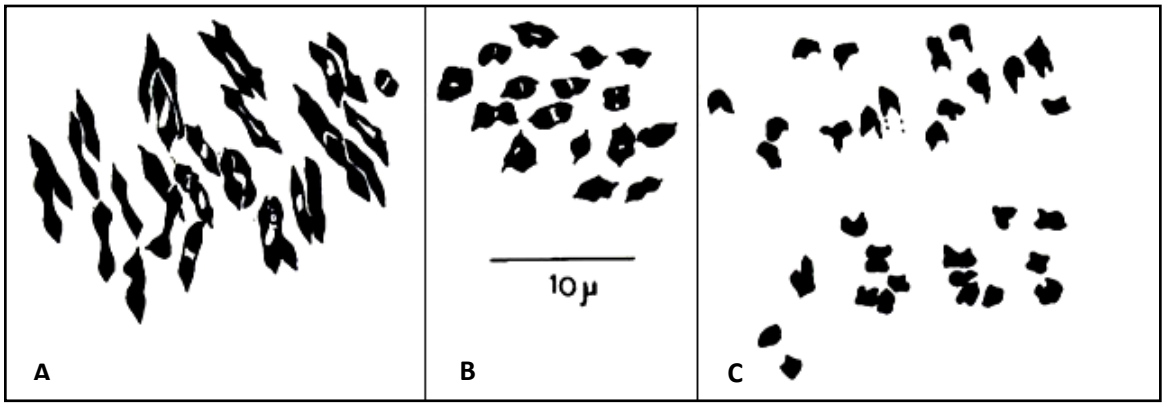
Když opylovač dosedne na květ, prašník smáčkne bliznu, která uvolní sekret, na který se nalepí pyl z těla opylovače. Boční přívěsky prašníku slouží pravděpodobně jako páka, která udrží správnou orientaci struktury, i když opylovač přiletí z boku. O opylování rodu *Globba* nejsou prakticky žádné záznamy (Endress, 1994; Box, 2006). Z architektury květu lze usuzovat, že vhodnými opylovači by byli motýli (Muller, 1931). Na Malajském poloostrově byl na květu *Globba fasciata* jedenkrát zpozorován motýl *Eurema hecabe* jak saje nektar a při sevření křídel se otřel o prašníky a bliznu (Newman, 1988). Na druhou stranu vzhledem k pozici nektárií a malému květu u rodu *Globba* jsou podle Box (2006) běžní opylovači čeledi Zingiberaceae (kolibříci, euglosiny, motýli) nepravděpodobnými přenašeči pylu. Kato (1993) studoval opylovače druhu *Globba aurantica* na Sumatře a zjistil zde jediného návštěvníka, jímž byla vosička z podčeledi Anthophorinae (*Elaphropoda impatiens*).

1.6.4.2 Karyologie

Cytologické studie rodu přinesly celou škálu chromozómových počtů: 2n = 22, 24, 28, 32, 34, 44, 48, 64, 80 a 96 (shrnuto v Takano, 2001). Názor na základní chromozómové číslo se v minulosti často měnil. Různá čísla byla navržena i pro jednotlivé sekce. Nicméně naprostá většina zdrojů udává dva chromosomové počty, a to 2n = 32 a 2n = 48 a s nimi nevyjasněné základní chromosomové číslo x = 8 nebo x = 16.

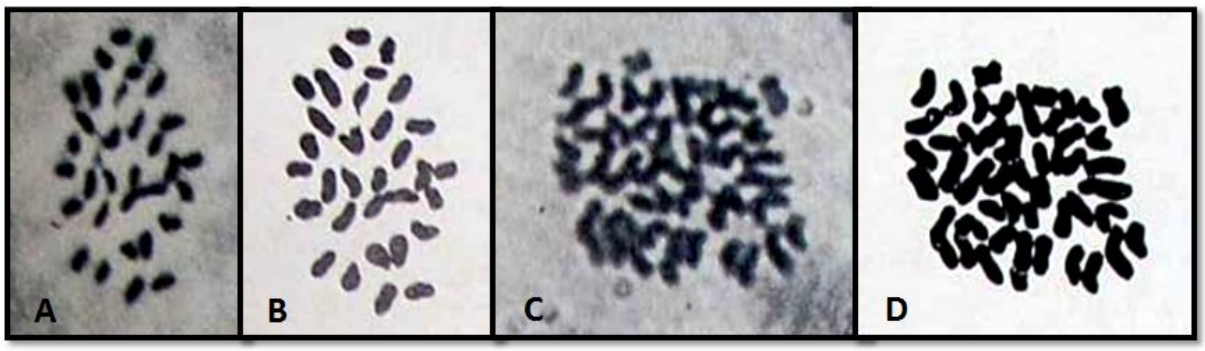
Studium karyotypu je značně ztíženo malou velikostí somatických chromosomů (0,7–2,5 μm) a jejich uniformním vzhledem (Lim, 1972), proto je vhodnější studovat chromozómy v meiotické fázi.

K poznání karyologie přispělo nejvíce pět prací, jejichž výsledky zde jsou stručně shrnuty. První z nich je cytologická studie řádu Zingiberales (Mahanty, 1970), do které byly zahrnuty druhy *Globba atrosanguinea*, *G winitii, G. albiflora* var. *aurea* a *G. heterobractea* [= *G. marantina* podle *The Plant List* (2010)]. U prvního druhu byly počítány pouze meiotické chromozómy z pylových mateřských buněk a počet byl vždy 2n = 48. Množství bivalentů mírně převažovalo nad počtem trivalentů a univalentů, které se vyskytovaly ve velmi podobné míře. Zřídka byly pozorovány tetravalenty a pentavalenty. Kvůli tomuto párování, bylo navrženo, že *G. atrosanguinea* by mohla být, tetraploidním druhem hybridního původu se základním chromozómových číslem x = 12. U *G. heterobractea* bylo pozorováno 32 bivalentů, tedy 2n = 4x = 64, zde bylo navrženo druhé základní chromozómové číslo x = 16. U zbylých dvou druhů bylo zjištěno pravidelné párování a 2n = 32 (obr. 1.18).



Obr 1.18: Chromozómy z pylových mateřských buněk v první metafázi (A, B) a první anafázi (C). A) *Globba heterobractea* – 32 bivalentů; B) *G. winitii* – 16 bivalentů; C) *G. albiflora* – 32 dceřiných bivalentů (Mahanty, 1970).

Druhá studie (Lim, 1972) se zabývala malajskými druhy a zahrnula 12 ze 13 v Malajsii se vyskytujících druhů. Zjištěny byly počty 32 chromozómů pro *Globba unifolia, G. fragilis, G. leucantha* a *G. albiflora,* 48 chromozómů pro *G. curtisii, G. holttumii* a *G. intermedia,* oba počty u *G. cernua. G. pendula, G. patens* a *G. variabilis* a 80 chromozómů u *G. marantina.* Ukázka fotografií metafázických chromozómů 2n = 32 a 2n = 48 je na obr. 1.19. V této práci bylo navrženo základní chromozómové číslo x = 8 na základě seskupování chromozómů u některých ze studovaných zástupců. Zástupci s 2n = 32 tvořili většinou bivalenty. Nejmenší podíl bivalentů byl nalezen u *G. pendula* a *G. cernua*, kde byl detekován relativně vyšší výskyt univalentů (v počtu 0–4) a častější non-disjunkce při rozchodu chromozómů při meiotickém dělení, čímž vznikají numerické aberace. Multivalenty byly pozorovány u sedmi z třinácti taxonů. Extrémně vysoký výskyt multivalentů (85 %) byl objeven u *G. pendula*, zatímco u ostatních taxonů byl výskyt relativně nižší (pouze 5,6 – 16,9 %). Byla zjištěna silná korelace mezi párováním chromozómů, nepravidelnostmi v meióze a životaschopností pylu.



Obr. 1.19: Mitotická metafáze buněk kořenových špiček (Lim, 1972). A),B) *Globba pendula*, 2n = 32; C), D) G. cernua, 2n = 48. A),C) fotky; B), D) upravené obrázky.

Chromozómový počet 2n = 48 byl nalezen u šesti druhů z dvanácti zkoumaných v Malajsii. Zástupci této skupiny tvoří většinou trivalenty. U většiny taxonů byl minimální zjištěný počet trivalentů větší než 8 (množství trivalentů lze vyjádřit v procentech jako c 54–90 %). V jednom jedinci

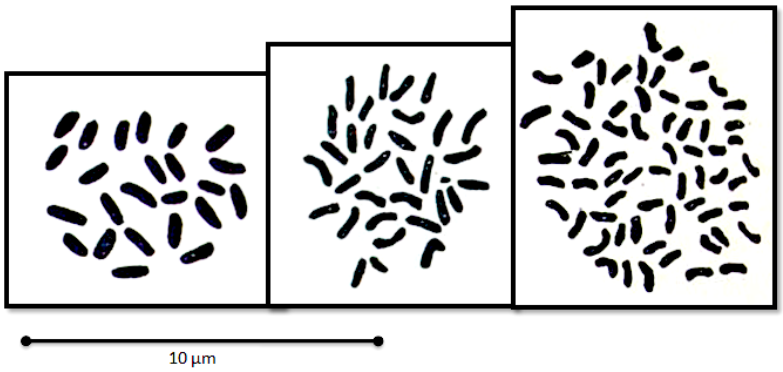
se počet trivalentů velmi různil. Rozchod chromozómů do gamet byl nepravidelný (v poměru od 24:24 do 17:31). Všechny taxony měly nepravidelnou meiózu a ve srovnání s taxony s 2n = 32 zhoršenou životaschopnost pylu. Nepravidelnost meiózy se projevovala nespárování chromozómů při první a druhé metafázi, zaostáváním chromozómů v anafázi, nerovnoměrnou segregací a polysporií ústící v tetrády či triády místo dyád. Semena nebyla nalezena ani v přírodě ani v pěstované sbírce, s výjimkou druhu *G. variabilis* (známo pouze 2n = 48).

Při seskupování chromozómů v metafázi I v případě 2n = 32 byly nejčastěji pozorovány dvě skupiny osmi bivalentů a v případě 2n = 48 byla pozorována jedna skupina osmi až šestnácti trivalentů a skupina zbylých chromozómů jako bivalenty a univalenty.

Zvláštností byl nález endopolyploidie (2n = 160) u druhu *G. marantina* (2n = 80) v buňce kořenové špičky.

Vysoká míra tvorby bivalentů a malé množství univalentů u druhů s 2n = 32 indikuje diploidní stupeň organismu. Naopak u druhů s 2n = 48 vysoká míra tvorby trivalentů, nepravidelná meióza a malá životaschopnost pylu indikuje triploidní stupeň. Jako způsob vzniku triploidů se nabízí autotriploidizace, protože trivalenty vykazovaly vysokou homologii. Alotriploidní jedinci obvykle mají malý počet trivalentů a problémy s párováním chromozómů. Druhy *Globba holttumii, G. cernua* a *G. pendula* měly relativně menší počet trivalentů (54–68 %), jsou tedy možnými adepty na alotriploidní vznik. Nicméně nález multivalentů (především tetravalentů) u taxonů s 2n = 32 naznačuje možnou polyploidii v těchto taxonech. Tuto teorii podporuje i zjištěné formování skupinek chromozómů v metafázi I. Je tedy možné, že základní chromozómové číslo je x = 8, pak jsou druhy s 2n=32 alotetraploidní (AABB), ačkoli se při meióze chovají jako diploidní, a druhy s 2n = 48 jsou hexaploidní (AAABBB). Toto číslo dobře koresponduje s nalezenými počty 2n = 24, 32, 48, 64 a 80, ale méně se hodí k dalším publikovaným počtům jako 2n = 20 (Datta *et* Sarkar, 1980, Newman, 1988), 22, 44 (Sharma *et* Bhattacharya, 1959).

Ve třetí studii počítal Larsen (1972) chromozómy třinácti Thajských druhů rodu *Globba*. V této cytologické práci byly nově popsány druhy *Globba nuda* (2n = 34), *G. aphanantha* (= *substrigosa*, 2n = 28; 3 SAT-chromozómy), *G. obscura* (2n = 32; bez SAT-chrom.) a *G. laeta* (2n = 32). Dalšími analyzovanými druhy byly *G. clarkei* (2n = 24; 1–2 SAT-chrom., 12 bivalentů), *G. pendula* (2n = 32; až 2 SAT-chromozómy), *G. schomburgkii* (2n = 48, ca 64), *G. winitii* (2n = 32; 1–2 SAT-chrom., 16 bivalentů), *G. garrettii* (2n = 32, 48; morfologicky neodlišitelné rostliny), *G. kerrii* (2n = 32), *G. nisbetiana* (2n = 32), *G. purpurascens* (2n = 32; 1–2 SAT-chrom.) a *G. reflexa* (2n = 32). Ukázka některých metafázických rozložení chromozómů je na obr. 1.20.

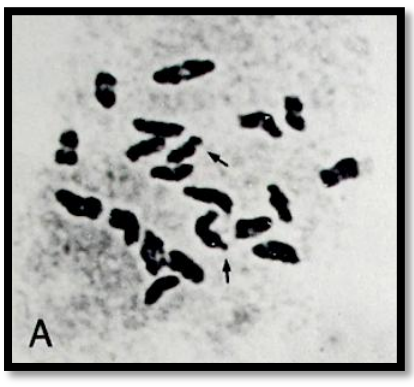


Obr. 1.20: Mitotická metafáze buněk kořenových špiček (Larsen, 1972, upraveno). Zleva *Globba clarkei* (2n = 24), *G. winitii* (2n = 32), *G schomburgkii* (2n = c 64), (Larsen, 1972).

Předpokládané základní chromozómové číslo je x = 8. Druhy s 2n = 24, 28 jsou považovány za tetraploidy a byla pro ně navržena druhotná základní čísla x = 6 a x = 7 jako dysploidní série od x = 8. V meióze dochází k pravidelnému párování a nejčastější počet SAT-chromozómů je 2. Nepřítomnost čtyř SAT-chromozómů očekávaných u tetraploidů autor vysvětluje ztrátou při diploidizačním procesu. V hornatých oblastech severního Thajska evidentně došlo k rychlé speciaci za vzniku několika neoendemitů.

Další prací je dizertační práce Marka Newmana (1988), ve které se zabývá cytotaxonomií a opylováním u zástupců čeledi Zingiberaceae. Z tribu Globbeae byly počítány chromozómy u druhu *Mantisia wardii* (dnes *Globba wardii*, viz výše) a šesti druhů rodu *Globba.* Chromozómy druhu *Mantisia wardii* byly spočítány vůbec poprvé a to ze sedmi kořenových špiček a 48 buněk se závěrem 2n = 20 (obr 1.21). Velikost chromozómu tohoto druhu se pohybovala mezi 2,0–4,5 µm. Pravidelné párování chromozómů dovedlo autora k hypotéze, že základní chromozómové číslo je x = 10. Dále byly spočteny chromozómy u *G. marantina* (2n = 64), *G. winitii* (2n = 32) a poprvé byly počítány chromozómy u *G. fasciata* (2n = 32, bez SAT-chrom., při meiose se tvořilo 16 bivalentů), *G. brachyanthera* (2n = 32, bez nebo 2 SAT-chrom.), *G. propinqua* (2n = c 48, 3 SAT-chrom.) a *G. atrosanguinea* (2n = c 48, 3 SAT-chrom.). Velikost chromozómů těchto druhů se pohybovala mezi 1,3–2,7 µm.

Zatímco *G. fasciata* při samoopylovacích pokusech plody nevytvořila, u *G. marantina* plody pozorovány byly. U *Mantisia wardii* byl z 18 samoopylených květů vytvořen plod pouze v jednom případě.



Obr. 1.21: *Mantisia wardii* – metafáze mitotického dělení v buňce kořenové špičky, 2n = 20, šipky označují SAT-chromozómy (Newman, 1988).

Poslední prezentovanou studií je výzkum japonského autora Atsuko Takano (2001), který analyzoval 19 taxonů rodu *Globba* ze Sumatry a Jávy. Byly zjištěny nové počty pro 13 druhů (2n = 32 pro *G. campsophylla, G. franciscii, G. platystachya, G. leucantha var. flavidula, G. fecunda*; 2n = 48 pro *G. maculata, G. acehensis, G. albobracteata, G. aurantica, G. flavibracteata, G. talangensis* a oba cytotypy byly zjištěny pro *G. paniculata, G. leucantha var. bicolor, G. multifolia*). Z dalších bylo stanoveno 2n = 32 pro *G. pendula* a 2n = 48 pro *G. atrosanguinea*, *G. cernua* a *G. patens*.

Studium fertility pylu vedlo autora u závěru, že základní chromozómové číslo by mohlo být x = 16, protože 2n = 48 mají výrazně méně fertilního pylu, rozmnožují se hlavně vegetativně (oddenky a pacibulkami), obvykle netvoří semena, dva homologní satelitní chromozómy byly zjištěny u rostlin s 2n = 32 (*G. paniculata, G. franciscii*) a tři satelitní chromozómy u cytotypů 2n = 48 (*G. paniculata, G. flavibracteata*). Navíc byly detekovány trivalenty u taxonů s 2n = 48.

Druhy s 2n = 48 pravděpodobně vznikly splynutím redukované (n) a neredukované (2n) gamety rodičovských taxonů. Tuto hypotézu podporuje velmi vzácný výskyt vyšších ploidních úrovní (proto je nepravděpodobný vznik 2n = 48 křížením cytotypů 2n = 32 a 2n = 64) a navíc tyto druhy s vyšší ploidií se ve fylogenetických analýzách nepodobaly cytotypům 2n = 48. Naopak taxony s 2n = 48 se podobaly taxonům s 2n = 32 (Takano *et* Okada, 2002). Podobný závěr byl konstatován i v rodě *Curcuma* (Soontornchainaksaeng *et* Anamthawat-Jónsson, 2011).

Tabulka 1.4 shrnuje počty chromozómů v rodě Globba dostupné z literatury. Pro rody *Hemiorchis* a *Gagnepainia* žádné údaje nejsou známy.

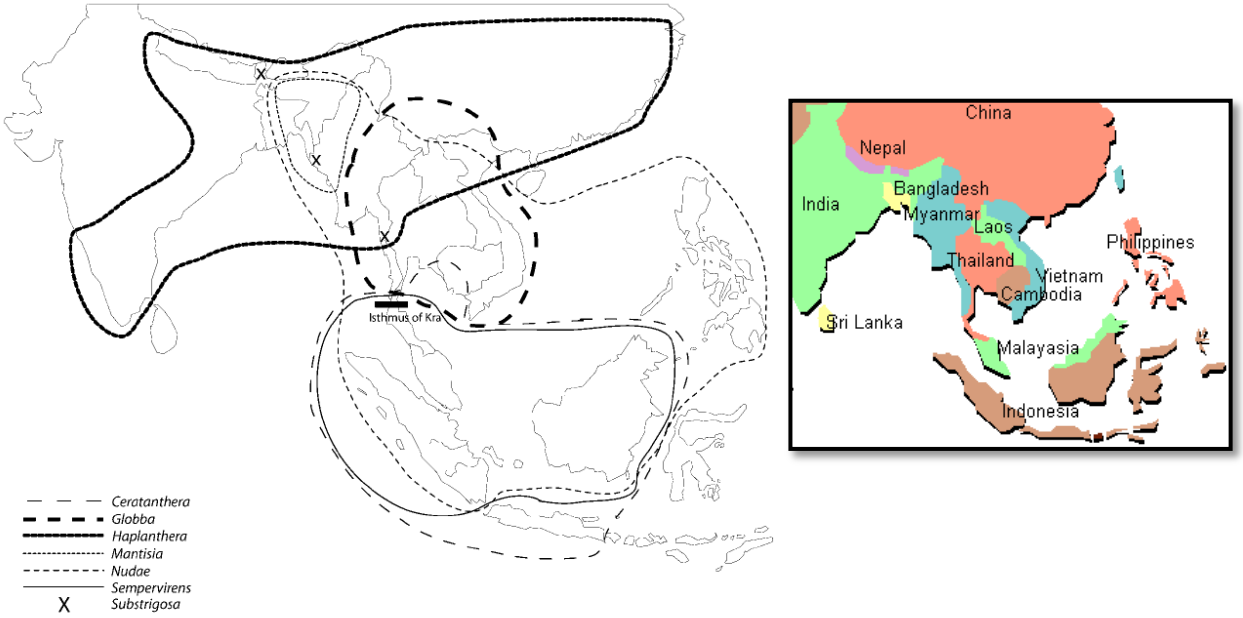
Tab. 1.4: Publikované počty chromozómů u rodu *Globba*. Bisson *et al.,* 1968; Ramachandran, 1969; Mahanty, 1970; Lim, 1972, 1973; Larsen, 1972; Datta *et* Sarkar, 1980; Newman, 1988; Takano, 2001. Pro druh *Globba marantina* bylo mimo uvedených počtů ještě navíc spočteno 2n = 24 a 44 (Raghavan, 1943).

Druh ↓ Rok→	**68/9**	**70**	**72**	**74**	**80**	**84**	**88**	**90**	**2001**
Globba acehensis A.Takano & H.Okada									48
Globba albiflora Ridl.		32	32						
Globba albobracteata N.E.Br.									48
Globba atrosanguinea Teijsm. & Binn.		48					48		48
Globba aurantiaca Miq.									48
Globba brachyanthera K.Schum.							32		
Globba campsophylla K.Schum.									32
Globba cernua Baker			32, 48						48
Globba clarkei Baker			24						
Globba corneri A.A.Weber			48, c 64						
Globba curtisii Holttum			48						
Globba emeiensis Z.Y. Zhu							24		
Globba fecunda A.Takano & H.Okada									32
Globba flavibracteata A.Takano & H.Okada									48
Globba fragilis S.N.Lim			32						
Globba franciscii Ridl.									32
Globba garrettii Kerr			32, 48						
Globba glavibracteata									48
Globba holttumii S.N.Lim			48						
Globba intermedia S.N.Lim			48						
Globba kerrii Craib			32						
Globba laeta K.Larsen			32						
Globba leucantha Miq.			32						32, 48
Globba maculata Blume									48

Globba marantina L.	48, 96	64	80				64		
Globba multifolia A.Takano & H.Okada									32, 48
Globba nisbetiana Craib			c 32						
Globba nuda K.Larsen			34						
Globba obscura K.Larsen			32						
Globba paniculata Valeton									32, 48
Globba patens Miq.			32, 48						48
Globba pendula Roxb.			32, 48				32		32
Globba platystachya Baker									32
Globba propinqua Ridl.							48		
Globba purpurascens Craib			32						
Globba racemosa Sm.				32		24		32	
Globba reflexa Craib			32						
Globba sessiliflora Sims	22								
Globba schomburgkii Hook.f.			48, c 64						
Globba substrigosa King ex Baker			28						
Globba talangensis A.Takano & H.Okada									48
Globba unifolia Ridl.			32						
Globba variabilis Ridl.			32, 48			48			
Globba winitii C.H.Wright	48	32	32				32		
Mantisia saltatoria Sims					20				
Mantisia spathulata (Roxb.) Schult.					20				
Mantisia wardii							20		

1.6.4.3 Geografie

Přibližné geografické rozšíření jenotlivých sekcí je znázorněno v práci Williams *et al.* (2004), viz obr. 1.22. V severní oblasti areálu se vyskytuje sekce Haplanthera a Mantisia, ve střední části Globba, ve střední a jižní části je sekce Nudae a na jihu se setkáme s sekcemi Ceratnthera a Sempervirens.



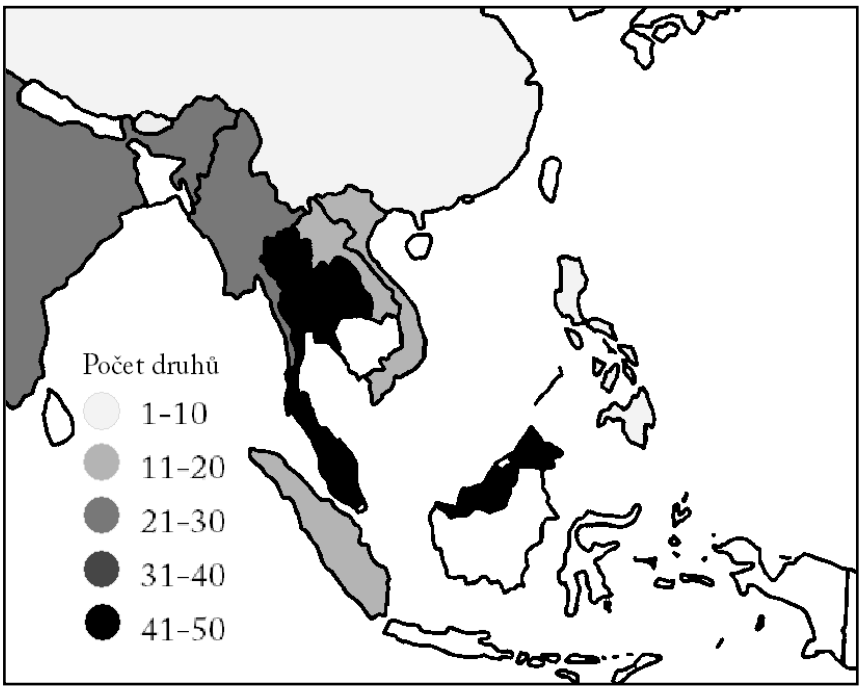
Obr 1.22: Rozšíření sekcí rodu *Globba* bez *Globba marantina* (Williams *et al.,* 2004) a mapa států jihovýchodní Asie (http://wwp.greenwichmeantime.com/time-zone/asia/).

Z flór, checklistů a dalších zdrojů byla sestavena tabulka 1.5, kde je soupis počtu druhů tribu Globbeae podle geografických oblastí. Výpis druhů pro jednotlivé geografické oblasti byl zhotoven jako příloha 1. Vhodná literatura nebyla nalezena pro Bangladéš, Kambodžu a Indonésii. Vzhledem

k tomu, že pro rod neexistuje žádná revize (novější než 1904), jsou údaje o rozšíření zatížené nevyřešenou synonymikou, neaktuálností literatury, odlišného pojetí některých taxonů v různých částech areálu, neprobádanými oblastmi apod. Získané informace proto nelze považovat za směrodatné, jsou spíše orientační. Na základě těchto dostupných údajů byla vytvořena mapka rozšíření s přibližnou hustotou druhů (obr. 1.23).

Tab. 1.5: Počty druhů rodů *Globba*, *Gagnepainia* a *Hemiorchis* podle států.

Oblast	*Globba*	endemitů	*Gagnepainia*	*Hemiorchis*	zdroj
Indie	24	6	--	2	In Singh *et* Kumar, 2010
Čína	5	2	--	--	Wu *et al.*, 1994+
Bhútán	5	?	--	1	Noltie, 1994
Barma (=Myanmar)	23	?	1	3	Kress *et al*., 2003
Vietnam	13	?	2	--	Ho, 1999
Laos	19	?	--	--	Newman *et al*, 2007
Thajsko	41	?	3	2	Larsen *et al.,* 2006; Sirirgusa, 1999
Malajsie	46	?	--	--	Newman *et al*., 2004
Filipíny	10	7	--	--	Ridley, 1909
Indonésie					
Sumatra	16				Takano *et* Okada, 2003
Borneo, Jáva	?				
Bangladéš	?				
Kambodža	?				



Obr 1.23: Mapka jihovýchodní Asie s vyznačenou druhovou hustotou rodu *Globba* v jednotlivých státech. Bílé oblasti neznamenají nepřítomnost rodu, ale chybějící údaje. Zdroj: vlastní.

2 Materiál a metodika

2.1 Materiál

Do analýz bylo zahrnuto 87 jedinců (2 druhy rodu *Gagnepainia,* 2 druhy rodu *Hemiorchis,* 28 druhů rodu *Globba* a 19 neurčených jedinců rodu *Globba*; příloha 2). Materiál pochází částečně z živých sbírek pěstovaných ve sklenících botanických zahrad zabývajících se čeledí Zingiberaceae a částečně z výjezdů do terénu. Nejbohatším zdrojem materiálu byla Královská botanická zahrada v Edinburghu (RBGE, kódy těchto jedinců začínají písmenem 'E' následovným 8 číslicemi), která shromažduje zástupce čeledi Zingiberaceae více než 40 let a je mimo jiné zásobena i ze Singapurské botanické zahrady (BGS). Mnoho druhů je shromážděno i v botanické zahradě v Praze v Tróji (PBG). Některé druhy pocházejí z výše zmíněných botanických zahrad, jiné z nedávných terénních exkurzí kolegů do JV Asie (Thajsko, Malajsie). Všechny duhy byly určeny nebo alespoň konzultovány s odborníkem na rod *Globba* hlavním evropským specialistou na cytotaxonomii a fylogenezi čeledi Zingiberaceae Markem Newmanem (*Royal Botanical Garden*, Edinburgh). Pro fylogenetické analýzy byly přidány sekvence DNA z databáze GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), které byly vybrány na základě práce Williams *et al*. (2004) z doplňujících materiálů online. Tyto materiály obsahují sekvence z důvěryhodných zdrojů, všechny jsou od autorů Kyle Williams (Duke University, North Carolina), John Kress (Smithsonian Institution, Washington), Atsuko Takano (Osaka City University, Japan), případně jejich spolupracovníků, proto lze předpokládat i správné určení druhů. Kódy použitých záznamů jsou v příloze 3. Celkem tedy bylo pracováno se 195 vzorky (z toho 12 tvoří mimoskupinu) a celkem 70 druhy tribu Globbeae. Taxony mimoskupiny byly zvoleny stejně jako v práci Williams *et al*. (2004) a to na základě výsledků fylogenetické studie čeledi Zingiberaceae (Kress *et al*., 2002). Mimoskupinu tvořili tři druhy podčeledi Alpinioideae a 9 druhů podčeledi Zingiberoideae.

Druhy, o které je fylogeneze tribu Globbeae (Williams *et al*., 2004) v této práci rozšířena, jsou *G. purpurascens, G. unifolia, G. corneri, G. kerrii, G. nisbetiana* a *G. sp. novum* (E20081114).

V letech 2011 a 2012 byly z živých rostlin odebrány listy a kořenové špičky. Materiál určený pro průtokovou cytometrii byl uzavřen do plastikových sáčků, skladován v chladu a zpracován do dvou týdnů. Kořenové špičky byly po níže popsané proceduře uskladněny v ledničce a zpracovány do cca 5 měsíců. Pletiva listu určené k izolaci DNA byly v množství cca 3 cm^2 plochy listu vysoušeny v sáčcích se silikagelem po dobu minimálně čtrnáct dní.

2.2 Metodika

2.2.1 Velikost genomu a průtoková cytometrie

Měření absolutní velikosti genomu bylo provedeno v cytometrické laboratoři botanického oddělení Národního muzea v Horních Počernicích. Byl následován postup, který popisuje např. Doležel *et al*.

(2007). Do Petriho misky bylo dáno přibližně 0,5–1 cm^2 plochy listu studované rostliny společně se stejným množstvím standardu [*Bellis perennis* (2C = 3,42 pg) nebo *Glycine max* (2C = 2,28 pg)], zalito 0,5 ml ledového pufru „Otto I“ (0,1 M monohydrát kyseliny citrónové, 0,5% Tween 20; Otto 1990) a rozsekáno ostrou žiletkou. Následně byla suspenze přefiltrována přes nylonový filtr (velikost oka 42 µm) a ponechána 10–20 min v pokojové teplotě. Pak bylo přidáno 960 µl barvícího roztoku [směs 20 ml pufru „Otto II“ (0,4 M $Na_2HPO_4.12H_2O$; Otto, 1990), 1 ml fluorescenčního barviva propidium jodidu (Sigma), 1 ml RNázy IIA (Sigma) a 40 µl ß-mercaptoethanolu (Sigma)]. Pro každý vzorek bylo měřeno minimálně 3500 jader. Vzorky byly analyzovány přístrojem Partec CyFlow® ML se zeleným laserem (532 nm) jako excitačním zdrojem a zpracovány pomocí softwaru Partec FloMax®.

Měření bylo opakováno ve třech různých dnech. Pokud se maximální naměřená 2C-hodnota lišila od minimální 2C-hodnoty jednoho vzorku o více než 2 %, byl vzorek změřen znovu, další den, a odlehlá hodnota byla z analýzy vyřazena. Téměř všechna měření (97 %) měla CV hodnoty (koeficient variance, *coefficient of variation*) standardu i vzorku menší než 3,5. Ostatní nepřesáhly 5.

Osvědčilo se vybírat středně staré listy, které lze uchovávat navlhčené v ziplockovém sáčku v lednici a analyzovat i po cca dvou týdnech. Vhodné se ukázalo použít materiál z báze listu studované rostliny a to ve stejném nebo o něco málo větším množství než standardu (*Bellis perennis / Glycine max*). Část listu o ploše přibližně 1,25 × 1,25 cm bylo lepší nasekat méně, než brát menší plochu listu a sekat více. Také bylo nezbytně nutné nasekaný a přefiltrovaný vzorek ve zkumavce nechat minimálně 10 min odstát v pokojové teplotě, než byl přidán barvící roztok. Naopak vůbec nevadilo, pokud přefiltrované vzorky stály delší dobu (půl dne). Barvící roztok se nechal působit vždy po dobu předchozí analýzy, tedy minimálně 7 minut při pokojové teplotě. Nejlepší výsledky pak byly získány při nastavení programu FloMax® (Partec) na rychlost 0,2–0,4 µl/s, kdy prošlo zhruba 10–15 jader za sekundu.

Monoploidní velikost genomu ($1C_x$-hodnota) byla spočtena jako 2C-hodnota vydělaná ploidním stupněm (Greilhuber *et al*., 2005), přičemž jako základní chromozómové číslo bylo zvoleno x = 8 (Lim, 1972; Williams *et al*., 2004). Absolutní velikost genomu byla změřena celkem u 87 jedinců (viz tab. 3.2).

Velikost genomu (2C i C_x) byla rozdělena do kategorií podle fylogenetických sekcí, testována na normální rozdělení (Shapirův-Wilkův test) a vizualizována krabicovými diagramy. Rozdíly mezi sekcemi byly testovány Kruscal-Wallisovým testem. Obdobně byly zpracovány hodnoty velikosti genomu rozdělené podle počtu chromozómů. Veškeré toto statistické zpracování bylo počítáno v programu PAST (Hammer *et al*., 2001).

2.2.2 Počty chromozómů

Kořínky byly během jara (2011 a 2012) odebrány z 50 jedinců (23 druhů a 19 neurčených jedinců) ve sklenících pražské botanické zahrady v Troji a Královské botanické zahrady v Edinburghu. Zpracovány byly do podzimu téhož roku. V ideálním případě byl odběr dělán dopoledne za slunečného počasí, kdy se předpokládá největší meristematická aktivita. U několika jedinců byl odběr opakován.

Postup při počítání chromozómů ve velké míře následoval návod pro praktická cvičení (Krahulcová, 1998). Čerstvě oddělené kořínky s mléčně zabarvenou kořenovou špičkou, indikující aktivní meristematické pletivo, byly na cca 2–3 hodiny vloženy do epruvet s nasyceným roztokem para-dichlorbenzenu a ponechány v pokojové teplotě. Poté byl tento roztok odpipetován a epruveta s materiálem byla několikrát opatrně propláchnuta destilovanou vodou. Následně byl materiál zafixován ve směsi 96% etanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1 a uložen na noc do chladničky. Ráno byla fixační směs nahrazena 70% etanolem, ve kterém byl materiál uchován až do dalšího zpracování (i několik měsíců).

Při maceraci se rozpustí střední lamela, která spojuje buňky a na podložním sklíčku je pak možné buňky rozprostřít do roviny. Macerace bylo docíleno ponořením kořínků ve směsi koncentrované HCl a 96% etanol (1:1) při laboratorní teplotě po dobu cca 15–30 sekund. Poté byly kořínky přemístěny do kádinky s vodou. Na podložním sklíčku byla v kapce vody žiletkou oddělena mléčně bílá špička, pomocí filtračního papíru odsána přebytečná voda, kořenová špička byla následně zakápnuta barvivem „lakto-propion-orcein“ a roztlačena přitlačením jehly na krycí sklíčko. Pro lepší probarvení bylo krycí sklíčko pomocí jehly a žiletky v jednom rohu nadzdviženo. Po barvení orceinem jsou chromozómy a interfázová jádra intenzivně tmavě červené. Lepších výsledků bylo dosaženo pozorováním vzorku pod mikroskopem až po několika hodinách po barvení nebo i další den, protože chromozómy byly zřetelněji probarvené. Lakto-propion-orcein je směs kyseliny mléčné (5 ml), kyseliny propionové (5 ml), orceinu (0,2 g) a destilované vody (9,5 ml). Použit byl mikroskop Olympus BX41TF s imerzním objektivem Plan N se zvětšením 100×, snímací kamera Olympus U-CMAD3 a software QuickPHOTO CAMERA 2.3 nebo mikroskop Olympus BX61 s imerzním objektivem se zvětšením 100× a software AnalySIS.

Do analýz evoluce velikosti genomu byly použity pouze vlastní počty chromozómů, žádné nebyly převzaty z literatury.

2.2.3 Fylogenetické analýzy

2.2.3.1 Izolace DNA

Zdrojem DNA byla rostlinná pletiva listu vysušená silikagelem. DNA byla vyizolována pomocí kitu Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek) v DNA laboratoři PřF UK v Praze. Přibližně 0,5 g suchého materiálu bylo vloženo do 2ml eppendorfek a následně drceno wolfram-karbidovými kuličkami

v mlýnku Retsch Mixer Mill 200 při 27 000 ot./min po dobu 2–3 minut, případně o něco déle, dokud nebyl na stěnách zkumavky jemný prášek. Dále postup následoval instrukce výrobce, s výjimkou několika drobných úprav: po 30 minutách v termomixu při 65°C a 1000 rpm, se vzorky minutu a půl centrifugovaly na 12 tis. rpm, „Lysis Buffer P" byl přidán v množství 500 µl místo 400 µl, „RNasy A" (10 mg/ml, Fermentas) bylo přidáno pouze 5 µl namísto doporučených 40 µl, „elučního pufru D" bylo přidáno 70 µl a před poslední centrifugací se vzorky nechaly místo 15 min odstát minimálně 30 min. Pro druhou eluci bylo přidáno 50 µl elučního pufru a vzorky se nechaly stát minimálně 45 minut.

U extrahované DNA byla pro kontrolu změřena koncentrace s pomocí spektrofotometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

2.2.3.2 PCR (*Polymerase Chain Reaction*) amplifikace

Pomocí dvojice specifických *primerů* dojde k namnožení určitého úseku DNA. Zvoleny byly 2 úseky DNA. Oblast ITS (*internal transcribed spacer*) ribozomální jaderné DNA a oblast *mat*K, která je součástí chloroplastové DNA. Pro jejich namnožení byly použity příslušné *primery* (koncentrace 25 pmol/µl): ITS4, ITS5, *trn*K1F a *trn*K2R (tab. 2.2).

Izolovaná DNA byla naředěna sterilní Mili-Q vodou na 5 ng/µl do objemu 20 µl. Namísto naředěné DNA byla v některých případech použita DNA z druhé eluce. K 19 µl (u úseku *mat*K k 20 µl) PCR mixu byl přidán 1 µl naředěné DNA. Složení PCR směsí viz tabulka 2.1.

Tab. 2.1: Složení PCR směsí pro úseky ITS a *mat*K.

ITS	**µl**
Sterilní Mili-Q H_2O	15,6
10× PCR *Buffer* JSRT	2,0
dNTP (10 mM)	0,4
Primer froward ITS 5 (25 pmol/µl)	0,25
Primer reverse ITS 4 (25 pmol/µl)	0,25
JumpStar RedTaq DNA Polymeráza (Sigma) (1U/µl)	0,5
celkem	**19**

***mat*K**	**µl**
Sterilní Mili-Q H_2O	15,8
Buffer IMMO	2,1
dNTP (10 mM)	0,4
$MgCl_2$ (50 mM)	1,2
Primer froward trnK1F (25 pmol/µl)	0,2
Primer reverse trnK2R (25 pmol/µl)	0,2
Immoláza	0,1
celkem	**20**

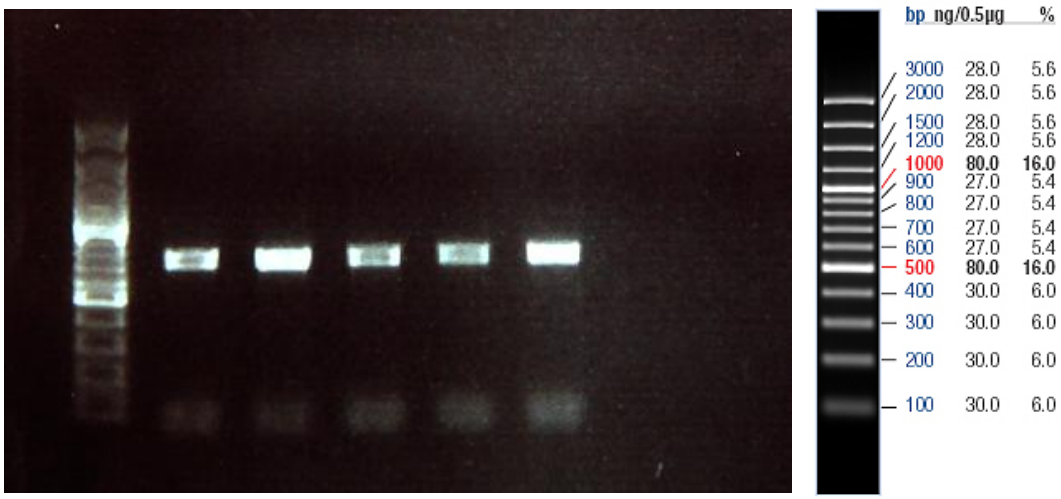
PCR proběhla v závislosti na úseku DNA s následujícími teplotními cykly.

ITS			**matK**		
94°C	1:00		95°C	7:00	
94°C	0:45		95°C	1:00	
50°C	0:45	35×	60°C	1:00	35×
72°C	0:50		68°C	2:00	
72°C	10:00		72°C	10:00	

Pro analýzy byly používány termocyklery Eppendorf mastercycler, Eppendorf Mastercycler ep S – gradientový a Techne Touchgene – gradientový.

Pomocí elektroforézy byla zhodnocena kvalita PCR produktů. Záporně nabité fragmenty DNA putují v elektrickém poli ke kladné elektrodě. Kratší fragmenty jsou mobilnější a gelem putují rychleji, dlouhé fragmenty se naopak pohybují pomaleji. Výsledkem úspěšné amplifikace by měla být přítomnost příslušně dlouhých molekul DNA.

PCR produkty byly po 3 µl naneseny na 1% agarózový gel (s jednou kapkou ethidium bromidu) v 1×TAE pufru. Jako velikostní standard sloužil žebříček O'GeneRuler™ 100bp Ladder Plus (Fermentas). Pro vizualizaci DNA byl gel vložen do UV transiluminátoru (Herolab UVT-20M) a za pomoci přístroje Gel Logic 100 (Kodak) a softwaru 1D Image Analysis (Kodak) nasnímán do počítače. Ukázka vizualizace namnoženého ITS úseku je na obrázku 2.1.



Obr. 2.1: Příklad vizualizace PCR amplifikace u jedinců rodu *Globba*. Na agarósovém gelu jsou patrné naamplifikované fragmenty úseku ITS o délce zhruba 800 bp. Vpravo je schéma použitého žebříčku O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

2.2.3.3 Přečištění PCR produktů

Přečištěním se produkt zbaví zbylých primerů a nevyužitých dNTP. Princip přečištění spočívá v tom, že přebytečné úseky DNA (kratší než 100 bazí) protečou kolonkou, čímž jsou ze směsi eliminovány. K přečištění byl použit purifikační kit Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid). Postup následoval instrukce výrobce. Na závěr byla změřena koncentrace DNA na Nanodropu 1000 (Thermo Scientific).

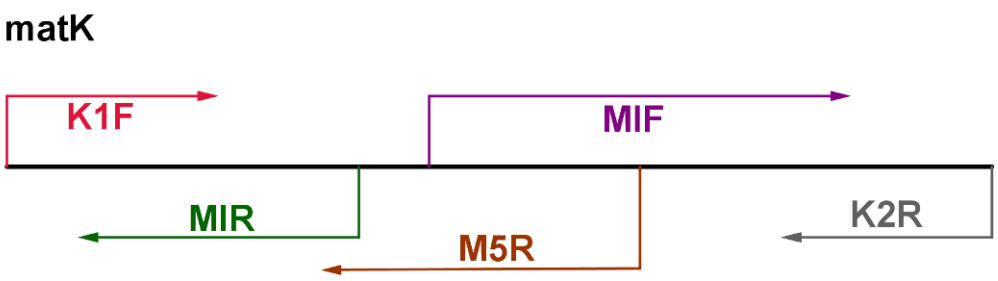
2.2.3.4 Sekvenační reakce

PCR produkt byl naředěn sterilní Mili-Q vodou do objemu 13 µl tak, aby do reakce vstoupilo minimálně 110 ng. K této směsi byl přidán vždy 1 µl příslušného sekvenačního primeru (3,2 pmol/µl, tabulka 2.2). Sekvenování proběhlo v sekvenační laboratoři PřF UK v Praze, Viničná 7 (šestnáctikapilární sekvenátor 3130xl Genetic Analyzer od firmy Applied Biosystems).

Pro osekvenování úseku ITS byly použity 2 primery (tab. 2.2). Úsek *mat*K byl sekvenován pomocí 5 primerů (obr. 2.2, tab. 2.2).

Tab. 2.2: Sekvence primerů použitých pro PCR a sekvenaci.

Úsek	**název *primeru***	**sekvence**	**zdroj**
ITS	ITS4	5‘- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3‘	White *et al*., 1990
	ITS5	5‘- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3’	White *et al*., 1990
***mat*K**	trnK1F	5‘- CTCAACGGTAGAGTACTCG-3‘	Manos *et* Steele, 1997
	trnK2R	5‘- AACTAGTCGGATGGAGTAG-3‘	Steele *et* Vilgalys, 1994
	mIF	5‘- GTTCAGTACTTGTGAAACGTT-3‘	Kress *et al*., 2002
	m5R	5‘- AGGATCCTTGAAAATCCATAG-3‘	Kress *et al*., 2002
	mIR	5‘- CGTTTCACAAGTACTGAACTA-3	Kress *et al*., 2002



Obr. 2.2: Schéma sekvenačních reakcí úseku cpDNA *mat*K (vlastní obrázek). Sekvence primerů jsou v tab. 2.2.

2.2.3.5 Práce se sekvencemi

Obdržené sekvence ze sekvenátoru ve formátu *.ab1 byly zkontrolovány prohlédnutím v programu FinchTV (http://www.geospiza.com/finchtv). V programu Seqman (součást balíku DNAstar) byly vytvořeny tzv. „contigy" (spojené *forward* a *reverse* sekvence), které byly následně uloženy do FASTA formátu. Pomocí algoritmu **MAFFT** (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*; http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/) byl automaticky vytvořen *alignment* (seřazení homologních bazí pod sebe). *Alignment* byl kontrolován prohlížením v programu **BioEdit** (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/), kde byly ručně provedeny drobné úpravy.

2.2.3.6 Fylogenetické stromy

Ze získaných matic sekvencí byly vytvořeny fylogenetické stromy třemi různými metodami. Byly to **Bayesovská analýza** (*Bayesian inference,* BI), **maximální parsimonie** (MP) a **maximální věrohodnost** (*maximum likelihood,* ML). Každá z metod byla aplikována postupně na několik souborů dat. Celkově bylo vytvořeno pět souborů sekvencí:

1) *mat*K sekvence všech dostupných taxonů (145 taxonů),
2) ITS sekvence všech dostupných taxonů (195 taxonů),
3) spojené *mat*K-ITS sekvence všech dostupných taxonů (139 taxonů),
4) spojené *mat*K-ITS vlastní sekvence, u kterých byla změřena 2C-hodnota (65 taxonů),
5) spojené *mat*K-ITS vlastní sekvence, u kterých byla zjištěna C_x-hodnota, ale vybrané tak, aby co nejméně zkreslovaly výsledky testu vlivu evoluce, tzn. ze stejných druhů se stejně velkým genomem a totožným umístěním na stromě byl ponechán pouze jeden (39 taxonů).

Na první dva soubory byly aplikovány všechny tři metody, na třetí soubor pouze Bayesovská analýza a na poslední dva pouze maximální parsimonie. Získané stromy byly prohlíženy a upravovány v programu FigTree (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/) a Dendroscope (Huson *et* Scornavacca, 2012). Do závěrečné podoby byly upraveny v Adobe Illustrator (Adobe CS5).

Pro kontrolu, zda jsou topologie získané na základě ITS a *mat*K úseků dostatečně podobné, aby mohly být analyzovány ve spojeném souboru, byl udělán ILD (*incongruence lenght difference*) test spojeného souboru dat (Farris *et al*., 1994) v PAUP. Signifikantní výsledek ($p < 0,01$) indikuje velké rozdíly v topologiích. V tom případě není spojení úseků vhodné, protože se každý vyvíjel odlišně a může být lepší interpretovat evoluci úseků samostatně (Darlu *et* Lecointre, 2002).

Pro Bayesovskou a ML analýzy byl vybrán evoluční model porovnáním *log likelihood* skóre v programu ModelTest (Posada *et* Crandall, 1998) nebo MrModelTest 2.3 (Nylander, 2004). Nejvhodnější model evoluce byl vybrán na základě principu Akaike information criterion (AIC).

V případě maximální parsimonie byly okódovány indely v programu SeqState (http://www.nees.unibonn.de/downloads/SeqState) pomocí algoritmu „*simple indel coding*“ (Simmons *et* Ochoterena, 2000).

2.2.3.6.1 Bayesovská analýza

Výpočet byl proveden v programu MrBayes v.3.2.1 (Huelsenbeck *et* Ronquist, 2001). Substituční model byl na základě výsledků Modeltestu vybrán GTR + I + G (nst = 6 rate = invgamma). Variabilita substitucí vzhledem k jejich pozici byla ošetřena gama distribucí a do výpočtu byla zahrnuta proporce invariabilních pozic. Teplota byla zvolena tak, aby si studený řetěz občas měnil pozici se třemi teplými, což znamená, že teplé řetězce se využívají a tedy metoda *Metropolis coupling* se správně uplatňuje. Počet generací byl nastaven na 5 000 000 nebo 10 000 000, zapisovala se každá stá generace a prvních 25 % generací bylo smazáno jako *burn-in*. Hodnoty posteriorní pravděpodobnosti menší než 90 % byly považovány za slabé podpory a na stromech jsou vyznačeny čárkovaně. Pro spojený soubor sekvencí *mat*K a ITS úseku bylo využito příkazu „*lset applyto*“, který umožní nastavit jiné parametry pro různé části sekvence DNA.

Příklad použitých příkazů:

```
begin mrbayes;
log start filename=matK.log;
set autoclose=yes nowarn=yes;
help lset;
lset nst= 6 rates=invgamma;
help mcmc;
mcmcp ngen=10000000 Temp=0.01 samplefreq=100 printfreq=1000 nchains=4
savebrlens=yes;
mcmc;
sump burnin=25000;
sumt burnin=25000;
End;
```

2.2.3.6.2 Maximální Parsimonie

Analýza proběhla v programu PAUP* v. 4.0b10 (Swofford, 2002). Jako outgroup byly vybrány 3 taxony patřící do podčeledi Alpinioideae, počet opakování *random addition sequence* byl nastaven na 1000, maximální počet stromů byl omezen na 500 – 10 000 podle velikosti souboru dat, metoda výměny větví byla ponechána TBR (*tree bisection reconnection*) a bootstrap byl počítán z tisíce opakování. Hodnoty bootstrapu menší než 80 % byly považovány za slabé podpory a na stromech jsou vyznačeny čárkovaně.

Příklad použitých příkazů:

```
Begin PAUP;
log file=ITS.log;
cstatus;
Set autoclose=yes warnreset=no increase=auto;
Outgroup 24634653_Amomum_longiopetiolatum
24634721_Siamanthus_siliquosus  24634729_Vanoverberghia_sepulchrei;
Set criterion=parsimony;
```

```
Set maxtrees=500 increase=no;
Hsearch addseq=random nreps=1000;
Roottrees outroot=paraphyl;
Describetrees 1/plot=phylogram brlens=yes;
Savetrees brlens=yes file=its.tre;
Contree/strict=yes majrule=yes percent=50 treefile=consensus.trees;
Cleartrees;
Bootstrap nreps=1000 search=faststep treefile=Bootstrap.tre;
End;
```

2.2.3.6.3 Maximum Likelihood

Maximum likelihood (největší věrohodnost) analýza proběhla v programu GARLI v0.69 (*Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference*; Zwickl, 2006). Zvoleno bylo 5 000 000 generací, tvorba počátečního stromu s nastavením „streefname=random“, parametr „genthreshfortopoterm“ byl zvýšen na 100000, jinak bylo ponecháno původní nastavení (Zwickl, 2008). Celá analýza byla vypočtena desetkrát a byly porovnány hodnoty věrohodnosti pro ověření kvality stromu. Výpočet bootstrapu proběhl ze 100 opakování a se sníženými hodnotami následujících parametrů, které bootstrap zpomalují, ale mají minimální vliv na kvalitu: attachmentspertaxon = 10 a genthreshfortopoterm = 20 000. Bootstrap menší než 80 % byl považován za slabou podporu větve a byl vyznačen přerušovanou čárou.

2.2.4 Vyhodnocení evoluce velikosti genomu

Následující testy byly aplikovány na soubor dat s 65 taxony (se známou 1C-hodnotou) a soubor 39 vybraných taxonů (u kterých byla k dispozici C_x-hodnota). Oba soubory byly testovány na normální rozdělění (Shapirův-Wilkův test v programu PAST). Velikosti genomu byly před analýzami zlogaritmovány (Oliver *et al.,* 2007). Grafické znázornění velikosti genomu (2C, C_x, 2C/2n) na fylogenetickém stromu bylo vypracováno v programu Mesquite (Maddison *et* Maddison, 2007) pomocí *squared-change* nebo *linear* parsimony. Pro další testování byla 2C-hodnota převedena na 1C-hodnotu. Programy použité pro výpočty byly BayesTraits (Pagel *et al*., 2004), caper (Orme, 2012) a geiger (Harmon *et al*. 2008). Tyto softwary vyžadují jako jeden ze vstupních souborů strom s uloženou délkou větví. Tento strom kvůli programu BayesTraits nesmí obsahovat polytomie, proto byl vybrán jeden z maximálně parsimonických stromů.

2.2.4.1 Test trendu evoluce

Pomocí softwaru BayesTraits byl zvolen model evoluce (A versus B), volba modelu byly testovány *likelihood ratio* testem „LR = 2[log-likelihood(lepší model) – log-likelihood(horší model)]“, který lze v tomto případě aproximovat χ^2 testem. Signifikance (*p*-hodnota) byla zjištěna pomocí webové aplikace pro výpočet χ^2 hodnot (http://www.fourmilab.ch/). Ze dvou nabízených algoritmů výpočtu (*maximum likelihood* a *mcmc*) byl vybrán *maximum likelihood*.

2.2.4.2 Odhady škálovacích parametrů

Parametry lambda, kappa a delta (viz kapitola 1.3.3.1) byly odhadnuty ML algoritmem v programech BayesTraits a caper (funkce 'pgls'). V BayesTraits byly odhady testovány *likelihood ratio* testem (LRT) a v caper byl vypočítán 95% konfidenční interval. Postup v caper byl inspirován návodem popsaným Charlesem Nunnem (http://nunn.rc.fas.harvard.edu, Nunn, 2011) a návodem k balíku caper (Orme, 2012).

Použité příkazy, které načtou data, pomocí ML odhadnou parametry λ, κ a δ, jejich 95% intervaly a nakreslí jejich grafy, jsou:

```
library("caper")
library("ape")

tr = read.nexus ("s.tre")
write.tree (tr, file = "tree.tre")
tr1 = read.tree ("tree.tre")
a <- read.table ("logCx.txt",sep = "\t", header = TRUE)

sumdata <- comparative.data (phy = tr1, data = a, names.col = taxon,
vcv = TRUE, na.omit = FALSE, warn.dropped = TRUE)
model.lambda <- pgls (cvalue~1, data = sumdata, lambda= "ML")
summary (model.lambda)

mod.l <- pgls.profile (model.lambda, "lambda")
plot (mod.l)
dev.copy (png, "lambda.png")
dev.off()

sumdata_3d <- comparative.data (phy = tr1, data = a, names.col =
taxon, vcv.dim = 3, vcv = TRUE, na.omit = FALSE, warn.dropped = TRUE)
model.kappa <- pgls (cvalue~1, data = sumdata_3d, kappa= "ML")
summary (model.kappa)

mod.k <- pgls.profile (model.kappa, "kappa")
plot (mod.k)
dev.copy (png, "kappa.png")
dev.off()

sumdata <- comparative.data (phy = tr1, data = a, names.col = taxon,
vcv = TRUE, na.omit = FALSE, warn.dropped = TRUE)
model.delta <- pgls (cvalue~1, data = sumdata, delta = "ML", bounds =
list(lambda=c(0.001,1), kappa=c(1e-6,3), delta=c(1e-6,7)))
summary (model.delta)

mod.d <- pgls.profile (model.delta, "delta")
plot (mod.d)
dev.copy (png, "delta.png")
dev.off()
```

2.2.4.3 Rekonstrukce ancestrální velikosti genomu

V programu BayesTraits byla velikost předka (parametr α) odhadnuta na základě ML i *mcmc* algoritmů u souboru s 1C i C_x-hodnotami. Hodnota *log-likelihood* modelu a parametr α byly u *mcmc* metody stanoveny jako průměrná hodnota všech získaných (v programu Tracer, Rambaut *et* Drummond, 2007).

Pomocí balíku geiger, respektive funkce ‚getAncStates' byly vypočteny ancestrální velikosti genomu (každého nodu i kořene) na principu maximální věrohodnosti a vykresleny na strom. Použitá série příkazů:

```
library("geiger")
data = read.csv("logcx.csv")
tree = read.nexus("s.nex")
gas_call = getAncStates(data$cvalue, tree)
plot(tree)
nodelabels(round(10^gas_call, digits=3), adj = c(1.1, -0.5), frame =
"c", cex=0.1)
nodelabels(round(10^gas_call, digits=3), adj = c(1.1, -0.5), frame =
"none", cex=1.0)
```

3 Výsledky

3.1 Fylogenetické analýzy

Pro *mat*K sekvence byl metodou *Akaike information criterion* (AIC) vybrán jako nejlepší evoluční model GTR + I + G (*General Time Reversible* s gamma korekcí a proporcí invariabilních pozic; Tavaré 1986). Pro ITS sekvence vyšel jako nejlepší evoluční model SYM + I + G (= *Symmetrical model*; Zharkikh, 1994). Model SYM se od známějšího modelu GTR liší tím, že uvažuje stejnou frekvenci bazí.

Počet druhů v jednotlivých analýzách a charakteristiky *alignmentů* (počet bazí, počet variabilních pozic, počet parsimonicky informativních pozic) jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Skupina *Hemiorchis* a *Gagnepainia* vyšla ze všech analýz jako monofyletická a sesterská k sobě navzájem, ale s nevyjasněným postavením vzhledem k rodu *Globba* a ostatním zástupcům Zingiberoideae, jak již bylo diskutováno dříve (Kress *et al*., 2002, Williams *et al*., 2004). Ze všech analýz bylo rozlišeno 7 očekávaných sekcí (Williams *et al*., 2004) a navíc se vytvořila větev s *Globba nisbetiana* (v dřívějších analýzách zahrnuta nebyla), která se s vysokou podporou vyčleňuje mimo sedm rozeznávaných sekcí. V následujícím textu je s touto skupinou pracováno jako s potenciálně novou sekcí Nisbetiana a je označena uvozovkami. Pro ITS úsek byla tato skupina v polytomii se sekcemi Globba, Nudae a Sempervirens, pro *mat*K úsek byla z některých výsledků, ale s minimální podporou, sesterská ke skupině Haplanthera a Mantisia. Sekce Haplanthera a Mantisia se vždy s vysokou podporou řadily k sobě, někdy se k nim do polytomie přidala i sekce Substrigosa. Obě podsekce sekce Nudae vytvářely nepříliš dobře podpořenou monofyletickou skupinu. *Globba racemosa* (FCM 362), která byla zahnuta pouze do ITS souboru, se řadí k rodu *Hedychium*, pravděpodobně došlo k nějaké záměně nebo chybnému určení.

3.1.1 ITS soubor dat

Nejparsimoničtější stromy měly délku 1029 kroků (konzistenční index CI = 0,5423 a retenční index RI = 0,8739). Striktní konsenzuální strom s bootstrapovými podporami je na obrázku 3.1. V tomto případě bylo nejvýraznější odlišností od ostatních dvou metod na ITS úseku postavení sekce Ceratanthera, která se objevila jako sesterská ke všem ostatním Globbám (ovšem s minimální podporou), jinak byla sekce Ceratanthera sesterská sekcím Haplanthera a Mantisia. Také *Globba fragilis* zde nebyla sesterská k sekci Nudae. Nicméně podpory větví v účastněných skupinách byly malé, proto se nejedná o rozpor v datech.

Výsledkem Bayesovské analýzy úseku ITS byla hodnota „*Average standard deviation of split frequencies*“ = 0,005850, což je výrazně menší než 0,01, a to znamená, že oba běhy analýzy došly v podstatě ke stejnému výsledku. Průměrná marginální pravděpodobnost jednotlivých běhů byla -

6302,96 a -6296,11. Celkový počet uložených stromů byl 150002. Topologie stromu (obr 3.2) byla v zásadě shodná a ML a rozdíly od MP jsou popsány výše.

V ML analýze dosáhl nejvěrohodnější strom hodnoty *L* = -5914,98. Topologie stromu (obr 3.3) je v podstatě stejná jako z Bayesovské analýzy.

3.1.2 *mat*K soubor dat

Stromy ze všech tří metod měly velmi podobnou topologii.

Nejparsimoničtější stromy měly délku 1434 kroků (konzistenční index CI = 0,7078 a retenční index RI = 0,8673). Striktní konsenzuální strom s bootstrapovými podporami je na obrázku 3.4. Sekce Ceratanthera vyšla (s malou bootstrapovou podporou) sesterská ke všem ostatním sekcím, u jiných metod byla řazena na úroveň ostatních sekcí.

V Bayesovské analýze vyšla hodnota „*Average standard deviation of split frequencies*“ = 0,002695 výrazně menší než 0,01, což znamená, že oba běhy analýzy došly ke stejnému výsledku. Průměrná marginální pravděpodobnost jednotlivých běhů je -12258,83 a -12261,04. Celkový počet uložených stromů byl 150002. Konsenzuální strom je na obrázku 3.5. Skupina s druhem *Globba nisbetiana* zde nebyla na rozdíl od ostatních metod sesterským taxonem k sekcím Haplanthera a Mantisia.

Nejvěrohodnější strom (obr. 3.6) z ML metody dosáhl hodnoty *L* = -11410,20. Sekce substrigosa vytvořila skupinu se sekcí Ceratanthera, ale opět bez silné podpory.

3.1.3 Rozdíly mezi ITS a *mat*K soubory

Výsledky úseku *mat*K sekvencí daly vzniknout stromům s méně polytomiemi, především v koncových větvích, než ITS sekvence. Například sekce Ceratanthera se v případě *mat*K úseku rozdělila na dvě poměrně dobře podpořené větve chybějící v ITS souboru.

Globba nuda (FCM 485) byla celkem překvapivě v ITS analýzách zjištěna v sekci Globba namísto sekce Nudae, kde byla správně zařazena při analýzách *mat*K úseku. Podobně *G. propinqua* (FCM 101) se v případě ITS analýz zařadila do sekce Sempervirens, kam tento druh patří, ale v druhém případě (*mat*K sekvence) byla umístěna do sekce Nudae, do blízkosti *G. paniculata*.

Dalším rozdílem mezi topologiemi založenými na různých sekvencích (ITS, *mat*K) bylo sesterské postavení sekce Sempervirens a Nudae u *mat*K a v polytomii s ostatními sekcemi, na rozdíl od ITS úseku, kde byly v odvozené skupině (poměrně dobře podpořené) sekce Sempervirens, Nudae a Globba a „Nisbetiana“. Sekce Substrigosa u ITS souboru vyšla sesterská sekci Mantisia zatímco u *mat*K úseku byla v polytomii s ostatními sekcemi. Větve působící další drobné rozdíly v topologii měly malé statistické podpory.

V některých sekcích se několik taxonů v jednom z úseků shlukovalo a v druhém se rozpadlo do několika skupinek, tyto shluky byly někdy i poměrně dobře podpořené. Mezi takové sekce patřily Globba, Sempervirens a Ceratanthera.

3.1.4 Spojený soubor *mat*K-ITS

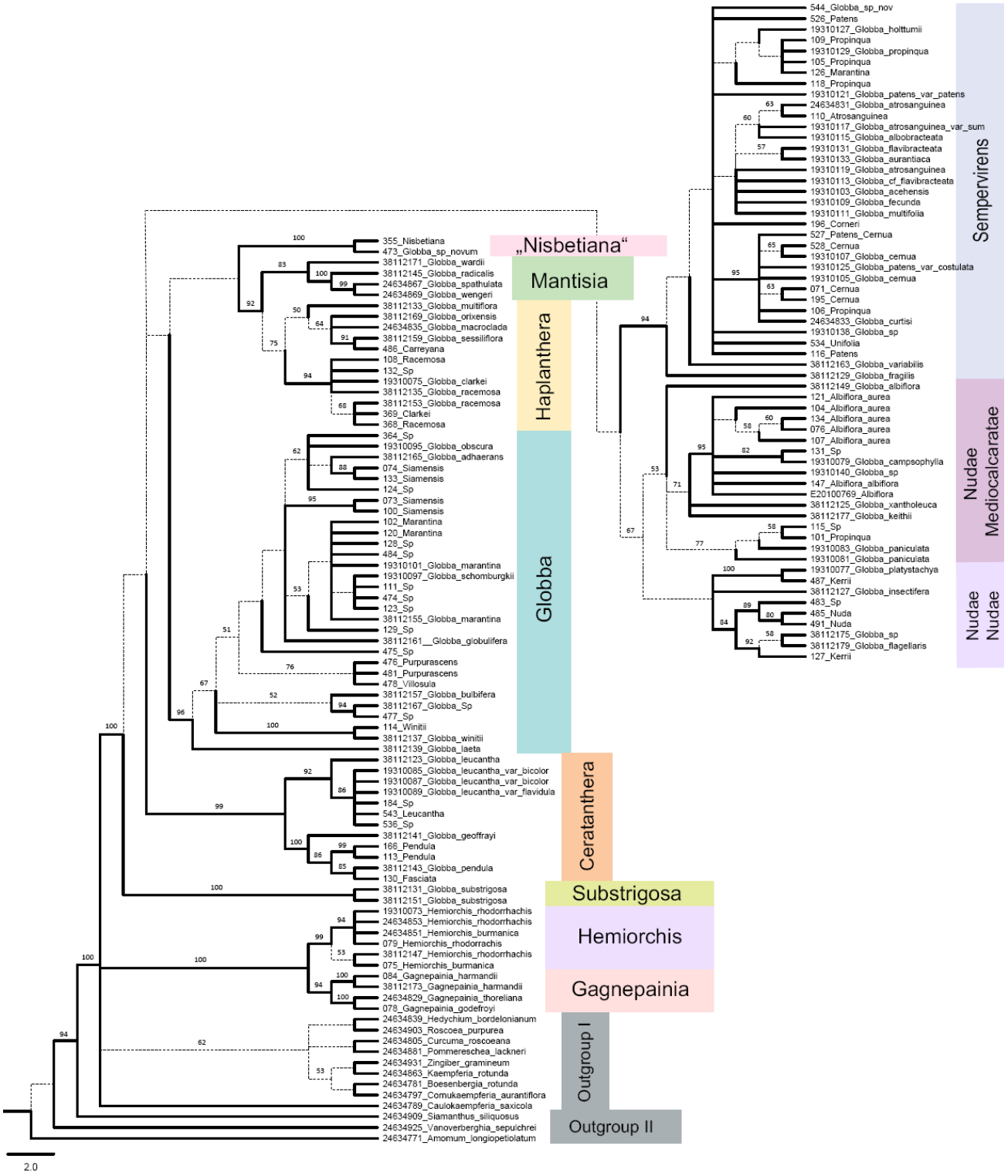
Pro kontrolu, zda je možné oba soubory dat spojit a analyzovat společně, byl udělán ILD test homogenity v programu PAUP. Výsledek byl signifikantní (p=0,001), což znamená, že jsou topologie ITS a *mat*K stromů v konfliktu a není vhodné tyto dva úseky spojovat. Po odstranění taxonů způsobující největší rozdíly (*Globba nuda* FCM 485, *G. propinqua* FCM 101, *G. xantoleuca*, *G. insectifera* a *G. fragilis*) vyšel test opět signifikantní. Soubory dat proto nebyly všemi třemi metodami analyzovány společně.

Jako kompromisní řešení byla zvolena analýza v programu MrBayes využívající možnost nastavit jiné parametry pro různé části vstupní sekvence DNA (příkaz „*lset applyto*“). Hodnota „*Average standard deviation of split frequencies*“ = 0,124289 sice není menší než 0,05, ale znamená to pouze, že se našly dvě topologie dobře odpovídající vstupním datům a výsledný strom pak může mít horší podpory a více polytomií. Průměrná marginální pravděpodobnost obou běhů je -20476,58. Konsenzuální strom je na obrázku 3.7. Nejvýraznější rozdíl oproti jednotlivým DNA úsekům se vyskytl v sekci Nudae, kde se nevytvořily dvě podsekce (Nudae a Mediocalcaratae). V polytomii s těmito skupinami byla i sekce „Nisbetiana“.

Pro soubor 65 taxonů, kde byla k dispozici 2C-hodnota a redukovaný soubor 39 taxonů, kde byla známa C_x-hodnota, byla použita maximální parsimonie na soubor dat se spojenými úseky *mat*K a ITS i přes signifikantní výsledek ILD testu. Topologie těchto stromů poměrně dobře odpovídaly topologiím získaných z jednotlivých úseků DNA. Vždy se poměrně spolehlivě vylišily sekce, někdy se ukázalo vetší množství polytomií a nižší podpory větví.

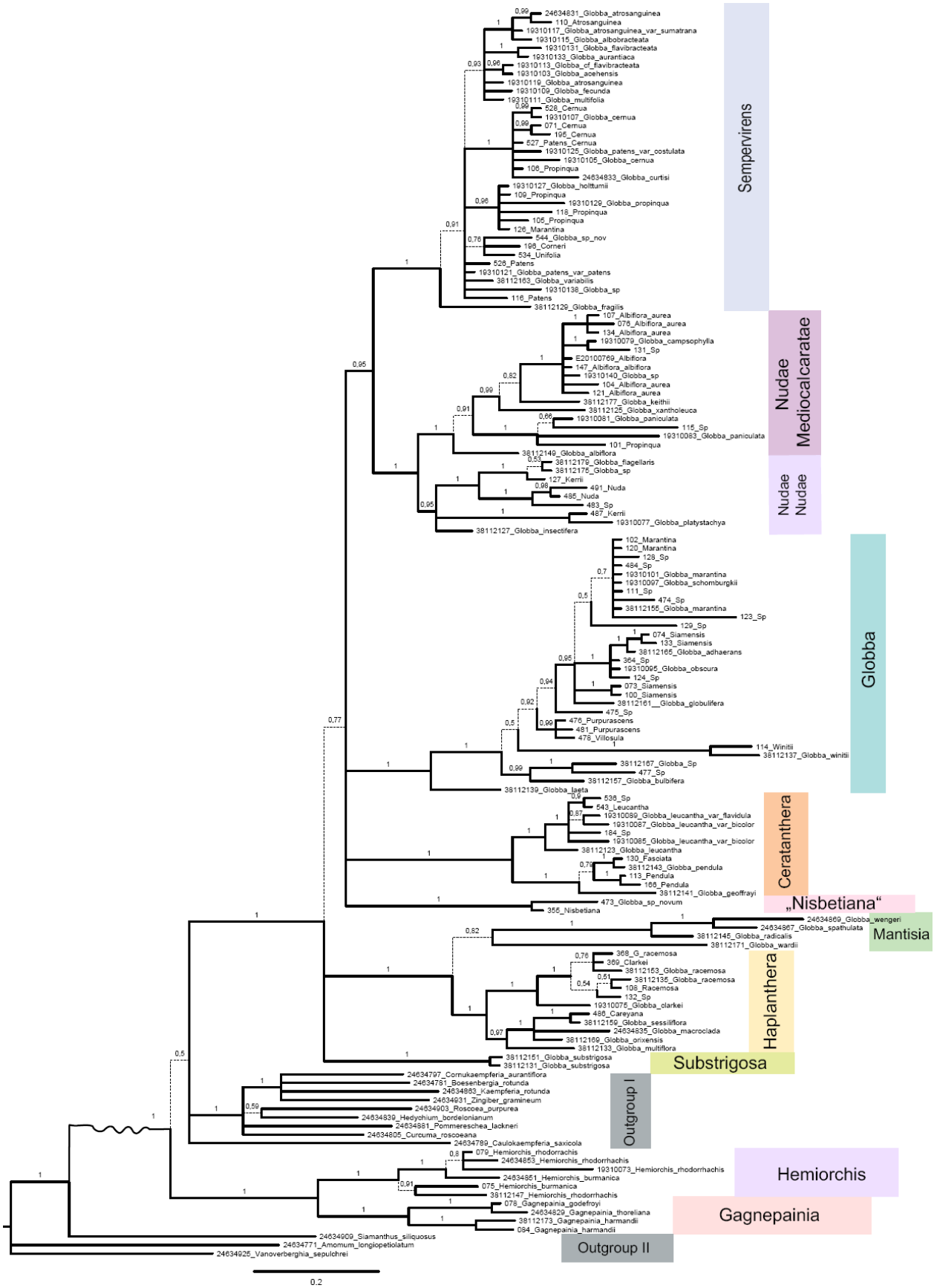
Tabulka 3.1: Charakteristiky všech souborů dat a výsledky fylogenetických analýz. Pro jednotlivé metody (BI, MP, ML) je uvedena velikost souboru, počet vlastních sekvencí, počet sekvencí z GenBanku, délka *alignmentu*, počet variabilních pozic, unikátních pozic, parsimonicky informativních pozic a hodnoty hlavních statistik.

		Počet taxonů							
	Soubor dat	Celkem	Tato práce	Převzato z Genbank	Délka [bazí]	Počet var. pozic	Počet unik. pozic	Parsim. inform. pozic	Výsledek
BI									*Average standard deviation of split frequencies*
	ITS	195	72	123	673		405		0,00585
	***mat*K**	145	67	78	3169		1153		0,00269
	ITS+*mat*K	139	68	71	3999		456 + 1142		0,12429
MP									Konzistenční a retenční index
	***mat*K**	145	67	78	3406	919		404	CI = 0,708, RI = 0,867
	ITS	195	72	123	787	402		266	CI = 0,542, RI = 0,874
	„2C“	65	65	0	3723	701		314	CI = 0,782, RI = 0,899
	„C_x“	39	39	0	3715	636		313	CI = 0,786, RI = 0,855
ML									*L*
	ITS	195	72	123	711	329	427	268	-5914,977
	***mat*K**	145	67	78	3153	684	1146	440	-11410,200

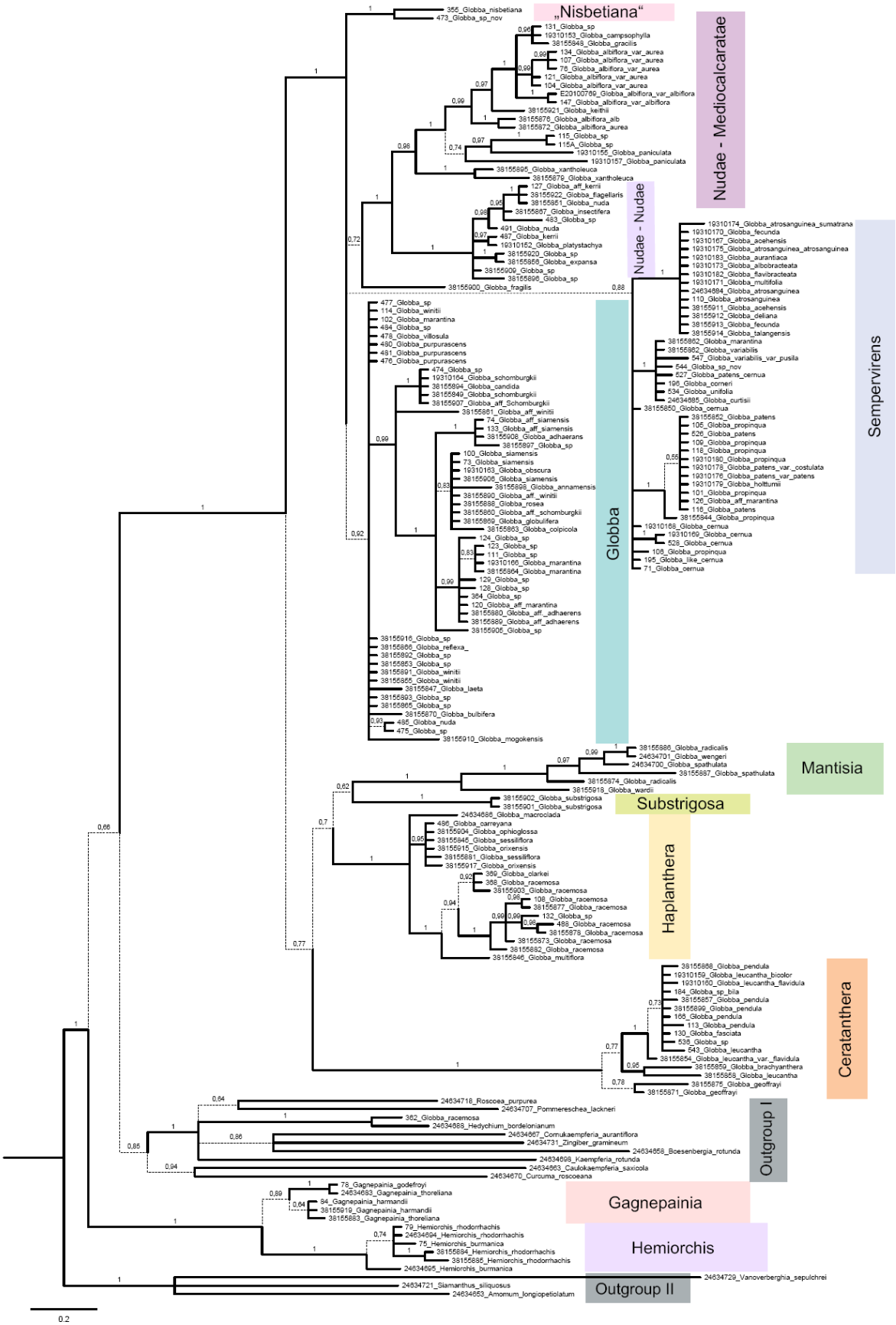


Obr 3.1: Striktní konsenzuální strom tribu Globbeae získaný metodou maximální parsimonie na základě úseku cpDNA *mat*K. Nad větvemi jsou vynesené bootstrapové hodnoty > 50 %. Větve s bootstrapovou hodnotou menší něž 80 % byly považovány z slabé podpory a jsou označeny přerušovanou čarou. Jména sekcí následují terminologii vytvořenou v práci Williams *et al*. (2004). Taxony převzaté z databáze Genbank začínají osmimístným identifikačním GI (*GenInfo Identifier*) kódem. Ostatní začínají dvoj-trojmístným FCM kódem.

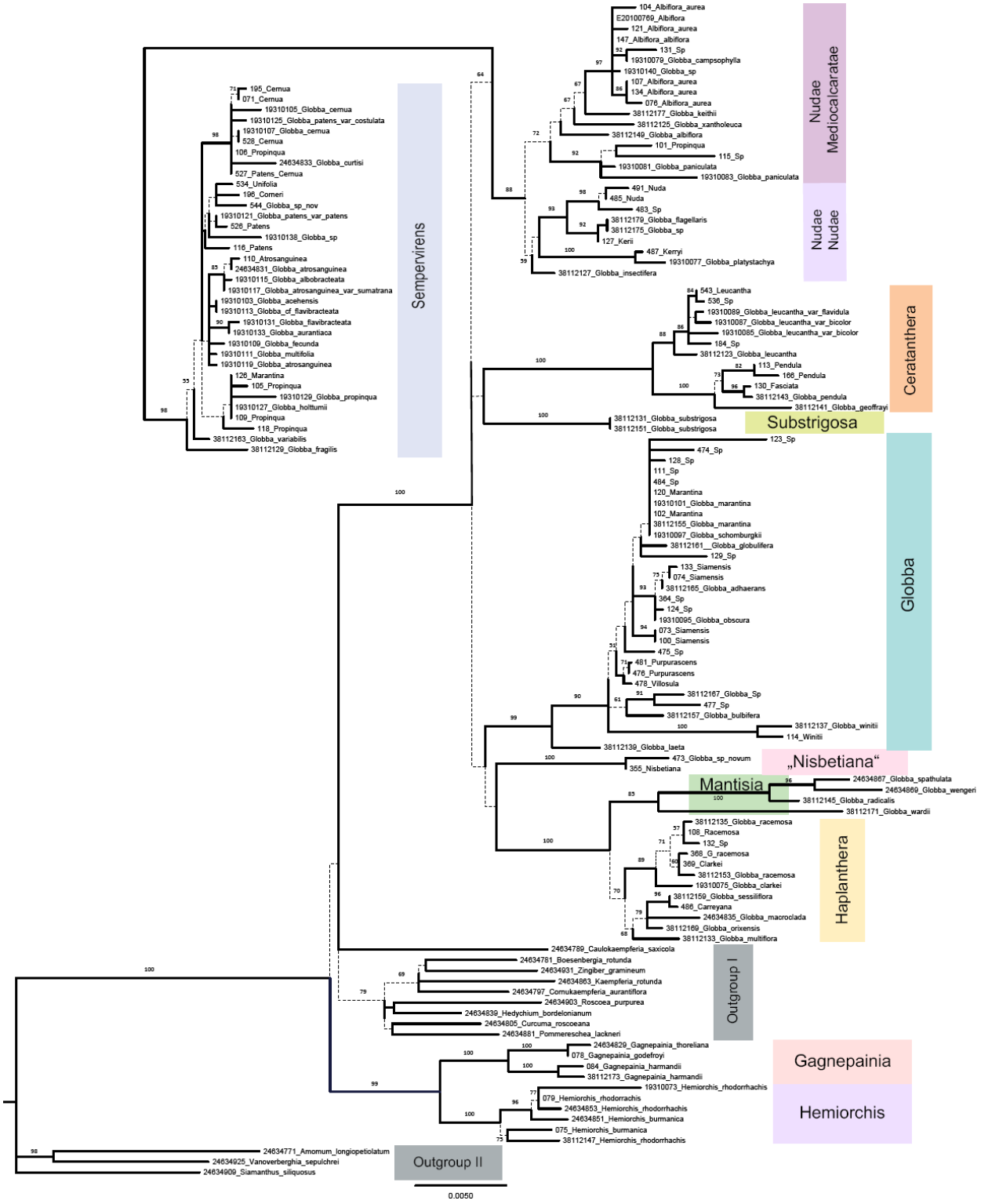
Obr 3.2: Striktní konsenzuální strom tribu Globbeae získaný metodou maximální parsimonie na základě úseku jaderné DNA ITS. Nad větvemi jsou vynesené bootstrapové hodnoty > 50 %. Větve s bootstrapovou hodnotou menší něž 80 % byly považovány za slabé podpory a jsou označeny přerušovanou čarou. Jména sekcí následují terminologii vytvořenou v práci Williams *et al*. (2004). Taxony převzaté z databáze Genbank začínají osmimístným identifikačním GI (*GenInfo Identifier*) kódem. Ostatní začínají dvoj-trojmístným FCM kódem.



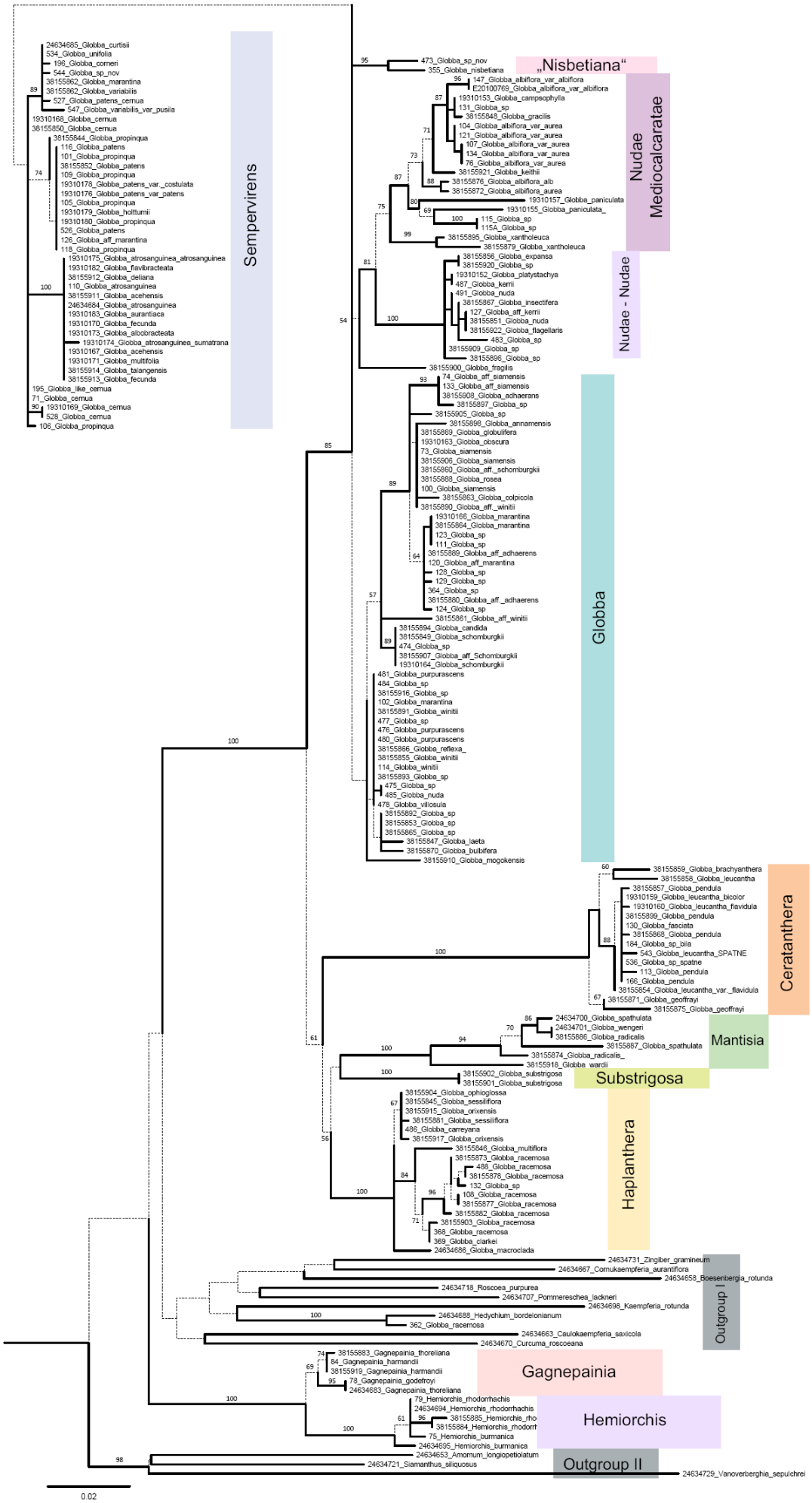
Obr 3.3: Konsenzuální strom tribu Globbeae vytvořený Bayesovskou metodou na základě úseku cpDNA *mat*K. Čísla na větvích jsou posteriorní pravděpodobnosti. Pravděpodobnosti menší než 95 % jsou považovány za slabé podpory větví a jsou vyznačeny čárkovaně. Jména sekcí následují terminologii vytvořenou v práci Williams *et al.* (2004). Taxony převzaté z databáze Genbank začínají osmimístným identifikačním GI (*GenInfo Identifier*) kódem. Ostatní začínají dvoj-trojmístným FCM kódem.



Obr 3.4: Konsenzuální strom tribu Globbeae vytvořený Bayesovskou metodou na základě úseku jaderné DNA ITS. Čísla na větvích jsou posteriorní pravděpodobnosti. Pravděpodobnosti menší než 95 % jsou považovány za slabé podpory větví a jsou vyznačeny čárkovaně. Jména sekcí následují terminologii vytvořenou v práci Williams *et al*. (2004). Taxony převzaté z databáze Genbank začínají osmimístným identifikačním GI (*GenInfo Identifier*) kódem. Ostatní začínají dvoj-trojmístným FCM kódem.

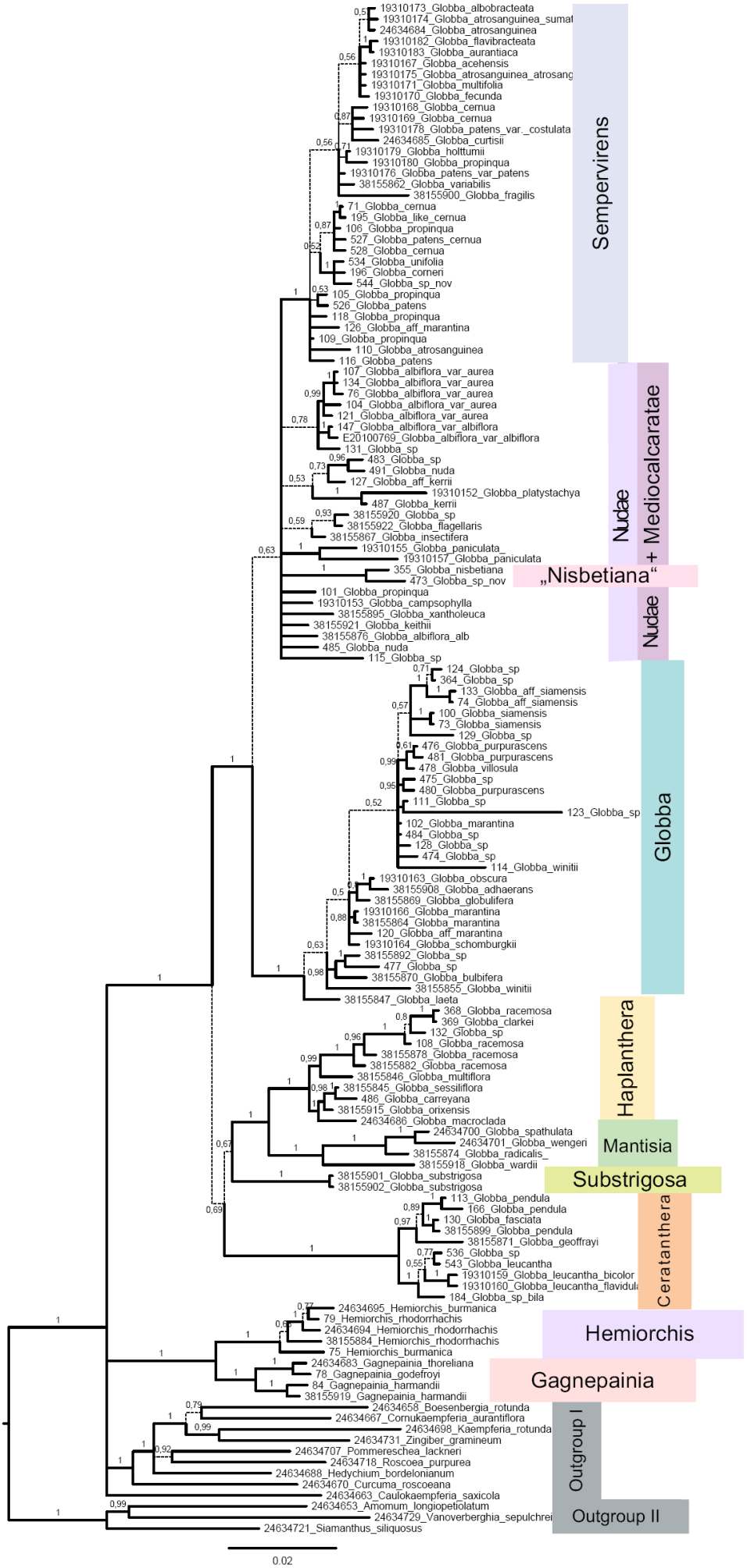


Obr 3.5: Nejvěrohodnější strom tribu Globbeae získaný metodou maximální věrohodnosti (ML) na základě úseku cpDNA *mat*K. Nad větvemi jsou vynesené bootstrapové hodnoty > 50 %. Větve s bootstrapovou hodnotou menší něž 80 % byly považovány za slabé podpory a jsou označeny přerušovanou čarou. Jména sekcí následují terminologii vytvořenou v práci Williams *et al*. (2004). Taxony převzaté z databáze Genbank začínají osmimístným identifikačním GI (*GenInfo Identifier*) kódem. Ostatní začínají dvoj-trojmístným FCM kódem.


Sempervirens
„Nisbetiana“
Nudae Mediocalcaratae
Nudae - Nudae
Globba
Ceratanthera
Mantisia
Substrigosa
Haplanthera
Outgroup I
Gagnepainia
Hemiorchis
Outgroup II
0.02

Obr 3.6: Nejvěrohodnější strom tribu Globbeae získaný metodou maximální věrohodnosti (ML) na základě úseku jaderné DNA ITS. Nad větvemi jsou vynesené bootstrapové hodnoty > 50 %. Větve s bootstrapovou hodnotou menší něž 80 % byly považovány za slabé podpory a jsou označeny přerušovanou čarou. Jména sekcí následují terminologii vytvořenou v práci Williams *et al*. (2004). Taxony převzaté z databáze Genbank začínají osmimístným identifikačním GI (*GenInfo Identifier*) kódem. Ostatní začínají dvoj-trojmístným FCM kódem.

Obr 3.7: Konsenzuální strom tribu Globbeae vytvořený Bayesovskou metodou na základě spojení sekvencí úseků ITS a *mat*K. Čísla na větvích jsou posteriorní pravděpodobnosti. Pravděpodobnosti menší než 95 % jsou považovány za slabé podpory větví a jsou vyznačeny čárkovaně. Jména sekcí následují terminologii vytvořenou v práci Williams *et al*. (2004). Taxony převzaté z databáze Genbank začínají osmimístným identifikačním GI (*GenInfo Identifier*) kódem. Ostatní začínají dvoj-trojmístným FCM kódem.


19310173_Globba_albobracteata
19310174_Globba_atrosanguinea_sumat
24634684_Globba_atrosanguinea
19310182_Globba_flavibracteata
19310183_Globba_aurantiaca
19310167_Globba_acehensis
19310175_Globba_atrosanguinea_atrosang
19310171_Globba_multifolia
19310170_Globba_fecunda
19310168_Globba_cernua
19310169_Globba_cernua
19310178_Globba_patens_var._costulata
24634685_Globba_curtisii
19310179_Globba_holttumii
19310180_Globba_propinqua
19310176_Globba_patens_var_patens
38155862_Globba_variabilis
38155900_Globba_fragilis
71_Globba_cernua
195_Globba_like_cernua
106_Globba_propinqua
527_Globba_patens_cernua
528_Globba_cernua
534_Globba_unifolia
196_Globba_corneri
544_Globba_sp_nov
105_Globba_propinqua
526_Globba_patens
118_Globba_propinqua
126_Globba_aff_marantina
109_Globba_propinqua
110_Globba_atrosanguinea
116_Globba_patens
Sempervirens
107_Globba_albiflora_var_aurea
134_Globba_albiflora_var_aurea
76_Globba_albiflora_var_aurea
104_Globba_albiflora_var_aurea
121_Globba_albiflora_var_aurea
147_Globba_albiflora_var_albiflora
E20100769_Globba_albiflora_var_albiflora
131_Globba_sp
483_Globba_sp
491_Globba_nuda
127_Globba_aff_kerrii
19310152_Globba_platystachya
487_Globba_kerrii
38155920_Globba_sp
38155922_Globba_flagellaris
38155867_Globba_insectifera
19310155_Globba_paniculata_
19310157_Globba_paniculata
355_Globba_nisbetiana
473_Globba_sp_nov
Nudae + Mediocalcaratae
„Nisbetiana“
101_Globba_propinqua
19310153_Globba_campsophylla
38155895_Globba_xantholeuca
38155921_Globba_keithii
38155876_Globba_albiflora_alb
485_Globba_nuda
115_Globba_sp
Nudae
124_Globba_sp
364_Globba_sp
133_Globba_aff_siamensis
74_Globba_aff_siamensis
100_Globba_siamensis
73_Globba_siamensis
129_Globba_sp
476_Globba_purpurascens
481_Globba_purpurascens
478_Globba_villosula
475_Globba_sp
480_Globba_purpurascens
111_Globba_sp
123_Globba_sp
102_Globba_marantina
484_Globba_sp
128_Globba_sp
474_Globba_sp
114_Globba_winitii
19310163_Globba_obscura
38155908_Globba_adhaerans
38155869_Globba_globulifera
19310166_Globba_marantina
38155864_Globba_marantina
120_Globba_aff_marantina
19310164_Globba_schomburgkii
38155892_Globba_sp
477_Globba_sp
38155870_Globba_bulbifera
38155855_Globba_winitii
38155847_Globba_laeta
Globba
368_Globba_racemosa
369_Globba_clarkei
132_Globba_sp
108_Globba_racemosa
38155878_Globba_racemosa
38155882_Globba_racemosa
38155846_Globba_multiflora
38155845_Globba_sessiliflora
486_Globba_carreyana
38155915_Globba_orixensis
24634686_Globba_macroclada
Haplanthera
24634700_Globba_spathulata
24634701_Globba_wengeri
38155874_Globba_radicalis_
38155918_Globba_wardii
Mantisia
38155901_Globba_substrigosa
38155902_Globba_substrigosa
Substrigosa
113_Globba_pendula
166_Globba_pendula
130_Globba_fasciata
38155899_Globba_pendula
38155871_Globba_geoffrayi
536_Globba_sp
543_Globba_leucantha
19310159_Globba_leucantha_bicolor
19310160_Globba_leucantha_flavidul
184_Globba_sp_bila
Ceratanthera
24634695_Hemiorchis_burmanica
79_Hemiorchis_rhodorrhachis
24634694_Hemiorchis_rhodorrhachis
38155884_Hemiorchis_rhodorrhachis
75_Hemiorchis_burmanica
Hemiorchis
24634683_Gagnepainia_thoreliana
78_Gagnepainia_godefroyi
84_Gagnepainia_harmandii
38155919_Gagnepainia_harmandii
Gagnepainia
24634658_Boesenbergia_rotunda
24634667_Cornukaempferia_aurantiflora
24634698_Kaempferia_rotunda
24634731_Zingiber_gramineum
24634707_Pommereschea_lackneri
24634718_Roscoea_purpurea
24634688_Hedychium_bordelonianum
24634670_Curcuma_roscoeana
Outgroup I
24634663_Caulokaempferia_saxicola
24634653_Amomum_longiopetiolatum
24634729_Vanoverberghia_sepulchrei
24634721_Siamanthus_siliquosus
Outgroup II
0.02

3.2 Počty chromozómů

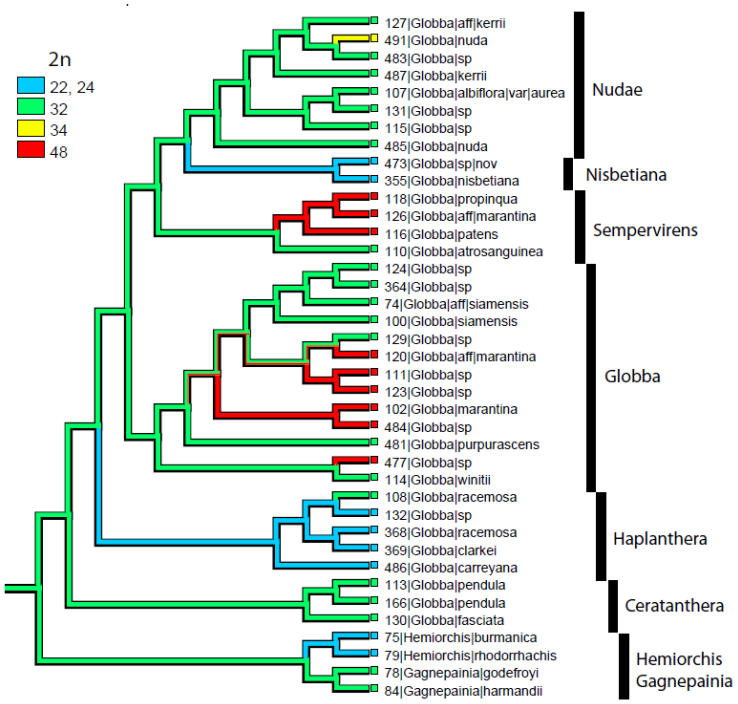
Počty chromozómů se podařilo získat celkem pro 66 jedinců (16 druhů a 13 neurčených jedinců). Zjištěné počty shrnuje tabulka 3.2. Některé vzorky se z jihovýchodní Asie podařilo dovézt pouze v listu na cytometrii a DNA, ale nebylo možné odebrat kořínky na karyologii, proto je tabulka 3.2 nekompletní. Dostupné druhy (i s kořínky) se podařilo spočítat téměř všechny.

U druhů *Gagnepainia godefroyi* a *Globba aff. siamensis* (E19991176) počet 2n = 28 a 2n = 32 určila Vlasta Jarolímová (Botanický ústav AV ČR, Průhonice).

Bohužel se ani v takto relativně velkém souboru dat nepodařilo najít jeden druh se dvěma cytotypy (2n = 32 a 2n = 48), jak bylo dříve již několikrát publikováno (viz kapitola 1.6.4.2).

Nové počty byly zjištěny pro *Hemiorchis burmanica* E19991652 (2n = 24), *Gagnepainia harmandii* E19991163 (2n = c 28), *Gagnepainia godefroyi* T-11-51 (2n = 32), *Globba siamensis* (2n = 32), *G. atrosanguinea* (2n = 32, dříve pouze 2n = 48, viz tab. Z) *G. nisbetiana* (2n = 20-24, dříve 2n = c 32, viz tab. Z) a *G. sp. novum* E20081114 (2n = 32). Ostatní zjištěné počty byly v souladu s dříve uvedenými. Fotografie vybraných figur metafázických chromozómů jsou v příloze 4.

Pro sekci Haplanthera byl zjištěn charakteristický počet 2n = 24. V sekcích Sempervirens a Globba se vyskytovali jedinci s 32 i 48 chromozómy. V sekci Ceratanthera byl nalezen pouze jeden počet chromozómů 2n = 32 a v sekci Nudae 32 nebo 34. Ve skupině Nisbetiana bylo zjištěno c 24 chromozómů. Globba nuda je jediným druhem s 34 chromozómy. Situaci přehledně demonstruje fylogenetický strom s vynesenými chromozómovými počty (obr 3.14).



Obr 3.14: Rekonstrukce evoluce počtu chromozómů. Počty chromozómů jsou vyneseny na jeden z maximálně parsimonických fylogenetických stromů podsouboru se známými C_x-hodnotami. Obrázek byl vytvořen v programu Mesquite 2.75 pomocí lineární parsimonie.

3.3 Velikost genomu

Z 87 cytometricky změřených jedinců měl nejmenší absolutní velikost genomu (2C-hodnotu) druh *Hemiorchis rhodorhachis* (2C = 0,98 pg), v rodě *Globba* to byla *Globba nuda* (2C = 1,11 pg). Největší velikost genomu byla zjištěna u druhu *Globba sp.* (E20110277), kde 2C = 3,84 pg. Průměrná hodnota činila 2C = 2,35 pg a medián 2C = 2,14 pg.

Nejmenší monoploidní velikost genomu byla Cx = 0,139 pg (*Globba nuda*), největší C_x = 0,475 pg (*Globba careyana = sessiliflora*), průměr C_x = 0,262 pg a medián C_x = 0,255 pg. Všechny naměřené hodnoty jsou v tabulce 3.2.

Byla zjištěna minimální průměrná velikost chromozómu 2C/2n = 0,035 pg ≈ 34,23 Mbp, maximální 2C/2n = 0,130 pg ≈ 127,14 Mbp, průměrná 2C/2n = 0,065 pg ≈ 63,57 Mbp a medián 2C/2n = 0,065 pg ≈ 63,57 Mbp.

Velikost genomu (2C) pro stejné druhy z různých lokalit byla obvykle velmi podobná. Jediný druh, u kterého se zjistil různě velký genom je *Globba racemosa*. Tito 2 jedinci se lišili i počtem chromozómů. Jednalo se o *Globba racemosa* E20011052, kde bylo naměřeno 2C = 2,08 pg s 2n = 24 a *Globba racemosa* E19962254 s 2C = 3,154 pg a 2n = c 32–34, což je více než 1,5 násobný rozdíl ve velikosti genomu a rozdíl osmi chromozómů.

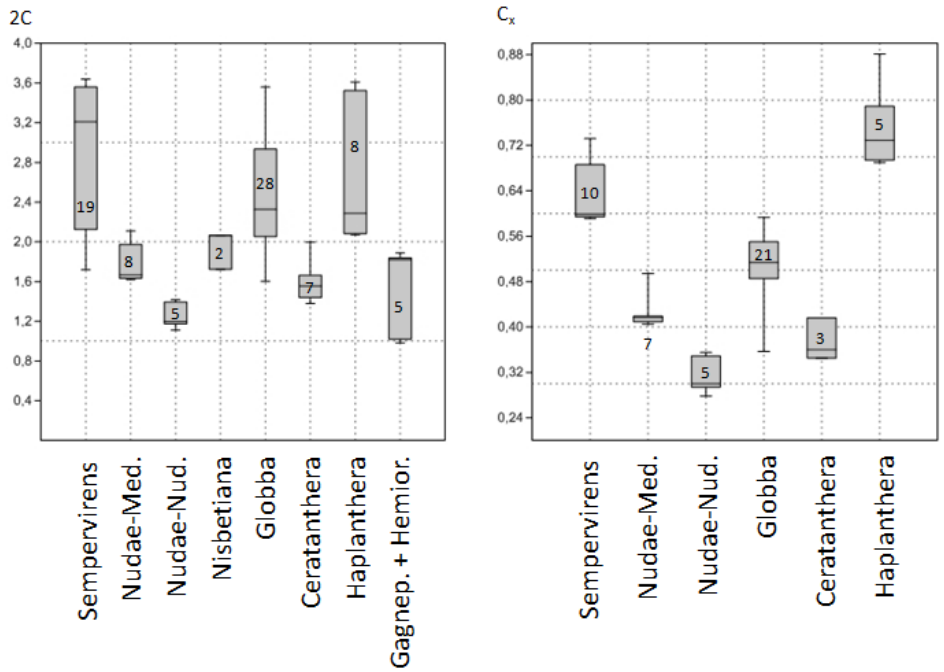
Tab. 3.2: Tabulka velikosti genomu a počtu chromozómů studovaných zástupců tribu Globbeae. Řazeno po sekcích. St = standard při průtokové cytometrii, B = *Bellis perennis*, G = *Glycine max.* C_x = 1C/ploidie, 2C/2n = průměrná velikost chromozómu (v pikogramech). Pro taxony, které nebyly zařazeny do sekce, nebyla k dispozici DNA.

FCM kód	identifikační kód	druh	St	2C ± s.e.	$1C_x$	2n	2C/2n
Sekce Ceratanthera							
FCM 630	E20110273	*Globba brachyanthera*	B	1,998 ± 0,004			
FCM 543	KL20100197	*Globba leucantha*	B	1,554 ± 0,005			
FCM 130	E19860743	*Globba fasciata*	B	1,664 ± 0,004	0,208	c 32	0,052
FCM 113	E20081102	*Globba pendula*	B	1,380 ± 0,006	0,173	32	0,0431
FCM 166	JLS 529	*Globba pendula*	B	1,441 ± 0,004	0,18	32	0,045
FCM 536	KL20102320	*Globba sp.*	B	1,559 ± 0,004			
FCM 184	JLS 186	*Globba sp.*	B	1,464 ± 0,005			
Průměr				1,58	0,187		0,047
Sekce Globba							
FCM 120	E20081066	*Globba aff. marantina*	B	2,908 ± 0,009	0,242	48	0,0606
FCM 126	E19871259	*Globba aff. marantina*	G	3,559 ± 0,009	0,297	c 48	0,0742
FCM 706	ex PBG	*Globba bulbifera*	B	2,141 ± 0,004	0,178	44–48	0,0446
FCM 123	E20081050	*Globba marantina*	B	2,935 ± 0,008	0,245	c 48	0,0611
FCM 102	E19613981	*Globba marantina*	B	3,061 ± 0,004	0,255	c 48	0,0638
FCM 249	Dang 256	*Globba marantina*	B	2,959 ± 0,01	0,247	c 48	0,0616
FCM 704	Dang 423	*Globba marantina*	B	2,917 ± 0,007	0,243	c 48	0,0608
FCM 476	T-11-12	*Globba purpurascens*	B	1,603 ± 0,002	0,2	32	0,0501
FCM 480	T-11-54	*Globba purpurascens*	B	1,691 ± 0,007	0,211	32	0,0529
FCM 481	T-11-64	*Globba purpurascens*	B	1,623 ± 0,005	0,203	32	0,0507
FCM 705	Ex PBG BG Turku	*Globba schomburgkii*	B	2,142 ± 0,002			
FCM 073	E20060813	*Globba siamensis*	B	2,198 ± 0,008	0,275	32	0,0687

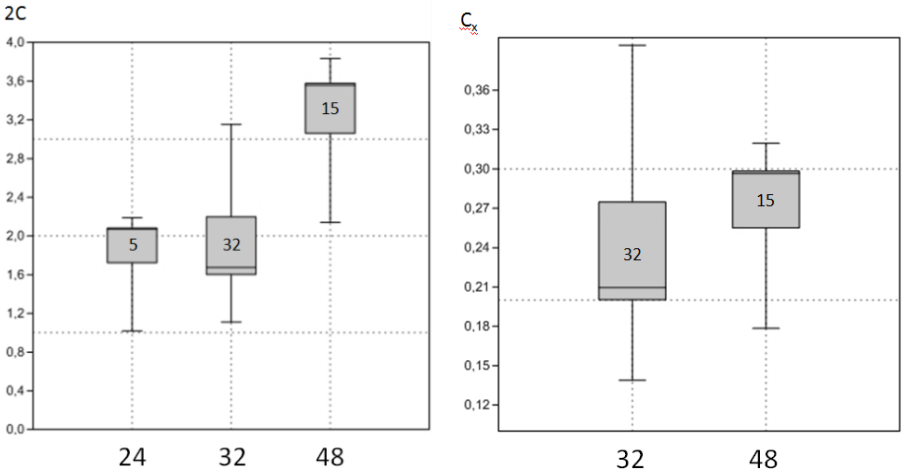
FCM 100	E20060813A	*Globba siamensis*	B	2,168 ± 0,006	0,271	32	0,0678
FCM 479	T-11-153	*Globba siamensis*	B	2,155 ± 0,006	0,269	32	0,0673
FCM 124	E20091357	*Globba siamensis*	B	2,353 ± 0,004	0,294	32	0,0735
FCM 074	E19991176	*Globba aff. siamensis*	B	2,336 ± 0,008	0,292	32	0,073
FCM 133	E19991176A	*Globba aff. siamensis*	B	2,290 ± 0,003	0,286	32	0,0716
FCM 128	E20081055	*Globba sp.*	B	2,929 ± 0,001	0,244	c 48	0,061
FCM 111	E20081125	*Globba sp.*	B	2,919 ± 0,005	0,243	c 48	0,0608
FCM 129	E20081114	*Globba sp. nov*	B	2,327 ± 0,009	0,291	32	0,0727
FCM 364	E20091380	*Globba sp.*	B	2,054 ± 0,004	0,257	32	0,0642
FCM 474	T-11-35	*Globba sp.*	B	3,042 ± 0,014			
FCM 475	T-11-66-7	*Globba sp.*	B	2,405 ± 0,005			
FCM 477	T-11-20	*Globba sp.*	B	3,130 ± 0,011	0,261	48	0,0652
FCM 484	T-11-47	*Globba sp.*	B	3,116 ± 0,009	0,26	c 48	0,0649
FCM 478	T-11-18	*Globba villosula=adhaerens*	B	1,844 ± 0,009			
FCM 114	E19594068	*Globba winitii*	B	1,966 ± 0,003	0,246	32	0,0614
FCM 482	T-11-162	*Globba winitii*	B	1,947 ± 0,008	0,243	32	0,0608
Průměr				2,454	0,252		0,063
Sekce Haplanthera							
FCM 486	T-11-137	*Globba careyana=sessiliflora*	B	2,849 ± 0,01	0,475	c 22	0,1295
FCM 369	E19920039	*Globba clarkei*	B	2,071 ± 0,003	0,345	24	0,0863
FCM 338	JŠ 71405	*Globba macroclada*	G	3,610 ± 0,009			
FCM 369	E19920039	*Globba clarkei*	B	2,071 ± 0,003	0,345	24	0,0863
FCM 108	E19962254	*Globba racemosa*	B	3,154 ± 0,008	0,394	32–34	0,0986
FCM 368	E20011052	*Globba racemosa*	B	2,083 ± 0,006	0,347	24	0,0868
FCM 488	T-11-6	*Globba racemosa*	B	2,288 ± 0,007			
FCM 132	E19991625	*Globba sp.*	B	2,188 ± 0,004	0,365	24	0,0912
FCM 362	E19962152	*Globba racemosa*	G	3,525 ± 0,005	0,441	c 32	0,0734
Průměr				2,721	0,394		0,094
Sekce „Nisbetiana“							
FCM 355	T-11-10	*Globba nisbetiana*	B	1,724 ± 0,007	0,287	20–24	0,0718
FCM 473	T-11-138	*Globba sp. nov.*	B	2,064 ± 0,006	0,344	c 24	0,086
Průměr				1,894	0,316		0,079
Sekce Nudae-mediocalcaratae							
FCM 147	VL 2415	*Globba albiflora*	B	2,110 ± 0,01			
FCM 104	E20081062	*Globba albiflora var. aurea*	B	1,651 ± 0,003	0,206	32	0,0516
FCM 121	E20081112	*Globba albiflora var. aurea*	B	1,676 ± 0,004	0,21	32	0,0524
FCM 076	E20060805	*Globba albiflora var. aurea*	B	1,674 ± 0,008	0,209	32	0,0523
FCM 107	E20060805A	*Globba albiflora var. aurea*	B	1,634 ± 0,002	0,204	32	0,051
FCM 134	E20060805B	*Globba albiflora var. aurea*	B	1,619 ± 0,006	0,202	32	0,0506
FCM 250	Dang 425	*Globba albiflora var. aurea*	B	1,666 ± 0,001	0,208	32	0,0521
FCM 115	E20010323	*Globba sp.*	B	2,928 ± 0,015	0,366	32	0,0915
FCM 131	E19972553	*Globba sp.*	B	1,974 ± 0,004	0,247	32	0,0617
Průměr				1,751	0,212		0,053
Sekce Nudae-nudae							
FCM 127	E19991624	*Globba aff. kerrii*	B	1,199 ± 0,001	0,15	c 32	0,0375
FCM 487	T-11-63	*Globba kerrii*	B	1,395 ± 0,003	0,174	c 32	0,0436
FCM 485	T-11-34	*Globba nuda*	B	1,110 ± 0,002	0,139	c 32	0,0347
FCM 491	T-11-11	*Globba nuda*	B	1,174 ± 0,003	0,147	34–36	0,0345
FCM 483	T-11-46	*Globba sp. „orange nuda“*	B	1,418 ± 0,006	0,177	c 32	0,0443
Průměr				1,259	0,157		0,039
Sekce Sempervirens							
FCM 033	Borneo, VR	*Globba atrosanguinea*	B	2,742 ± 0,005	0,343	32	0,0857
FCM 110	E19820784	*Globba atrosanguinea*	B	2,759 ± 0,004	0,345	32	0,0862
FCM 071	PŠ 006/2010	*Globba cernua (brachycarpa)*	B	3,209 ± 0,007			
FCM 528	M-11-6	*Globba cernua*	G	3,342 ± 0,008			
FCM 195	Jaap 5396	*Globba aff. cernua*	B	3,147 ± 0,006			
FCM 196	JLS 586	*Globba corneri*	B	2,124 ± 0,004			
FCM 490	T-11-158	*Globba fragilis*	B	1,721 ± 0,009			
FCM 116	E19680620	*Globba patens*	G	3,580 ± 0,01	0,298	c 48	0,0746

FCM 340	Yala prov.	*Globba patens*	B	3,640 ± 0,007	0,303	c 48	0,0758
FCM 526	M-11-4	*Globba patens*	G	3,595 ± 0,015	0,3	c 48	0,0749
FCM 527	M-11-5	*Globba patens × cernua*	G	3,231 ± 0,002			
FCM 101	E19841252	*Globba propinqua*	G	3,548 ± 0,009	0,296	c 48	0,0739
FCM 105	E19772463	*Globba propinqua*	G	3,558 ± 0,008	0,297	48	0,0741
FCM 109	E19841210	*Globba propinqua*	G	3,564 ± 0,008	0,297	48	0,0742
FCM 118	E19841255	*Globba propinqua*	G	3,561 ± 0,015	0,297	48	0,0742
FCM 544	KL20090599	*Globba sp. nov.*	B	2,099 ± 0,004			
FCM 534	KL20100822	*Globba unifolia*	B	2,034 ± 0,01			
FCM 547	EX PBG Johor	*Globba variabilis var. pusilla*	B	2,007 ± 0,006			
Průměr				2,968	0,314		0,079
Rod *Gagnepainia*							
FCM 054	E20010444	*Gagnepainia godefroyi*	B	1,838 ± 0,003			
---	T-11-51	*Gagnepainia godefroyi*	-			32	
FCM 078	E19871253	*Gagnepainia godefroyi*	B	1,821 ± 0,007	0,228	28	0,065
FCM 084	19991163	*Gagnepainia harmandii*	B	1,890 ± 0,003	0,236	26–28	0,0675
Rod *Hemiorchis*							
FCM 075	E19991652	*Hemiorchis burmanica*	B	1,021 ± 0,004	0,17	24	0,0425
FCM 079	E19871260	*Hemiorchis rhodorrhachis*	B	0,984 ± 0,002	0,164	>24	0,041
nezařazeno							
FCM 489	T-11-151	*Globba sp.*	B	2,528 ± 0,006		c 48	
FCM 631	E20110277	*Globba sp.*	B	3,835 ± 0,003	0,32	48	0,0799
FCM 632	E20110269	*Globba sp.*	B	2,264 ± 0,008			

Variabilita velikosti genomu mezi sekcemi byla vyjádřená krabicovými diagramy (obr. 3.15). Test normality neprokázál normální rozdělění. Kruskal-Wallisův test ukázal signifikantní rozdíly mezi většinou porovnávaných sekcí. Kruskal-Wallisův test nevyžaduje normální rozdělení, ale předpokládá nezávislost výběrů, která splněna není. Výsledek je proto pouze orientační. Malé genomy (2C) byly typické pro sekce Nudae, „Nisbetiana“, Ceratanthera a rody *Gagnepainia* a *Hemiorchis*. Velké genomy (2C) měli zástupci sekcí Sempervirens, Globba a Haplanthera. Velikost genomu (2C) druhů s 2n = 48 byla signifikantně větší než u druhů s 2n = 24 a 2n = 32 (Obr. 3.16). C_x-hodnota se mezi jedinci se 32 a 48 chromozómy nelišila (obr. 3.16). Sekce Nudae, Ceratanthera a rody *Hemiorchis* a *Gagnepainia* měli malé nejen 2C, ale i C_x-hodnoty. Sekce Globba měla středně veliké C_x-hodnoty a sekce Haplanthera a Sempervirens měly největší C_x-hodnoty.



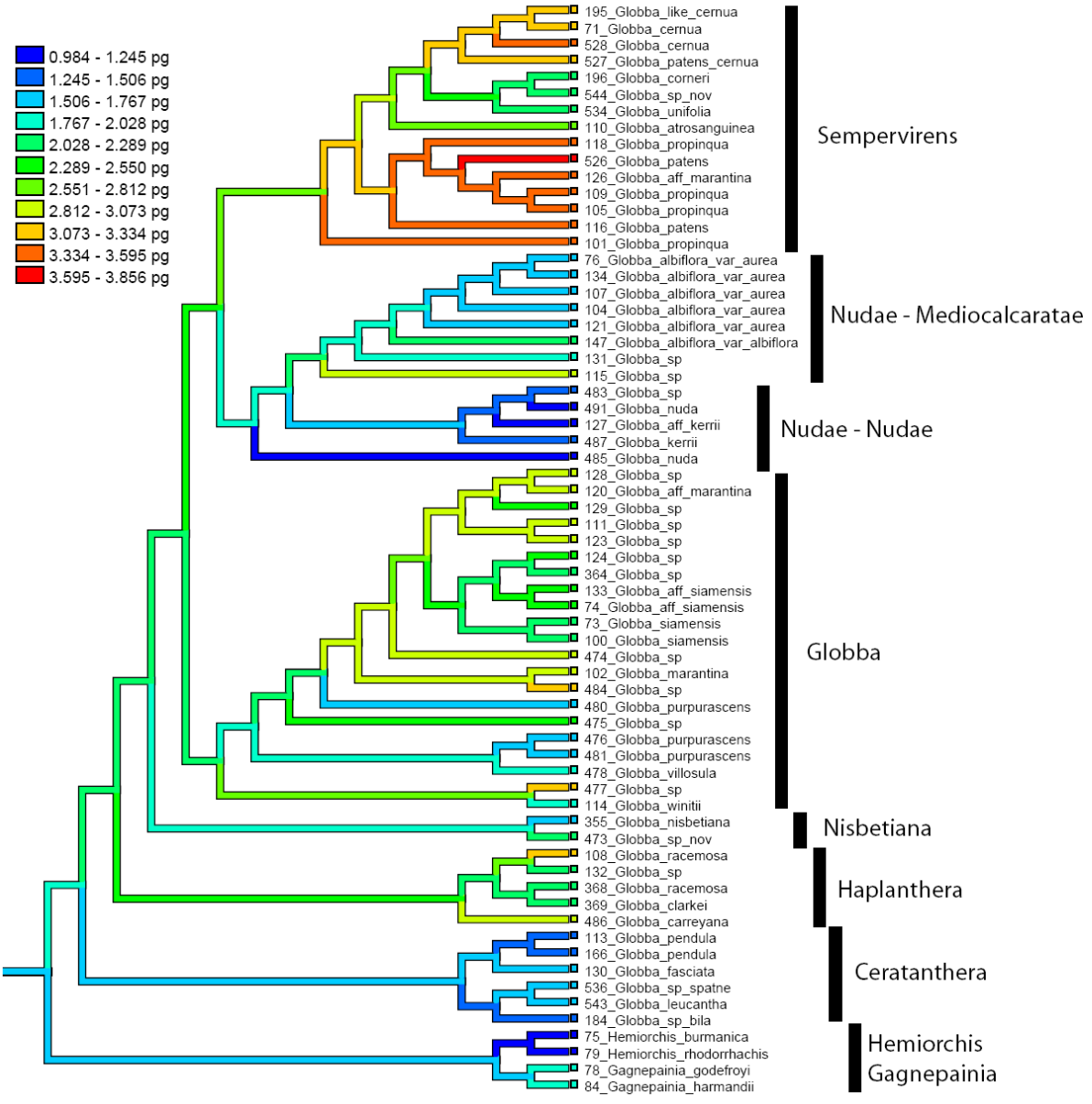
Obr. 3.15: Krabicové diagramy vyjadřující velikost genomu vzhledem k fylogenetickým skupinám. Vlevo: velikost genomu (2C) jednotlivých sekcí tribu Globbeae. Vpravo: velikost genomu ($2C_x$) jednotlivých sekcí, kde byla k dispozici více než jedna hodnota. Čísla v obrázcích udávají počet použitých údajů. Vytvořeno v programu PAST 2.10 (Hammer *et al*., 2001).



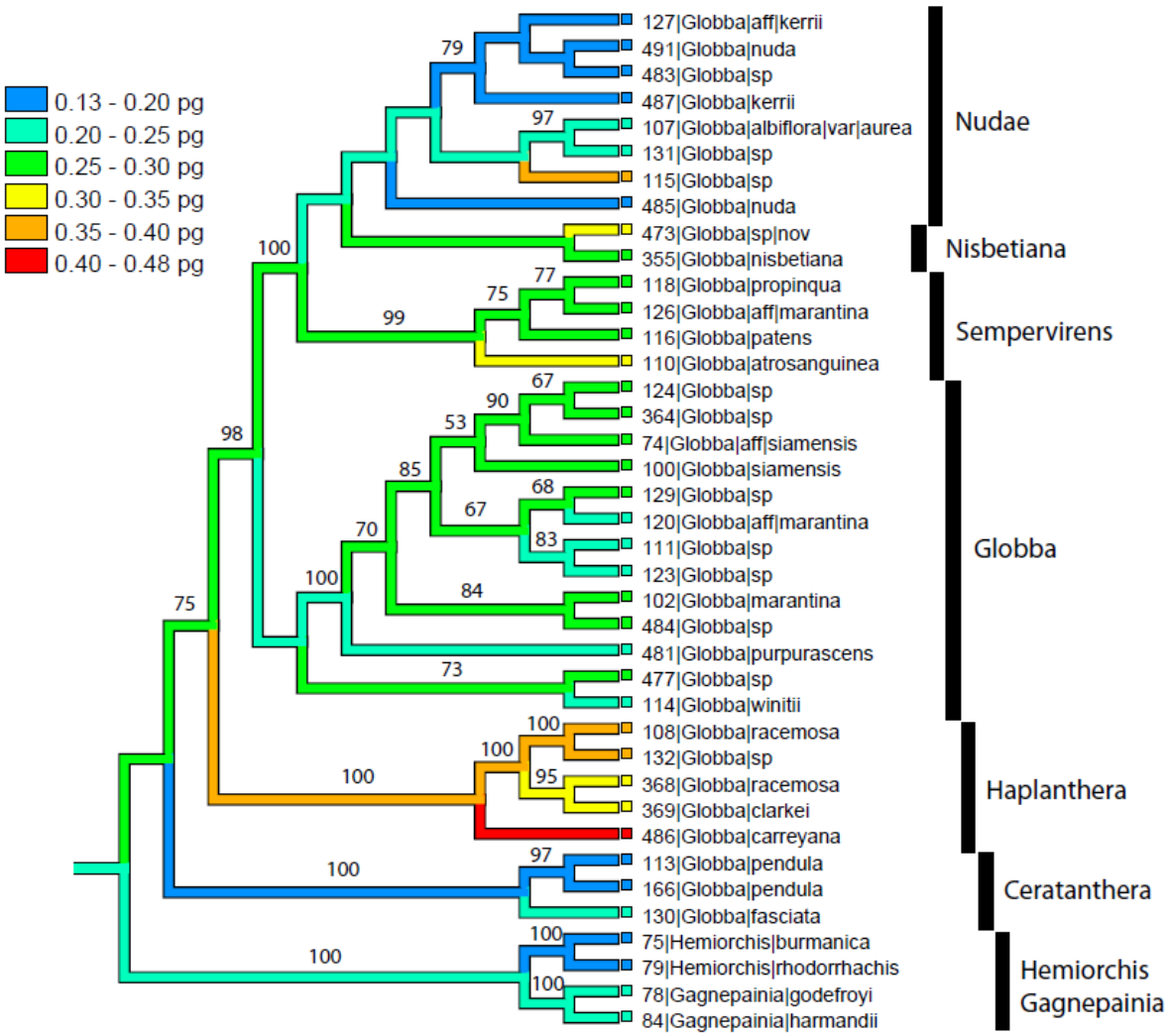
Obr. 3.16: Krabicové diagramy vyjadřující velikost genomu vzhledem k počtu chromozómů. Vlevo: velikost genomu (2C) ve třech různých kategoriích počtu chromozómů (2n = 24, 2n = 32 a 2n = 48). Vpravo: velikost C_x-hodnoty pro 32 a 48 chromozómů. Čísla v obrázcích udávají počet použitých údajů. Vytvořeno v programu PAST 2.10 (Hammer *et al*., 2001).

3.4 Evoluce velikosti genomu

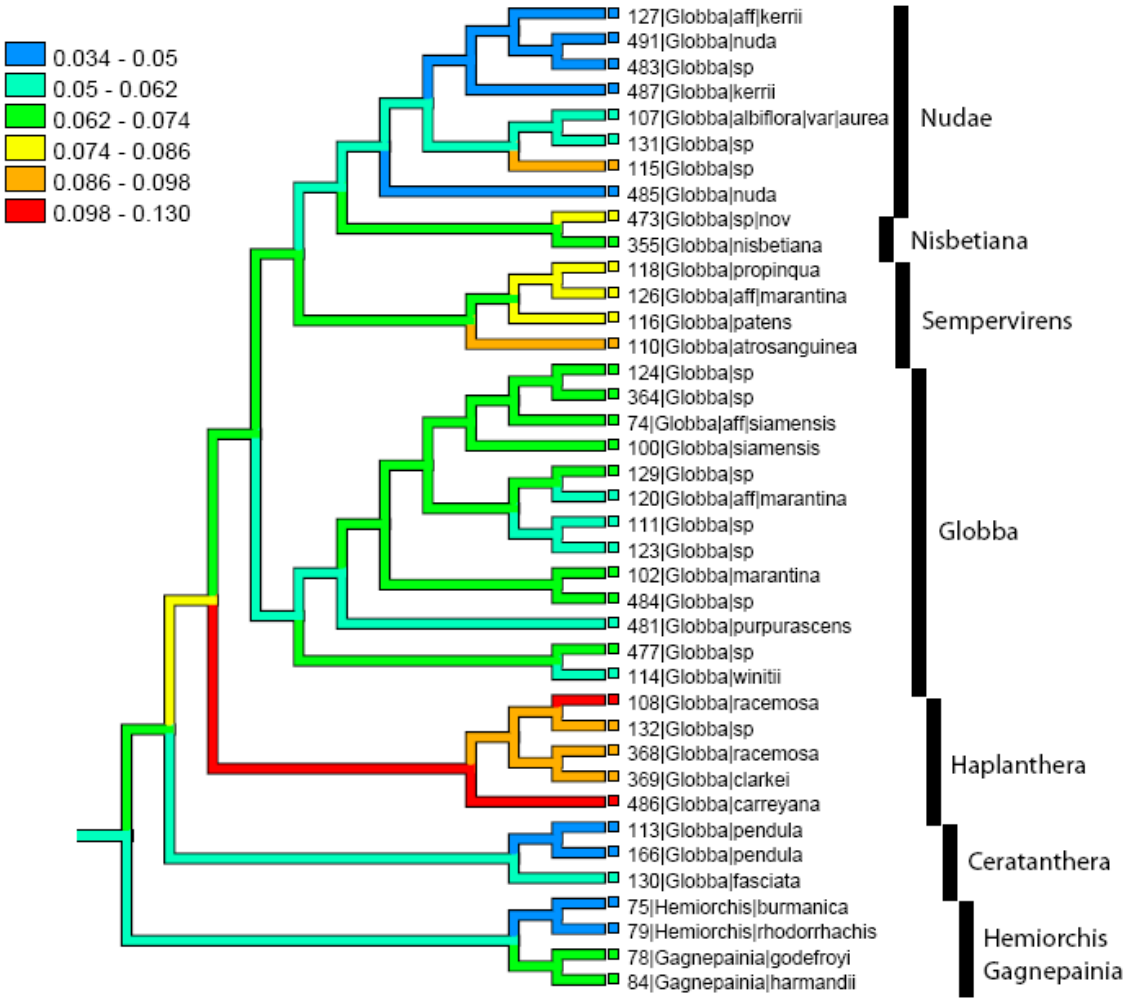
Evoluce 2C i C_x-hodnot byla metodou *squared-change parsimony* barevně znázorněna na fylogenetickém stromě v programu Mesquite (obr. 3.17, 3.18). Evoluce průměrné velikosti chromozómu byla znázorněna obdobně (obr. 3.19).



Obr. 3.17: Vývoj velikosti genomu (2C-hodnoty) znázorněný na jednom z maximálně parsimonických stromů souboru taxonů se známou 2C-hodnotou. Obrázek byl vytvořen v programu Mesquite 2.75 pomocí *squared-change* parsimonie.



Obr. 3.18: Rekonstrukce evoluce C_x-hodnoty. Vývoj C_x-hodnoty je znázorněný na jednom z maximálně parsimonických stromů podsouboru taxonů se známou C_x-hodnotou. Obrázek byl vytvořen v programu Mesquite 2.75 pomocí *squared-change* parsimonie. Hodnoty nad větvemi jsou bootstrapové podpory.



Obr. 3.19: Rekonstrukce evoluce průměrné velikosti chromozómu (2C/2n). Vývoj je znázorněný na jednom z maximálně parsimonických stromů podsouboru taxonů se známou C_x-hodnotou. Obrázek byl vytvořen v programu Mesquite 2.75 pomocí *squared-change* parsimonie. Uvedené hodnoty v legendě jsou v pikogramech.

3.4.1 Statistické testování

Testovány byly dva soubory dat. První byl soubor 1C-hodnot (65 taxonů) a druhý C_x-hodnot (39 taxonů). Shapirův-Wilkův test ukázal normální rozdělení pro první soubor dat (p= 0,002) a nepotvrdil normální rozdělení pro druhý soubor (p = 0,218). Hodnoty v obou souborech byly zlogaritmovány (nejen kvůli docílení normálního rozdělení; Oliver *et al.*, 2007). Ani po log-transformaci neměl C_x soubor normální rozdělení (p = 0,516), histogram hodnot se normálnímu rozdělení alespoň podobal více než před zlogaritmováním.

3.4.1.1 Test trendu evoluce

Testování modelu B („*directional random walk*“) oproti modelu A („*random walk*“) v obou datových souborech vyšlo nesignifikantně (p = 0,854 a p = 0,196), což znamená, že ve zkoumaných souborech není přítomen jednosměrný trend (zvětšení či zmenšení). Proto byl pro další testování (odhad parametrů) v BayesTraits vybrán model A. Pravděpodobnosti modelů získaných v BayesTraits algoritmem ML, hodnoty LR testů a p-hodnoty jsou v tabulce 3.3.

Tab. 3.3: Pravděpodobnosti modelů A a B vypočtené algoritmem ML v BayesTraits, jejich porovnání a p-hodnoty.

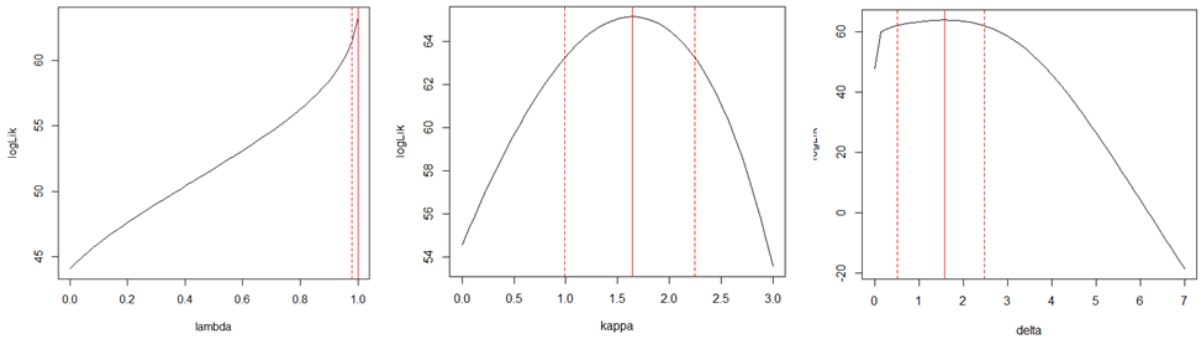
		Likelihood (Lh)	***p***
1C	Model A	66,646	
	Model B	66,663	
	Test A × B	LR = 0,034	p = 0,854
C_x	Model A	41,416	
	Model B	42,229	
	Test A × B	LR = 1,626	p = 0,196

3.4.1.2 Odhady škálovacích parametrů

Pravděpodobnost modelu s odhadnutými parametry lambda a kappa se vždy (v 1C i C_x souboru) signifikantně lišily od těch, kdy byla lambda a kappa nastavena jako nula. To znamená, že velikost genomu se s ohledem na topologii stromu nevyvíjela náhodně.

Odhad parametru lambda v programu BayesTraits vyšel v obou případech (1C i C_x) mírně větší než jedna, což je v konfliktu s tím, že lambda je definovaná pouze na intervalu 0–1. V caperu vyšel odhad lambdy pro C_x roven jedné. Pravděpodobně se jedná o nějakou chybu v modelu a je možné předpokládat, že lambda se signifikantně neliší od jedné. To znamená, že fylogeneze hraje významnou roli a taxony nejsou nezávislé.

Odhady parametrů v BayesTraits pro 1C (tabulka 3.4) soubor (kappa = 0,83 a delta = 1,06) a logC_x (tabulka 3.5) soubor (kappa = 1,58 a delta = 1,45) se signifikantně nelišily od nastavení kappa = 1 a delta = 1 (p > 0,01). V programu caper byly vypočteny odhady parametrů pouze pro menší soubor 39 taxonů s logC_x-hodnotami. Odhady parametrů (λ = 1, κ = 1,539, δ = 1,461) a jejich konfidenční intervaly jsou v tabulce 3.3. Opět parametry kappa a delta nebyly signifikantně větší než jedna. Získané 95% konfidenční intervaly byly vykresleny i do grafů (obr. 3.20).



Obr 3.20: Grafy znázorňující 95% konfidenční interval parametrů λ, κ a δ pro $1C_x$ soubor dat. Výstup z programu caper.

Tabulka 3.4: Zjištěné hodnoty a jejich signifikance parametrů charakterizující evoluci velikosti genomu ve fylogenetickém kontextu pro soubor dat se známou 1C-hodnotou. Vypočteno v programu BayesTraits na základě ML algoritmu.

		ML odhad parametru			Lh (parametr = 0)			Lh (parametr = 1)
		λ	**κ**	**δ**	**λ**	**κ**	**δ**	**λ , κ, δ**
1C	Hodnota parametru	**1,05**	**0,829**	**1,06**	0	0	--	1
	Lh odhadu:	335,239	66,923	66,661	21,195	59,145	--	66,646
		>0	**>0**	--				
	LRT (ML vs. 0)	? 628,088	15,556					
	p-hodnota	*p* = 0,000?	*p* = 0,000					
		<1	**<1**	**>1**				
	LRT (ML vs. 1)	? 537,186	0,554	0,03				
	p-hodnota	?	*p* = 0,457	*p* = 0,862				

Tabulka 3.4: Zjištěné hodnoty a jejich signifikance parametrů charakterizující evoluci velikosti genomu ve fylogenetickém kontextu pro C_x soubor dat. Vypočteno v programu BayesTraits a caper na základě ML algoritmu. Výsledky z programu caper jsou podbarveny. CI (confidence interval) = konfidenční interval.

		ML odhad parametru			Lh (parametr = 0)			Lh (parametr = 1)
		λ	**κ**	**δ**	**λ**	**κ**	**δ**	**λ , κ, δ**
C_x	Hodnota parametru	**1,0245**	**1,5756**	**1,4463**	0	0	--	1
	Odhad parametru	**1,000** (95% CI 0,976–NA)	**1,539** (95% CI 0,825–2,206)	**1,461** (95% CI 0,502–2,273)				
	Lh odhadu:	154,3266	42,6217	41,8478	23,310	33,884		41,416
		>0	**>0**	**--**				
	LRT (ML vs. 0)	262, 033	17,476					
	p-hodnota	*p* = 0,000	*p* = 0,000					
		<1	**>1**	**>1**				
	LRT (ML vs. 1)	225,821	2,411	0,864				
	p-hodnota	konflikt	*p* = 0,12	*p* = 0,353				

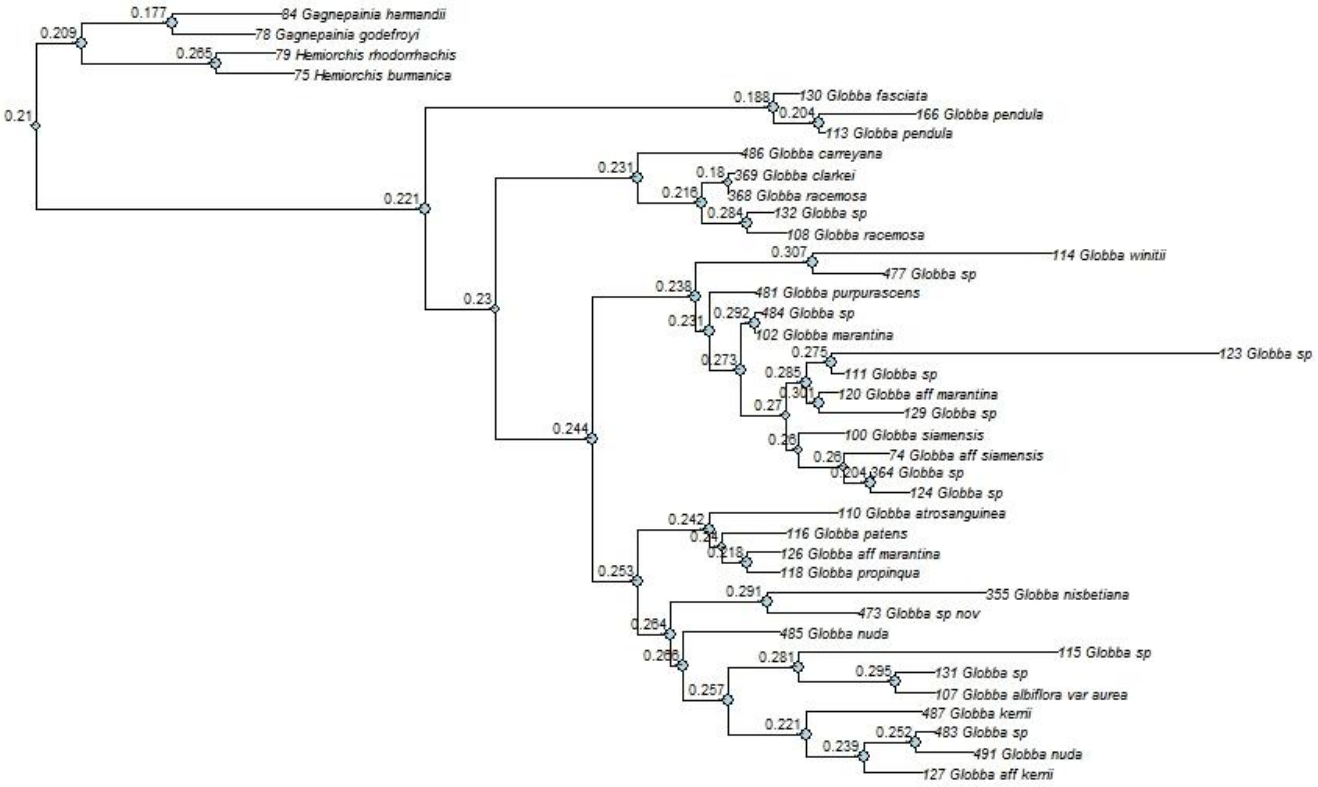
3.4.1.3 Rekonstrukce ancestrální velikosti genomu

Velikost genomu předka byla metodou *squared-change parsimony* odhadnuta na C_x = 0,20–0,25 pg a 1C = 0,75–0,85 pg. V BayesTraits byla velikost genomu předka oběma algoritmy (ML a *mcmc*) odhadnuta na $\alpha(C_x)$ = 0,211 pg a α(1C) = 0,731 pg (tab. 3.5). V programu geiger byly vypsány odhady velikosti genomu předků (pouze u C_x souboru) ke každému uzlu vybraného maximálně

parsimonického stromu souboru (obr. 3.21). Odhadnutá ancestrální velikost genomu u kořene skupiny byla C_x = 0,210 pg.

Tab. 3.5: Odhady velikosti genomu společného předka. V tabulce jsou výsledky pro dva soubory dat (1C a C_x) získané dvěma možnými algoritmy (ML a *mcmc*). (α = logaritmus odhadnuté hodnoty, Var = variance)

		α	Var	Odlogaritmovaná hodnota α [pg]
1C	ML	-0,136	0,001	0,731
	MCMC	-0,136	0,001	0,731
C_x	ML	-0,676	0,000	0,211
	MCMC	-0,676	0,000	0,211



Obr 3.21: Výpočet ancestrálních hodnot velikosti genomu v každém nodu fylogenetického stromu metodou ML v programu geiger. Čísla u nodu jsou C_x-hodnoty [pg].

4 Diskuze

Pro tuto práci se zásluhou několika botanických zahrad podařilo zajistit velké množství vzácného tropického materiálu pokrývající většinu diverzity. Různými fylogenetickými přístupy bylo dosaženo konzistentních fylogenetických vztahů, se kterými mohlo být dále pracováno v souvislosti s počtem chromozómů a velikostí genomu. Při určování stupně polyploidie (a monoploidní velikosti genomu) nastal problém s nevyjasněným základním chromozómovým číslem (diskutováno níže). Nakonec se úspěšně podařilo vyhodnotit evoluci velikosti genomu (1C i C_x) několika statistickými přístupy.

4.1 Fylogenetické analýzy

4.1.1 Synonymika jmen

V práci bylo ponecháno pojmenování druhů takové, jaké užívají v botanických zahradách, ale v některých případech se jednalo o jména synonymní. Jejich akceptovaná jména podle databáze The Plant List (2010) jsou (v pořadí „synonymum" = „pravé jméno") *Globba fasciata* Ridl. = *G. pendula* Roxb., *G. bulbifera* Roxb. = *G. marantina* L., *G. careyana* Roxb. = *G. sessiliflora* Sims*, G. villosula* Sm. = *G. adhaerens* Gagnep. Jméno *G. clarkei* Baker je sice akceptované jméno, ale podle specialisty na rod *Globba* Marka Newmana (RBG, Edinburgh) se jedná o druh *G. racemosa* Gagnep.

4.1.2 Srovnání s dosavadní fylogenezí

Při rekonstrukci fylogeneze tribu Globbeae pracovali Williams *et al*. (2004) se 122 taxony pro fylogenezi ITS úseku a s 65 taxony pro fylogenezi *mat*K úseku (spojený soubor ITS-*mat*K měl též 65 taxonů) oproti 195 taxonům pro ITS a 145 taxonům pro *mat*K zahrnutých v této práci. S tímto větším souborem taxonů bylo dosaženo mírně vyšších konzistenčních a retenčních indexů. Získané topologie byly v obou studiích konzistentní. V této práci se navíc objevila **potenciálně nová sekce okolo druhu *G. nisbetiana*** (která dříve ve fylogenetických analýzách zahrnuta nebyla). Tento druh byl podle morfologických znaků řazen do bývalé sekce Globba (Schumann, 1904), dnes je tato sekce na základě molekulárních dat rozdělená na Globba a Sempervirens. Výskyt je znám v Thajsku (Larsen *et al.,* 2006). V tuto chvíli není možné dělat žádné závěry o objevení nové sekce, bude potřeba se na tuto skutečnost více zaměřit a doplnit další druhy z okruhu druhu *G. nisbetiana*.

Po vyřazení druhů *G. xantholeuca* a *G. insectifera* se autorům (Williams *et al.,* 2004) podařilo dosáhnout nesignifikantního ILD testu a analyzovali spojený soubor dat ITS-*mat*K, který měl mírně vyšší CI a RI a lepší podpory větví než jednotlivé soubory dat. Zde se nesignifikantního ILD testu nepodařilo dosáhnout ani vyřazováním dalších a dalších taxonů. Nepříznivé výsledky testů homogenity (ILD) a velké množství polytomií v analýzách spojeného souboru (neprezentováno) jen potvrzují odlišnou evoluci jaderných a chloroplastových úseků (Mort *et al.,* 2006; Kim *et* Donoghue,

2008). Z těchto faktů lze vyvozovat, že ve zkoumané skupině došlo k hybridizačním procesům a dávné introgresi.

4.1.3 Hybridizace a její důsledky

Holttum (1950) navrhl možnou hybridizaci v sekci Sempervirens mezi *G. patens* a *G. cernua* s potomkem intermediérního charakteru (*G. curtisii*). Lim (1973) studovala křížení druhů *G. patens* a *G. cernua* detailněji. *G. marantina* by se údajně na základě morfologických podobností mohla křížit s *G. fragilis*, *G. patens* a *G. unifolia* (Lim, 1972). Jiné zmínky o křížení v rodě *Globba* se v literatuře nalézt nepodařilo. Podle J. Leong-Škorničkové (*Singapore Botanic Garden*), se rod *Globba* kříží velmi ochotně, tedy téměř vždy, kdy druhy rostou společně (ústní sdělení). Jedinec pojmenovaný *G. patens* × *cernua* (M-11-5) byl v Malajsii odebrán jako jedinec i intermediérním vzhledem mezi druhy *G. patens* (M-11-4) a *G. cernua* (M-11-6), což je ve shodě s dříve zjištěnými fakty. Výsledky Bayesovské analýzy spojených souborů, kde se rozpadly podsekce sekce Nudae do polytomie, by mohlo být způsobeno i intenzivnějším křížením uvnitř této sekce. Podobně změna pozice na stromě v závislosti na použitém úseku DNA u jedinců *Globba nuda* (FCM 485) a *G. propinqua* (FCM 101) mezi sekcemi a četné drobné přesuny v rámci sekcí lze vysvětlit právě křížením a introgresí. Rozdílná evoluce dvou úseků DNA je známý jev a není neobvyklá ani u jiných skupin rostlin (Mort *et al*., 2006; Kim et Donoghue, 2008).

4.1.4 Zařazení nových a neurčených druhů

Ve zkoumaném souboru byly 3 hypoteticky nové druhy. První, *Globba sp. novum* (KL20090599, FCM 544), se zařadila do sekce Sempervirens do blízkosti druhů *G. corneri* a *G. unifolia*. Druhá, *Globba sp. novum* (T-11-138, FCM 473), se s vysokými podporami řadila k druhu *G. nisbetiana* (T-11-10, FCM 355), se kterým tvořila specifickou dvojici vyčleňující se ze všech ostatních sekcí. Třetí nový druh *Globba sp. novum* (E20081114, FCM 129) byl klastrován do sekce Globba mezi druhy jako *G. marantina*, *G. adhaerens* a *G. globulifera*.

Návrhy na zařazení neurčených druhů (*Globba sp.*) podle výsledků ITS a *mat*K fylogeneze jsou následující:

FCM kód	Unikátní kód	Sekce	Nejbližší taxon
FCM 536	KL20102320	Ceratanthera	*G. leucantha*
FCM 128	E20081055	Globba	*G. marantina*
FCM 111	E20081125	Globba	*G. marantina*
FCM 364	E20091380	Globba	*G. marantina/G. adhaerens/G. obscura*
FCM 474	T-11-35	Globba	*G. schomburgkii/G. candida*
FCM 475	T-11-66	Globba	*nelze určit*
FCM 477	T-11-20	Globba	*G. marantina*
FCM 115	E20010323	Nudae-Med	*G. paniculata*
FCM 132	E19991625	Haplanthera	*G. racemosa*

FCM 131	E19972553	Nudae-Med	*G. campsophylla/G. gracilis*
FCM 484	T-11-47	Globba	*G. marantina*
FCM 184	JLS 186	Ceratanthera	*G. leucantha*
FCM 483	T-11-46	Nudae-Nudae	*G. nuda*

Globba marantina (E19871259, FCM 126) se ve stromech založených na ITS i *mat*K zařadila do sekce Sempervirens, kam nepatří. Je vysoce pravděpodobné, že se nejedná o tento druh. *Globba racemosa* (E19962152) je s nejvyšší pravděpodobností špatně určená, protože ve fylogenetických analýzách se na základě ITS úseku zařadila mimo všechny Globby mezi outgroup vybraný z podčeledi Zingiberoideae. Úsek *mat*K se u tohoto jedince nepodařilo osekvenovat, proto v analýzách založených na *mat*K nebyl zahrnut.

4.2 Polyploidie

4.2.1 Počty chromozómů

Počty chromozómů jsou často psané jako přibližné, to je proto, že chromozómy této skupiny jsou velice malé a je obtížné správný počet určit. Zvlášť náročné bylo určit počet 2n = 48, u kterého bylo téměř nemožné k tomuto číslu dojít s absolutní jistotou. Také k dodaným fotkám z mikroskopu je třeba poznamenat, že v mikroskopu bylo daleko snazší rozlišit překrývající se chromozómy a určit počet.

Bohužel nebylo možné porovnat velikost genomu u jednoho druhu se dvěma různými cytotypy (2n = 32 a 2n = 48), neboť se takové v našem souboru dat nevyskytly.

U druhů zastoupených více jedinci z různých lokalit, u kterých byla naměřena stejná velikost genomu, byli většinou počítáni všichni tito jedinci, nikdy se však pro daný druh nezjistil rozdílný počet chromozómů. Z tohoto důvodu se na závěr u některých jedinců pro výpočet C_x-hodnot použil počet chromozómů zjištěný u jiného jedince se stejnou velikostí genomu. I na základě výsledků porovnání velikosti genomu podle počtu chromozómů (obr 3.8) je nepravděpodobné, že by dva cytotypy (2n = 32, 2n = 48) měly stejně velký genom. Totéž se nedá říct o jedincích s 2n = 24 a 2n = 32, u kterých byla velikost genomu podobná. Z vlastní zkušenosti při mikroskopování bych řekla, že chromozómy u druhů s 2n = 24 (sekce Haplanthera) jsou o něco větší. Je tedy možné, že u této skupiny došlo k chromozómovým přestavbám (fúzím) a množství genetické informace se u těchto dvou cytotypů příliš nezměnilo. Je tedy otázkou, kolika ploidní jsou taxony s 2n = 24 (sekce Haplanthera) a jak by se měla počítat C_x-hodnota (viz dále).

Dva cytotypy (2n = 32 a 2n = 48) byly dříve známy ve třech sekcích (Globba, Sempervirens a Ceratanthera), v této práci se potvrdily v sekcích Globba a Sempervirens. Tento jev lze očekávat i v dalších sekcích, protože prozkoumaných druhů (i jedinců) bylo poměrně málo.

Oproti dříve publikovaným výsledkům bylo pozorováno 32 chromozómů u *G. atrosanguinea*, kde bylo dříve zjištěno pouze 48 chromozómů. Jelikož v sekci Sempervirens je přítomnost dvou cytotypů běžná, byl tento nález očekávatelný. Také u druhu *G. nisbetiana* byl dříve zjištěn jiný počet (2n = 32) než nyní (2n = 20–24). Počet 2n = 24 byl zatím znám pouze v sekci Haplanthera.

U druhu *Globba nuda* bylo s jistotou pozorováno více než 32 chromozómů, což je ve shodě dříve publikovaným počtem 2n = 34 (Larsen, 1972). Tento o 2 chromozómy větší počet, než obvyklý, byl zajímavým nálezem v kontextu nejmenší velikosti genomu ve skupině, kterou tento druh má (2C = 1,11 pg). Pravděpodobně došlo k nějakým přestavbám, rozpadům a ztrátám genetické informace.
Přestože má *G. marantina* extrémně variabilní počet chromozómů (2n = 24, 44, 48, 64, 80, 96) byl zde zjištěn pouze počet 2n = c 48. *G. marantina* je častý druh rozšířený téměř po celém areálu. Pravděpodobně velmi ochotně hybridizuje s ostatními druhy a současně se efektivně šíří vegetativně pacibulkami, čímž vznikají a udržují se bizardní počty chromozómů.

Dva různé počty (2n = 28, 2n = 32) nalezené u rodu *Gagnepainia* jsou překvapivé a bude vhodné je ověřit. Totéž platí pro rod *Hemiorchis,* kde bylo zjištěno 24 chromozómů (*Hemiorchis burmanica* E19991652) a s jistotou více než 24 chromozómů (*Hemiorchis rhodorrhachis* E19871260). Pro ani jeden z těchto rodů dříve nebyly publikovány žádné počty.

Velikost genomu se v závislosti na počtu chromozómů signifikantně liší mezi skupinami 32 a 48 chromozómů, ale hodnoty velikosti genomu se prolínají. Například byly mezi studovanými taxony přítomny dva druhy s rozdílným počtem chromozómů (2n=24 a 2n=48) se stejně velkým genomem [*G. sp*. E19991625A s 2C = 2,188 pg a *G. bulbifera* (= *marantina,* FCM 706) s 2C = 2,141 pg]. Extrémním případem je *G. careyana (= sessiliflora)*, která má c 22 chromozómů a jeden z největších genomů (2C = 2,849 pg).

Minimální a maximální velikost chromozómu (2C/2n) se liší 3,7krát. Tato variabilita není nijak překvapivá vzhledem k již dříve zjištěnému 3,5 násobnému rozdílu v délce chromozómů (Lim, 1972). Otázkou je, zda je tento rozdíl závislý na počtu chromozómů, nebo je přítomna obecná variabilita bez ohledu na počet chromozómů. Ve shodě s výsledky velikosti genomu bylo zjištěno, že průměrná velikost chromozómů u jedinců se 32 chromozómy se neliší od jedinců se 48 chromozómy. Pouze druhy s 24 chromozómy měly o trochu větší (nesignifikantně) průměrnou velikost chromozómu (výsledky neprezentovány).

Nedořešenou záležitostí zůstává základní chromozómové číslo. Vzhledem k chromozómovým přestavbám (viz kap. 1.3.2), polyploidizačním, paleoploidizačním a diploidizačním procesům je u některých skupin prakticky nemožné základní chromozómové číslo určit, protože už žádné takové není.

4.2.2 Vznik různých cytotypů

Jako nejpravděpodobnější vznik polyploidních taxonů se 48 chromozómy se v literatuře udává splynutí redukované a neredukované gamety druhu s 32 chromozómy (Takano, 2001; Takano *et* Okada, 2002). O původu cytotypu 2n = 24 nebyly nalezeny žádné údaje. Jedna z možností je fúze chromozómů, což je nepravděpodobné i proto, že se všechny chromozómy jevily stejně veliké (u jedinců s 32 i 24 chromozómy). Jinou možností je vznik gamety s 8 chromozómy (chybou při meiose) a splynutí s normální redukovanou gametou. Pak by se při meiose pravděpodobně tvořily trivalenty. Nejspíše ale ke vzniku tohoto minoritního cytotypu došlo kombinací více a složitějších procesů.

4.2.3 Velikost genomu

Zjištěná průměrná velikost genomu 1C = 1,17 pg a medián 1C = 1,07 pg tribu Globbeae v porovnání s hodnotami pro krytosemenné rostliny [průměr 1C = 6,2 pg a medián 1C = 2,6 pg (Leitch *et al*., 2010)] jsou výrazně nižší a v porovnání s týmiž hodnotami pro jednoděložné [(průměr 1C = 11 pg a medián 1C = 6,3 pg (Leitch *et al*., 2010)] je rozdíl ještě markantnější. V rámci čeledi Zingiberaceae patří tribus Globbeae spíše k těm s menším genomem, nicméně celá čeleď má poměrně malé genomy (O. Šída, nepublikováno).

Poměrně zajímavým nálezem byly dva cytotypy druhu *G. racemosa* (2n = 24 a 2n = 32), lišící se velikostí genomu. Že jde opravdu o *Globba racemosa,* je podpořeno fylogenetickými analýzami, ve kterých spadající oba jedinci do jedné skupiny s ostatními jedinci tohoto druhu. Ostatní zkoumané druhy se velikostí genomu lišily minimálně.

4.2.3.1 C_x-hodnota a ploidní stupeň

U tribu Globbeae lze spočíst poměrně snadno C_x-hodnotu pro druhy s 32 a 48 chromozómy, protože mezi nimi je jasný poměr (2:3) podpořený i velikostí genomu a pro analýzy velikosti C_x genomu v zásadě nezáleží na tom, zda se zvolí x = 16 nebo x = 8. Potíž je s druhy, které mají 24 a 28 chromozómů (nemluvě o druhu *Globba marantina*) a zvlášť pokud se jedná o jiné rody. Jedinci s 2n = 34 byly považovány za aneuploidní od jedinců s 2n = 32 a tedy též za tetraploidní. Rod *Gagnepainia* (2n = 28, 32) byl považován za tetraploidní a rod *Hemiorchis* (2n = 24) za triploidní podobně jako sekce Haplanthera (2n = 24). Při volbě x = 8 se sice snadno získá C_x-hodnota druhů s 2n = 24, ale tyto hodnoty jsou pak extrémně vysoké, protože druhy s 24 chromozómy mají podobně velké genomy jako druhy s 32 chromozómy. Není vyloučené, že pro získání správné C_x-hodnoty, by druhy sekce Haplanthera měly být považované za stejně ploidní jako ty s 2n = 32. K ověření tohoto předpokladu by bylo možné zkusit zkoumat párování chromozómů v meiose, ale pravděpodobně by párovaly víceméně pravidelně. Další možností by bylo aplikovat některé z metod barvení chromozómů fluorescenčními barvivy. Například pomocí FISH (*fluorescence in-situ hybridisation*) je možné

zviditelnit např. rDNA úseky na chromozómech a podle počtu signálů a umístění na chromozómech by bylo možné detekovat fúze či přestavby (Soontornchainaksaeng et Anamthawat-Jónsson, 2011). Dražší variantou a časově výrazně náročnější by bylo obarvení chromozómů pomocí BAC (Mandáková *et al.,* 2010).

Je zřejmé, že určení správného ploidního stupně je při statistické analýze C_x-hodnoty zásadní, nicméně v rámci diplomové práce nebylo možné toto udělat lépe. V některých případech (např. Lysák *et al.,* 2009) je v podstatě nemožné ploidii určit vzhledem k celé sérii základních chromozómových čísel ovlivněné paleoploidizací a následnými diploidizacemi, zvlášť ještě pokud se pracuje s větší skupinou jako např. čeledí. Poté není jiná možnost, než pracovat s 1C-hodnotou (Lysák *et al*, 2009; Gurushidze *et al*., 2012). Obě varianty, 1C i C_x, se podařilo analyzovat a porovnat např. v rodě Veronica (Albach *et* Greilhuber, 2004), v rodě Orobanche (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2006) a v čeledi Liliaceae (Leitch *et al.*, 2007). V těchto případech vyšly stejné výsledky pro 1C i C_x soubory dat. Jedinou výjimkou byla studie Albach *et* Greilhuber (2004), kde pro 1C byl zjištěn silný vliv fylogeneze a pro C_x žádný vliv fylogeneze.

Očekávalo se, že velikost monoploidního genomu (C_x) bude odfiltrováním vlivu polyploidů oproti 2C velikosti genomu v rámci sekce celkově vyrovnanější, což se naplnilo. Tento trend byl zřetelný především v sekcích Sempervirens a Globba, kde byl dostupný větší počet zástupců a přítomny oba nejčastější cytotypy.

4.3 Charakter evoluce velikosti genomu

Statistické vyhodnocení charakteru evoluce je od reality poměrně vzdálené, protože programy založené na GLS předpokládají rovnoměrný charakter změn (Brownův pohyb), což je v případě velikosti genomu výrazné zobecnění. Bylo by vhodné model specificky vylepšit pro velikost genomu na základě znalostí mechanismů uplatňujících se v evoluci velikosti genomu. Ačkoli jsou principy jako GLS, ML a parsimonie jen zobecněnými modely, jsou zatím nejlepším způsobem, jakým evoluci ve fylogenetickém kontextu aproximovat.

4.3.1 C_x versus 1C-hodnoty

Vzhledem k tomu, že ve studované skupině bylo obtížné určit ploidní stupeň, přestože byly zjištěny chromozómové počty, nebylo možné s jistotou určit ani C_x-hodnotu. Na toto je třeba brát ohled při interpretaci výsledků evoluce C_x-hodnoty. Nesprávně určené ploidní stupně by měli vliv na gradualismus (mohly by být chybně detekovány skokové změny nebo naopak by mohly být přehlédnuty). Jelikož druhy se stejným počtem chromozómů si byly ve zkoumaném souboru dat fylogeneticky příbuznější, mohlo by dojít i k nadhodnocení vlivu fylogeneze. Riziko chybné určení ploidie je pouze u rodů *Hemiorchis* a *Gagnepainia* a sekcí Haplanhera a „Nisbetiana“.

Použitím 1C-hodnot se sice vyhneme obtížím spojenými s chybným určením ploidie, ale budeme zkoumat docela jinou evoluci. Evoluce 1C-hodnot vypovídá zároveň o evoluci C_x-hodnot a polyploidie. A jelikož změny C_x-hodnot v evoluci jsou daleko menší (myšleno např. v pg), než změny při polyploidní události, vypovídá evoluce 1C-hodnot především o vývoji polyploidie. Které studie je tímto potýkaly bylo popsáno výše (kapitola 4.2.3.1).

4.3.2 Přítomnost trendu v evoluci

Bylo zjištěno, že neexistuje prokazatelná tendence ke zmenšování ani zvětšování genomu v žádném ze zkoumaných souborů. Se stejným výsledkem se setkali i např. Weiss-Schneeweiss *et al.* (2006) u rodu Orobanche, Leitch *et al.* (2007) u čeledi Liliaceae, Lysák *et al.* (2009) u čeledi Brassicaceae a Chrtek *et al.* (2009) u druhu Hieracium. Nepodařilo se dohledat žádný případ, kde by u rostlin byl signifikantně lepší „model B" (*directional random-walk*).

4.3.3 Škálovací parametry λ, κ, δ

Výsledky všech provedených analýz (programy Mesquite, BayesTraits, caper a geiger) vybraných souborů taxonů (tab. 3.3, obr. 3.18) se shodují na tom (pro 1C i C_x), že velikost genomu je ovlivněna fylogenezí, tedy že velikost genomu se na stromě vyskytuje nenáhodně. Tento výsledek je ověřitelný na stromech s barevně vyznačenou velikostí genomu (obr. 3.9, 3.10) pouhým pohledem. Výsledek je jistě zkreslen přítomností několika zástupců jednoho druhu, proto byl soubor C_x-hodnot vybírán tak, aby nebyly přítomny duplicitní taxony se stejně velkým genomem. Kvůli přítomnosti neurčených druhů nebylo možné shodám zamezit stoprocentně.

Parametry testující přítomnost adaptivní radiace oproti druhově specifické radiaci (delta) a punktualistickou (skokovou) oproti graduální (pozvolné) evoluci (kappa) vyšly nesignifikantně odlišné od jedné (interpretace v tab. 4.1). Podle tohoto se tedy nepotvrdila ani adaptivní ani druhově specifická radiace, ale potvrdila se graduální evoluce (nedocházelo ke skokovým změnám). Pro soubor s C_x-hodnotami parametry $\kappa > 1$ a $\delta > 1$ znamenají, že pokud nějaký trend přítomen je, tak delší větve a delší cesta na stromu přispívají k evoluci znaku více a dochází ke zrychlování evoluce velikosti genomu u mladších taxonů víc než u evolučně starších.

Pozvolný vývoj velikosti genomu byl mimo tribu Globbeae zjištěn i u čeledi Brassicaceae (Lysák *et al*., 2009) a jednoděložných (Leitch *et al*., 2010), oproti skokové evoluci například u *Allium* (Gurushidze *et al*., 2012), *Orobanche* (Weiss-Schneeweiss *et al*., 2006), *Veronica* (Albach *et* Greilhuber, 2004) a Liliaceae (Leitch *et al*., 2007). Ovšem skoková evoluce může být důsledkem použití 2C-hodnot nebo absence délky větví na stromě. Ve všech těchto pracích byla alespoň jedna příčina přítomna. Podobně jako v této práci bylo více změn pozorováno v dlouhých větvích u Brassicaceae (Lysák *et al*., 2009) a *Hieracium* (Chrtek *et al*., 2009). Naopak převaha změn v krátkých větvích byla typická pro

jednoděložné (Leitch *et al*., 2010). Adaptivní radiace jako u *Orobanche* (Weiss-Schneeweiss *et al*., 2006), *Veronica* (Albach *et* Greilhuber, 2004) a jednoděložných (Leitch *et al*., 2010), ani radiace u odvozených taxonů jako u rodu *Allium* (Gurushidze *et al*., 2012) a čeledi Liliaceae (Leitch *et al*., 2007), není případ tribu Globbeae, podobně jako Brassicaceae (Lysák *et al*., 2009) a *Hieracium* (Chrtek *et al*., 2009).

Největší rozdíl mezi 1C a C_x-hodnotami byl v parametru kappa, kdy v prvním případě byla $\kappa < 1$ (více změn na kratších větvích) a v druhém $\kappa > 1$ (více změn na delších větvích). Interpretace souboru s 1C-hodnotami je kvůli zahrnutí polyploidních taxonů všeobecně obtížné, protože jde více o evoluci polyploidizace než velikosti genomu ve smyslu C_x-hodnoty. V tomto případě parametr kappa říká, že k polyploidním událostem (které se do změny velikosti genomu promítnou nejvíce) docházelo spíše na krátkých větvích.

Tab. 4.1: Parametry popisující charakter evoluce kontinuální proměnné a jejich interpretace (upraveno z Pagel, 2004).

Parametr	interpretace	0	<1	1	>1
λ (lambda)	Vliv fylogeneze	Taxony jsou nezávislé (není vliv fylogeneze)	Fylogenetická historie má malý vliv	Fylogeneze má vliv	nedefinováno
κ (kappa)	Vliv délky větví	Skoková evoluce	Stáze v delších větvích	gradualismus	Více změn na delších větvích
δ (delta)	Vliv délky cesty od kořene k taxonům	nedefinováno	Více změn dříve v evoluci (Adaptivní radiace)	gradualismus	Více změn na koncových větvích (druhově specifická adaptace)

4.3.4 Ancestrální velikost genomu

Odhady velikosti genomu předka 1C souboru 1C = 0,731 pg (ML i *mcmc*) a 1C = 0,75–0,83 pg (*squared-change* parsimonie) jsou přibližně stejné v porovnání s průměrnou velikostí 1C = 1,17 pg výrazně menší.

Odhadnuté ancestrální stavy znaku C_x = 0,211 pg (ML i *mcmc*) a C_x = 0,20–0,25 pg (*squared-change* parsimonie) se perfektně shodly a jsou o malinko menší než zjištěný průměr v souboru (C_x = 0,259 pg). Velikost genomu předka je obvykle menší než většina naměřených hodnot (např. Leitch *et al.*, 1998; Soltis *et al.,* 2003; Lysák *et al.,* 2009; Leitch *et al.,* 2010).

4.4 Plány do budoucnosti

Momentálně je ve skleníku pražské botanické zahrady v Tróji a Edinburghu k dispozici několik dalších druhů (*G. brachyanthera, G. globulifera, G. insectifera* a 3 neurčené druhy). Další druhy má i Singapurská botanická zahrada, kde jsou z intenzivních terénních výjezdů neustále dováženy další vzorky. Větší zájem bude věnován po morfologické i fylogenetické stránce druhu *G. nisbetiana*. V dalších letech by se dalo rozšířit soubor dat (především o zástupce sekcí Mantisia a Substrigosa), dopočítat a ověřit chromozómové počty, pokusit se více zjistit o cytotypu 2n = 24 (meióza, FISH) a získaná data interpretovat v souvislosti s geografickými a ekologickými faktory.

5 Závěr

V tribu Globbeae se na základě molekulární fylogeneze vždy vyčlenilo 7 dobře podpořených sekcí, které byly rozpoznány již dříve (Williams *et al*., 2004). Navíc se vytvořila skupina okolo *Globba nisbetiana* nespadající do žádné ze známých sekcí. Monofýlie sekcí byla ve dvou případech narušena změnou pozice taxonu mezi sekcemi na stromech založenými na různých DNA úsecích (ITS, *mat*K). Rozdílná pozice v rámci sekce vzácná nebyla. Sekce Mantisia je se silnou podporou sesterská sekci Haplanthera. Sekce Sempervirens, Nudae a Globba tvořily (podle ITS úseku) odvozenější skupinu oproti sekcím Haplanthera, Mantisia, Ceratanthera a Substrigosa. Z fylogenetických analýz nevyšel tribus Globbeae jako monofyletická skupina. Rody *Hemiorchis* a *Gagnepainia* jsou navzájem sesterské, ale s nevyjasněnou pozicí vůči rodu *Globba* a dokonce i vůči skupině taxonů z podčeledi Zingiberoideae.

Definovat stupně ploidie nebylo snadné, přítomny byly druhy hlavně s 24, 32 a 48 chromozómy, proto byly po řadě provizorně považovány za triploidní, tetraploidní a hexaploidní taxony. Počet 24 chromozómů byl typický pro sekci Haplanthera a „Nisbetiana“, počet 32 chromozómů měly sekce Nudae a Ceratanthera a 32 i 48 chromozómů bylo zjištěno, oproti očekávanému hojnějšímu výskytu, pouze v sekcích Globba a Sempervirens. Velikost genomu (2C) triploidních a tetraploidních druhů se nelišila, ale oproti hexaploidním druhům byl rozdíl signifikantní. Monoploidní velikosti genomu (C_x) tetraploidních a hexaploidních jedinců se nelišila. Otázkou zůstává původ triploidních druhů, jejichž monoploidní velikost genomu byla mírně (nesignifikantně) větší než u tetra- a hexaploidů. Z výsledků je patrné, že v této skupině došlo a pravděpodobně stále dochází ke křížení a introgresi, které vedly ke změnám v karyotypu a variabilitě ve velikosti genomu. Monoploidní velikosti genomu jsou v rámci sekce velmi podobné a liší se mezi sekcemi.

Studium evoluce velikosti genomu provází několik technických a metodických obtížností. Využitím dostupných prostředků bylo zjištěno, že v tribu Globbeae nedochází k obecnému trendu zvětšování ani zmenšování velikosti genomu v evoluci. Dále bylo zjištěno, že velikost genomu je silně ovlivněna fylogenetickými vztahy a změny jsou plynulé (ne skokové). Další testované vlastnosti charakteru evoluce (adaptivní radiace, druhově specifická radiace a převažující množství změn v krátkých/dlouhých větvích) prokázány nebyly. Nejblíže má studovaný soubor dat k převažujícím změnám v delších větvích. Velikost genomu předka byla odhadnuta na 1C = 0,73–0,83 pg a C_x = 0,21 pg.

Seznam použité literatury

Ackerly D. D. (2006): Analysis pf traits (AOT): A module of phylocom. Version 3.1. http://www.phylodiversity.net/phylocom.

Albach D. C., Greilhuber J. (2004): Genome size variation and evolution in *Veronica*. Ann. Bot. 94: 897–911.

Alvarez I., Wendel J. F. (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Mol. Phyl. Evol. 29: 417–434.

Beaulieu J. M., Leitch I. J., Patel S., Pendharkar A., Knight C. A. (2008): Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. New Phytol. 179: 975–986.

Beaulieu J. M., Moles A. T., Leitch I. J., Bennett M. D., Dickie J. B., Knight C. A. (2007): Correlated evolution of genome size and seed mass. New Phytol. 173: 422–437.

Beltran I. C., Kam Y. K. (1984): Cytotaxonomic studies in the Zingiberaceae. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh, 41: 541–559.

Bennett M. D. (1971): Duration of meiosis. Proc. R. Soc. B. 178: 277–299.

Bennett M. D. (1972): Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. Proc. R. Soc. B. 181: 109–135.

Bennett M. D. (1998): Plant genome values: How much do we know? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2011–2016.

Bennett M. D., Bhandol P., Leitch I. J. (2000): Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. Ann. Bot. 86: 859–909.

Bennett M. D., Leitch I. J. (2000): Variation in nuclear DNA amount (C-value) in monocots and its significance. In: Wilson K. L., Morrison D. A., (eds), Moncots: systematics and evolution. Melbourne: CSIRO, 137–146.

Bennett M. D., Leitch I. J. (2010): Angiosperm DNA C-values Database (Release 7.0, Dec. 2010). http://www.kew.org/cvalues/

Bennett M. D., Smith J. B., Seal A. G. (1986): The karyotype of the grass *Zingeria iebersteiniana* (2n =4) by light and electron microscopy. Canadian Journal of Genetics and Cytology 28: 544–562.

Bennetzen J. L., Kellogg E. A. (1997): Do plants have a one-way ticket to genomic obesity? Plant Cell 9: 1509–1514.

Bennetzen J. L., Ma J., Devos K. M. (2005): Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. Ann. Bot. 95: 127–132.

Bhowmik S. D. S., Kumaria S., Tandon P. (2010): Rhizome derived callogenic plantlet production of *Mantisia wengeri* (Zingiberaceae), a rare and endemic medicinal plant of Mizoram, North-East India. Int Res J Biotechnol, 1: 65–70.

Bisson S., Guillemet S., Hamel J. L. (1968): Contribution a l'étude caryo-taxonomique des Scitaminées. Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle. Série B. Botanique, 18: 59–145.

Box MS. and Rudall PJ. (2006). Floral structure and ontogeny in Globba (Zingiberaceae). Plant Systematics and Evolution 258: 107–122.

Chase M. W., Hanson L., Albert V. A., Whitten W. M., Williams N. H. (2005): Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). Ann. Bot. 95: 191–199.

Chrtek J. Jr, Zahradnicek J., Krak K. and Fehrer J. (2009): Genome size in *Hieracium* subgenus *Hieracium* (Asteraceae) is strongly correlated with major phylogenetic groups Ann. Bot. 104(1): 161–178.

Cox A. V., Abdelnour G. J., Bennett M. D., Leitch I. J. (1998): Genome size and karyotype evolution in the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae). Am. J. Bot. 85: 681–687.

Cui L., Wall P. K., Leebens-Mack J. H., *et al.* (13 spoluautorů) (2006): Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. Genome Res. 16: 738–749.

Darlu P., Lecointre G. (2002): When does the inkongruence length difference test fail? Mol. Biol. Evol. 19:432–437.).

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.

Datta N, Sarkar AK. (1980): Cytology of *Mantisia*: a genus under the family Zingiberaceae. Cell Chrom. Newsl. 3. (2): 39 – 40.

Devos K. M., Brown J. K. M., Bennetzen J. L. (2002): Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. Genome Res. 12: 1075–1079.

Doležalová I., Lebeda A., Janeček J., Číhalíková J., Křístková E., Vránová O. (2002): Variation in chromosomes numbers and nuclear DNA contents in genetic resources of *Lactuca* L. Species (Asteraceae). Gen. Res. Crop Evol. 49: 383–395.

Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., Greilhuber J. (2003): Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry Part A, 51A:127–128.

Doležel J., Greilhuber J., Suda J. (2007): Flow cytometry with plant cells. Wiley-VCH, Weinheim.

Dušková E., Kolář F., Sklenář P., Rauchová J., Kubešová M., Fér T., Suda J., Marhold K. (2010): Genome size correlates with growth form, habitat and phylogeny in the Andean genus *Lasiocephalus* (Asteraceae). Preslia 82: 127–148.

Elder J. F. Jr, Turner B. J. (1995): Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. Q Rev Biol 70:297–320.

Endress P. K. (1994): Diversity and evolutionary biology of tropical flowers.Cambridge University. Press. ISBN 0521 420881, 420 pages.

Erben M. (1996): The significance of hybridization on the forming of species in the genus Viola. Bocconea, Monographiae Herbarii Mediterranei Panormitani 5: 113–118.

Farris J. S., Kallersjo M., Kluge A. G., Bult C. (1994): Testing significance of incongruence. Cladistics 10: 315–319.

Felsenstein J. (1985): Phylogenies and the comparative method. American Naturalist 125: 1–15.

Flavell R. (1980): The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences. Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 569–596.

Francis D., Davies M. S., Barlow P. W. (2008): A strong nucleotypic effect on the cell cycle regardless of ploidy level. Ann. Bot. 101: 747–757.

Gregory T. R. (2004): Macroevolution, hierarchy theory, and the C-value enigma. Paleobiology 30 (2): 179–202.

Gregory T. R. (2005): The evolution of the genome, ed. Gregory, T. R. (Elsevier, San Diego, CA), pp. 3–87

Greilhuber J., Borsch T., Müller K., Worberg A., Porembski S., Barthlott W. (2006): Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae, with chromosomes of bacterial size. Plant Biol. 8: 770–777.

Greilhuber J., Doležel J., Lysák M. A., Bennett M. D. (2005): The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'Genome size' and 'C-value' to describe Nuclear DNA contents. Ann. Bot. 95: 255–260.

Grover C. E., Wendel J. F. (2010): Recent insights into mechanisms of genome size change in plants. Le Journal de Botanique, doi: 10.1155/2010/382732.

Grover C. E., Yu Y., Wing R. A., Paterson A. H., Wendel J. F. (2008): A phylogenetic analysis of indel dynamics in the cotton genus. Mol. Biol. Evol. 25: 1415–1428.

Gurushidze M., Fuchs J., Blattner F. R. (2012): The evolution of genome size variation in drumstick onions (*Allium* subgenus *Melanocrommyum*). Syst. Bot. 37 96–104.

Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 9 pp.

Harmon L. J., Weir J. T., Brock C. D., Glor R. E., Challenger W. (2008): GEIGER: investigating evolutionary radiations. Bioinformatics 24: 129–131.

Hawkins J. S., Grover C. E., Wendel J. F. (2008): Repeated big bangs and the expanding universe: directionality in plant genome size evolution. Plant Sci. 174: 557–562.

Hawkins J. S., Proulx S. R., Rapp R. A., Wendel J. F. (2009): Rapid DNA loss as a counterbalance to genome expansion through retrotransposon proliferation in plants. PNAS 106 (42): 17811–17816.

Heslop-Harrison J. S., Schwarzacher T. (2011): Organization of the plant genome in chromosomes. Plant J. 66: 18–33.

Ho P. H. (1999): Cây co Viet Nam. Than pho Ho Chí Minth: Nhá Yuat Ban Tre, 991 pp.

Hodgson J. G., Sharafi M., Jalili A., Díaz S., *et al.* (38 spoluauthorů) (2010): Stomatal vs. genome size in angiosperms: the somatic tail wagging the genomic dog? Ann. Bot. 105: 573–584.

Holttum R. E. (1950): The Zingiberaceae of the Malay Peninsula. Gardens' Bulletin Singapore, Vol. 8, Part 1, pp. 1–250.

Huelsenbeck J. P., Ronquist F. R. (2001): MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17: 754–755.

Huson D. H. and Scornavacca C. (2012): Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks, Systematic Biology.

Jakob S. S., Meister A., Blattner F. R. (2004): The considerable genome size variation of *Hordeum* species (Poaceae) is linked to phylogeny, life form, ecology, and speciation rates. Mol. Biol. Evol. 21: 860–869.

Jones A. G. (1985): The hybrid origin of *Aster ascendens* (Asteraceae). Amer. J. Bot. 72:268–277.

Kato M., Itino T., Nagamitsu T. (1993): Melittophily and ornithophily of long-tubed flowers in Zingiberaceae and Gesneriaceae in West Sumatra. Tropics 2, 129–142.

Kaur N., Datson P. M., Murray B. G. (2012): Genome size and chromosome number in the New Zealand species of *Schoenus* (Cyperaceae). Biol. J. Linn. Soc. 169(3): 555–564

Kellogg E. A., Bennetzen J. L. (2004): The evolution of nuclear genome structure in seed plants. Am. J. Bot. 91:

1709–1725.

Khandelwal S. (1990): Chromosome evolution in the genus *Ophioglossum* L. Biol. J. Linn. Soc. 102: 205–217.

Kim S., Donoghue M. J. (2008): Incongruence between cpDNA and nrITS trees indicates extensive hybridization within *Eupersicaria* (Polygonaceae). American Journal of Botany 95: 1122–1135.

Knight C. A., Ackerly D. D. (2002): Variation in nuclear DNA kontent across environmental gradients: A quantile regression analysis. Ecol. Lett. 5: 66–76.

Knight C. A., Molinari N. A., Petrov, D. A. (2005): The large genome constraint hypothesis: Evolution, ecology and phenotype. Ann. Bot. 95: 177–190.

Krahulcová A. (1998): Karyologie cévnatých rostlin při aplikaci klasického barvení chromozómů. Příručka praktických cvičení pro posluchače katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK.

Krak K. (2011): Sekvenování. In: Mandák B., Krahulec F. & Hroudová Z. [eds] (2011): Evoluční aspekty biologie rostlin. Evolutionary aspects of plant biology. - Materiály 25, 2011, 139p

Kress W. J., Defilipps R. A., Farr E., Kyi Y. Y. (2003): A checklist of the trees, shrubs, herbs, and climbers of Myanmar. Contributions from the United States National Herbarium 45: 1–590.

Kress W., Prince L. M., Williams K. J. (2002): The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. Am. J. Bot. 89: 1682–1696.

Kubis S., Schmidt T., Heslop-Harrison J. S. (1998): Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. Ann. Bot. 82S, 45–55.

Larsen K. (1972): Studies in the genus *Globba* in Thailand. Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh 31: 229–241.

Larsen K. (1996): A preliminary checklist of the Zingiberaceae of Thailand. Thai Forest Bulletin, Botany 24: 35–49.

Larsen K., Larsen S. (2006): Gingers of Thailand. Queen Sirikit Botanic Garden. The Botanical Garden Organization, Chiang Mai.

Leitch I. J., Beaulieu J. M., Chase M. W., Leitch A. R., Fay M.F. (2010) Genome size dynamics and evolution in monocots. J. Bot. 2010, 1–19.

Leitch I. J., Beaulieu J. M., Cheung K., Hanson L., Lysak M., Fay M. F. (2007): Punctuated genome size evolution in Liliaceae. J. Evol. Biol. 20: 2296–2308.

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. Biol. J. Linn. Soc. 82: 651–663.

Leitch I. J., Chase M. W., Bennett M. D. (1998): Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. Ann. Bot. 82: 85–94.

Leitch I. J., Kahandawala I., Suda J., et al. (2009): Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. Ann. Bot. 104: 469–481.

Leitch I. J., Soltis D. E., Soltis P. S., Bennett M. D. (2005): Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). Ann. Bot. 95: 207–217.

Leitch A. R., Leitch I. J. (2012): Ecological and genetic factors linked to contrasting genome dynamics in seed plants. New Phytol. 194(3): 629–46.

Leong-Škorničková J., Šída O., Jarolímová V., Sabu M., Suda J. (2007): Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae). Ann. Bot. 100: 505–526.

Lim S. N. (1972): Cytogenetics and taxonomy of the genus *Globba* L. (Zingiberaceae) in Malaya 2: cytogenetics. Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh 31: 229–241.

Lim S. N. (1973): Cytogenetics and taxonomy of the genus *Globba* L. (Zingiberaceae) in Malaya 5: introgressive hybridization in hexaploids. Bot. J. Linn. Soc. 66: 143–156.

Lysák M. A., Koch M. A., Beaulieu J. M., Meister A., Leitch I. J. (2009): The Dynamic Ups and Downs of Genome Size Evolution in Brassicaceae. Mol. Biol. Evol. 26 (1): 85–98.

Ma X. F., Gustafson J. P. (2005): Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. Cytogenetic and Genome Research, 109:236–249.

Maddison W. P. (1991): Squared-change parsimony reconstructions of ancestral states for continuous-valued characters on a phylogenetic tree. Systematic Zoology. 40: 304–314.

Maddison W. P., Maddison D. R. (2007): Mesquite: a modular systém for evolutionary analysis. Version 2.01 [Internet]. Available from: http://mesquiteproject.org.

Mahanty H. K. (1970): A cytological study of the Zingiberales with special reference to their taxonomy. Cytologia, 35: 13–49.

Mandáková T., Joly S., Krzywinski M., Mummenhoff K., Lysák M., (2010): Fast diploidization in close mesopolyploid relatives of *Arabidopsis*. Plant Cell. 2010, 22, pp. 2277–2290.

Martins E. P. (2004): COMPARE, version 4.6b. Computer programs for the statistical analysis of comparative data. Distributed by the author at http://compare.bio.indiana.edu/. Department of Biology, Indiana University, Bloomington IN.

Mort M. E., Archibald J. K., Randle C. P., Levsen N. D., O'Leary T. R., Topalov K., Wiegand C. M., Crawford D. J. (2007): Inferring phylogeny at low taxonomic levels: utility of rapidly evolving cpDNA and nuclear ITS loci. Amer. J. Bot. 94(2): 173—183.

Müller L. (1931): Über den Bau und die Mechanik der Blüte von Globba atrosanguinea. Oesterreichische Botanische Zeitschrift 80: 149–161.

Naganowska B., Wolko B., Sliwinska E., Kaczmarek Z. (2003): Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus *Lupinus* (Fabaceae). Ann. Bot. 92: 349–355.

Newman M. F. (1988): Aspects of cytotaxonomy and reproductive biology of some Zingiberaceae. Ph.D. Thesis. Department of Botany, University of Aberdeen, Aberdeen, UK, p. 180.

Newman M. F., Jong K. (1986): Cytotaxonomic observations on *Mantisia wardii* (Zingiberaceae). Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh 43: 493–496.

Newman M., Ketphanh S., Svengsuksa B., Thomas P., Sengdala K., Lamxay V., Armstrong K. (2007): A checklist of the vascular plants of Lao PDR. Edinburgh, U.K., Royal Botanic Garden Edinburgh.

Newman M., Lhuillier A., Poulsen A. D. (2004): Checklist of the Zingiberaceae of Malesia. Blumea Supplement 16, Nationaal Herbarium Nederland: Universitet Leiden branch, Leiden, 166 pp.

Noltie H. J. (1994): Flora of Bhutan Vol.3., Part2. Royal Bot. Garden,Edinburgh, pp. 883.

Nunn C.L. (2011): The Comparative Method in Evolutionary Anthropology and Biology. University of Chicago Press.

Nylander J. A. A. (2004): MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

O'Meara B. C., Ane C., Sanderson M. J., Wainwright P. C. (2006): Testing for different rates of continuous trait evolution using likelihood. Evolution. 60:922–933.

Ohri D. (2005): Climate and growth form: the consequences for genome size in plants. Plant Biol. 7: 449–458.

Oliver M. J., Petrov D., Ackerly D., Falkowski P., Schofield O. M. (2007): The mode and tempo of genome size evolution in eukaryotes. Genome Res. 17: 594–601.

Orme C. D. L., Freckleton R. P., Thomas G. H., Petzoldt T., Fritz S. A., *et al.* (2012): caper: Comparative Analyses of Phylogenetics and Evolution in R. R package version 0.5.

Otto F. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman H. A. & Darzynkiewicz Z. (eds.): Methods in Cell Biology, Vol. 33. pp. 105–110. Academic Press, New York.

Pagel M. (1997): Inferring evolutionary processes from phylogenies. Zoologica Scripta 26: 331–348.

Pagel M. (1999): Inferring the historical patterns of biological evolution. Nature, 401: 877–884.

Pagel M., Meade A., Barker D. (2004): Bayesian estimation of ancestral character states on phylogenies. Systematic Biology 53: 673–684.

Paradis E, Claude J., Strimmer K. (2004): APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R langure. Bioinformatics 20(2): 289–290.

Paton A. J., Brummitt N., Govaerts R., *et al.* (2008): Towards Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation: a working list of all known plant species – progress and prospects. Taxon 57: 602–611.

Pellicer J., Fay M. F., Leitch I. J. (2010): The largest eukaryotic genome of them all? Bot. J. Linn. Soc. 164: 10–15.

Posada D., Crandall K. A. (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14 (9): 817–818.

Price H. C., Dillon S. L., Hodnett G., Rooney W. L., Ross L., Johnston J. S. (2005): Genome evolution in the genus *Sorghum* (Poaceae). Ann. Bot. 95: 219–227.

R Development Core Team (2011): R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-900051-07-0. Available online at http://www.R-project.org/

Raghavan T. S., Venkatasubban K. R. (1943): Cytological studies in the family Zingiberaceae with special reference to chromosome number and cyto-taxonomy. Proceedings of Indian Academy of Sciences Series B, 17: 118–132.

Ramachandran K. (1969): Chromosome numbers in Zingiberaceae. Cytologia 34: 213–221

Rambaut A., Drummond A. J. (2007): Tracer v1.4, Available from http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer

Ricroch A., Yockteng R., Brown S. C., Nadot S. (2005): Evolution of genome size across some cultivated Allium species. Genome 48, 511–520.

Ridley H. N. (1909): The Scitamineae of the Philippine Islands. Reprinted from The Philippine Journal of Science, Vol. 4, No. 2, Section C. Bureau of Science of the Philippine Government, Manila, pp. 155–199.

Ronquist F., van der Mark P., Huelsenbeck J. P. (2009): Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes. In: Vandamme AM, Salemi M, and P. Lemey (eds). The Phylogenetic Handbook 2nd Edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Ross-Ibarra J. (2007): Genome size and recombination in Angiosperms: a second look. J. Evol. Biol. 20: 800–806.

Sánchez-Jiménez I., Hidalgo O., Canela M., Siljak-Yakovlev S., Šolić M. E., Vallès J., Garnatje T. (2012): Genome size and chromosome number in *Echinops* (Asteraceae, Cardueae) in the Aegean and Balkan regions: technical aspects of nuclear DNA amount assessment and genome evolution in a phylogenetic frame. Plant Syst. Evol. pp. 1–15.

Sato D. (1960): Scientific Papers of the College of General Education. Vol. 10. University of Tokyo. The karyotype analysis in Zingiberales with special reference to the protokaryotype and stable karyotypu, p. 225–243.

Schubert I. (2007): Chromosome evolution. Curr. Opin. Plant Biol. 10, 109–115

Schubert I., Lysák M. (2011): Interpretation of caryotype evolution should consider chromosome structural constraints. Trends Genet. 27, p. 207–216.

Schumann K. (1904): Zingiberaceae. In: A. Engler [ed.], Das Pflanzenreich 4 (46): 1–458. Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany.

Sharma A. K., Bhattacharya N. K. (1959): Cytology of several members of Zingiberaceae. Cellule 59: 297–346.

Sharma A. K., Kumaria S., Tandon P., Rao S. R. (2012): Comparative karyo-morphology of the two endemic and critically-endangered species of *Mantisia* (Zingiberaceae) · The Nucleus 55: 51–55

Shaw J., Lickey E., Beck J. T., Farmer S. B., Liu W., Miller J., Siripun K. C., Winder C. T., Schilling E. E., Small R. L. (2005): The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. American Journal of Botany 92: 142–166.

Simmons M. P., Ochoterena H. (2000): Gaps as characters in sequencebased phylogenetic analyses. Syst Biol, 49: 369–381.

Simpson M. G. (2005): Plant Systematics. ISBN 978-0-12-644460-5

Singh S. K., Kumar R. (2011): *Globba wardii* (Zingiberaceae) – a Very Rare Species, New Record for India, Taiwania, 56(3): 261–264.

Sirirungsa P. (1998): Thai Zingiberaceae: species, diversity and their uses. Pure Appl Chem. 70: 98–110.

Šmarda P., Bureš P., Horova L., Foggi B., Rossi G. (2008): Genome size and GC kontent evolution of Festuca: ancestral expansion and subsequent reduction. Ann. Bot. 101: 421–433.

Soltis D. E., Soltis D. E., Albert V. A., Leebens-Mack J., Bell Ch. D., Paterson A. H., Zheng Ch., Sankoff D., Depamphilis C. W., Wall P. K., Soltis P. S. (2009): Polyploidy and angiosperm diversification. Am. J. Bot. 96: 336–348.

Soltis D. E., Soltis P. S., Bennett M. D., Leitch I. J. (2003): Evolution of genome size in the angiosperms. Am. J. Bot. 90: 1596–1603.

Soontornchainaksaeng P., Anamthawat-Jónsson T. (2011): Chromosome number variation of phytoestrogen-producing *Curcuma* (Zingiberaceae) from Thailand. Journal of Natural Medicines 64: 370–377.

Swift H. (1950): The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 36: 643–654.

Swofford D. L. (2002): PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), v 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

Takano A. (2001): Cytological analyses of 19 taxa in *Globba* (Zingiberaceae). Acta Phytaxonomica et Geobotanica 52: 65–74.

Takano A., Okada H. (2002): Multiple occurrences of triploid formation in *Globba* (Zingiberaceae) from molecular evidence. Plant Systematics and Evolution 230: 143–159.

Tanaka R., Terasaka O. (1972): Absence of the nucleolar constriction in the division of the generative nucleus of *Haplopappus gracilis*. Chromosoma 37: 95–100.

Tavaré S. (1986): "Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences". Lectures on Mathematics in the Life Sciences (American Mathematical Society) 17: 57–86.

The Plant List (2010): Version 1. Published on the Internet; http://www.theplantlist.org/ (accessed 1st January).

Thomas C. A. (1971): The genetic organization of chromosomes. Ann. Rev. Gen. 5: 237–256.

Uhl C. H. (1978): Chromosomes of Mexican *Sedum* II. Section Pachysedum. Rhodora 80: 491–512.

Vanzela A. L. L., Luceño M., Guerra M. (2000): Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). Biol. J. Linn. Soc. 134: 557–566.

Vicient C. M. (2010): Trascriptional activity of transposable elements in maize. BMC Genomics 11:1471–2164

Vinogradov A. E. (2003): Selfish DNA is maladaptive: Evidence from the plant Red List. Trends Genet. 19: 609–614.

Vitte C., Bennetzen J. L. (2006): Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 17638–17643.

Vitte C., Panaud O. (2003): Formation of solo-LTRs through unequal homologous recombination counterbalances amplifications of LTR retrotransposons in rice *Oryza sativa* L. Mol. Biol. Evol. 20: 528–540.

Vitte C., Panaud O. (2005): LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model. Cytogenetic and Genome Res. 110: 91–107.

Webb C. O., Ackerly D. D. & Kebles S. W. (2008): Phylocom: software for the analysis of phylogenetic community structure and character evolution. Bioinformatics 24: 2098–2100.

Wei F., Coe E., Nelson W., Bharti A. K., Engler F., *et al.* (2007). Physical and genetic structure of the maize genome reflects its komplex evolutionary history. PLoS Genet. 3: e123.

Weiss-Schneeweiss H., Greilhuber J., Schneeweiss G. M. (2006): Genome size evolution in holoparasitic *Orobanche* (Orobanchaceae) and related genera. Am. J. Bot. 93: 148–156.

Wendel J. F., Cronn R. C., Johnston J. S., Price H. J. (2002): Feast and famine in plant genomes. Genetica 115: 37–47.

Weng M. L., Ruhlman T. A., Gibby M., Jansen R. K. (2012): Phylogeny, rate variation, and genome size evolution of *Pelargonium* (Geraniaceae). Mol Phylogenet Evol. 64(3):654–70.

Williams K. J., Kress J. W., Manos P. S. (2004): The phylogeny, evolution and classification of the genus *Globba* and the tribe Globbeae (Zingiberaceae): appendages do matter. Am. J. Bot. 91: 100–114.

WU, Z.-Y., RAVEN, P.H., HONG, D.-Y. (eds.) (1994+): Flora of China. Available from: [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10960], retrieved 23rd November 2011.

Záveská E., Fér T., Šída O., Leong-Škorničková J., Sabu M., Marhold K. (2011): Genetic diversity patterns in Curcuma reflect differences in genome size. Bot. J. Linn. Soc. 165: 388–401.

Zharkikh A. (1994): Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. J Mol Evol. 39(3): 315–29.

Zwickl D. J. (2006). Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin. Staženo z http://garli.googlecode.com

Zwickl D. J. (2008): GARLI v0.96 manual [Documentation file]. Available with the program at http://code.google.com/p/garli/

Přílohy

Příloha 1: Seznam druhů tribu Globbeae podle geografických oblastí.

Malajsie

Globba acehensis, G. albiflora, G. albobracteata, G. atrosanguinea, G. aurantica, G. aurea, G. brachyanthera, G. brevifolia, G. bulbifera, G. campsophylla, G. cernua, G. corneri, G. curtisii, G. dubia, G. ectobolos, G. fecunda, G. flavibracteata, G. fragilis, G. franciscii, G. glandulosa, G. gracilis, G. hasseltii, G. holttumii, G. latifolia, G. leucantha, G. leucocarpa, G. maculata, G. marantina, G. merrilli, G. multifolia, G. muluensis, G. nawawii, G. paniculata, G. parviflora, G. patens, G. paucibractea, G. pendula, G. propinqua, G. pumila, G. pyramidata, G. talangensis, G. tricolor, G. unifolia, G. urophylla, G. ustulata, G. variabilis.

Thajsko

Gagnepainia godefroyi, Gagnepainia harmandii, Gagnepainia thoreliana, Hemiorchis rhodorrhachis, H. burmanica; Globba adhaerens, G. albiflora, G. annamensis, G. barthei, G. bulbifera, G. cambodgensis, G. cernua, G. colpicola, G. fasciata, G. flagellaris, G. fragilis, G. garrettii, G. geoffroyi, G. globulifera, G. integra, G. keithii, G. kerrii, G. laeta, G. leucantha, G. macrocarpa, G. marantina, G. nisbetiana, G. nuda, G. obscura, G. patens, G. pendula, G. platystachya, G. praecox, G. purpurascens, G. racemosa, G. reflexa, G. schomburgkii, G. siamensis, G. strobilifera, G. substrigosa, G. thorelii, G. unifolia, G. variabilis, G. villosula, G. winitii, G. xantholeuca, G. yetsiana.

Barma (= Myanmar)

Gagnepainia godefroyi, Hemiorchis burmanica H. pantlingii, H. rhodorrhachis Globba arracensis, G. bracteolata, G. bulbifera, G. cernua, G. expansa, G. hookeri, G. insectifera, G. kerrii, G. laeta, G. macroclada, G. marantina, G. mogokensis, G. multiflora, G. orixensis, G. pauciflora, G. pendula, G. racemosa, G. schomburgkii, G. sessiliflora, G. stenothyrsa, G. subscaposa, G. substrigosa, G. winitii.

Laos

Globba adhaerens, G. albiflora, G. angcorensis, G. annamensis, G. bathei, G. clarkei, G. expansa, G. globulifera, G. macrocarpa, G. marantina, G. parva, G. pendula, G. racemosa, G. reflexa, G. rosea, G. schomburgkii, G. siamensis, G. thorelii, G. villosula.

Bhútán

Hemiorchis pantlingii, Globba andersonii, G. clarkei, G. multiflora, G. macroclada, G. racemosa

Vietnam

Gagnepainia godefroyi, Gagnepainia thoreliana, Globba schomburgkii, G. angcorensis, G. annamensis, G. barthei, G. cambodgensis, G. globulifera, G. macrocarpa, G. marantina, G. parva, G. rosea, G. pendula, G. violacea, G. wallichii.

Příloha 2: Seznam použitých jedinců, informace o lokalitě sběru a herbářových položkách.

identifikační kód	FCM kód	druh	sekce	lokalita	GPS	sběratel	nadm. výška [m n. m]	datum	herbář	číslo herbářové položky
T1151		Gagnepainia godefroyi (Baill.) K.Schum.		Ping Khong	19.57708 N; 99.06157 E		680	23.5.2011		
E19871253	FCM 078	Gagnepainia godefroyi (Baill.) K.Schum.		Thailand					E	e00149940
E20010444	FCM 054	Gagnepainia godefroyi (Baill.) K.Schum.		Thailand						
E19991163	FCM 084	Gagnepainia harmandii (Baill.) K.Schum.		Thailand					E	e00228077
T1118	FCM 478	Globba cf. villosula Gagnep. = adhaerens Gagnep.	Globba	Doi Suthep foothills	18.81408 N; 98.93708 E		490	22.5.2011	PRC	bude
E20100769		Globba albiflora var. albiflora Ridl.	Nudae-mediocalcaratae	Cambodia		Collected by Newman, Mark F. Collection number: 2415			no	
VL 2415	FCM 147	Globba albiflora var. albiflora Ridl.	Nudae-mediocalcaratae							
E20060805	FCM 107 FCM 134	Globba albiflora var. aurea Holttum	Nudae-mediocalcaratae	Lao, Bolikhamxai		Collected by Newman, M F; Thomas, P I; Armstrong, K E; Sengdala, Khamphone & Lamxay, Vichith Collection number: LAO 1529		31.5.2006		
E20081062	FCM 104	Globba albiflora var. aurea Holttum	Nudae-mediocalcaratae	Viet Nam, Lam Dong Prov.		Collected by Tran, Huu Dang		23.6.2008	E	e00421682
Dang 425	FCM 250	Globba albiflora var. aurea Holttum	Nudae-mediocalcaratae	Vietnam, Đăk Nông Prov., Dray Sap waterfall	12°32'14.7"N 107°53'30.3"E					
E20060805	FCM 076	Globba albiflora var. aurea Holttum	Nudae-mediocalcaratae	Lao					E	e00294327
E20081112	FCM 121	Globba albiflora var. aurea Holttum	Nudae-mediocalcaratae	Viet Nam, Dong Nai Prov.		Collected by Tran, Huu Dang Collection number: 44		18.6.2008	E	e00421689
Borneo-VR	FCM 033	Globba atrosanguinea Teijsm. & Binn.	Sempervirens							
E19820784	FCM 110	Globba atrosanguinea Teijsm. & Binn.	Sempervirens	Malaysia, Sarawak		Collected by Sinclair, Ian W.J. & Argent, George C.G. Collection number: 85		8.3.1982	E	e00294290
E20110273	FCM 630	Globba brachyanthera K.Schum.	Ceratanthera	Indonesia : Kalimantan Barat		Collected by Conlon, Tony; Argent, George; & Sharp, Nicky Collection number: 1		17.2.2011		
T11137	FCM 486	Globba careyana Roxb. = sessiliflora Sims	Haplanthera	QSBG					PRC	bude
M11-6	FCM 528	Globba cernua Baker	Sempervirens	Malaysia, Pahang, Fraser´s Hills	3°42'28" N; 101°43'10" E		1230	19.11.2011		
PŠ 006/2010	FCM 071	Globba cernua Baker	Sempervirens							
Jaap 5396	FCM 195	Globba cf cernua Baker	Sempervirens	Peninsular Malaysia, exact locality unknown						
JLS 586	FCM 196	Globba corneri A.A.Weber	Sempervirens	Peninsular Malaysia, exact locality unknown						
T11158	FCM 490	Globba fragilis S.N.Lim	Sempervirens	Tak						
E20100754		Globba geoffrayi Gagnep.	Ceratanthera	Cambodia		Collected by Newman, Mark F. Collection number: 2422				
E19991624	FCM 127	Globba aff. kerrii Craib	Nudae-nudae	Thailand		Collected by Argent, George C.G. Collection number: 3		24.8.1999	E	e00294324
T1163	FCM 487	Globba kerrii Craib	Nudae-nudae	Pong Yaeng	18.92203 N, 98.81917 E		1070	24.5.2011	PRC	bude
KL20100197	FCM 543	Globba leucantha Miq.	Ceratanthera							
JŠ 71405	FCM 338	Globba macroclada Gagnep.	Haplanthera							
E20081050	FCM 123	Globba marantina L.	Globba	Viet Nam : Kien Giang Prov.		Collected by L□ Ngoc Sâm Collection number: LY258			E	e00421681
E19613981	FCM 102	Globba marantina L.	Globba	cultivated					E	e00421691
Dang 256	FCM 249	Globba marantina L.	Globba	Vietnam, Kon Tum Prov., road to Kon Plong	14°30'58.4"N 108°15'05.8"E					

E20081066	FCM 120	Globba aff. marantina L.	Globba	Viet Nam : Lam Dong Prov.		Collected by Tran, Huu Dang		23.6.2008		
E19871259	FCM 126	Globba aff. marantina L.	Globba	Thailand		Collected by Newman, Mark F.				
ex PBG	FCM 706	Globba bulbifera Roxb. = marantina L.	Globba							
DANG 423	FCM 704	Globba marantina L.	Globba							
T1110	FCM 355	Globba nisbetiana Craib	"Nisbetiana"	Doi Suthep	18.79954 N; 98.91867 E		1040	22.5.2011	PRC	bude
T1111	FCM 491	Globba nuda K.Larsen	Nudae-nudae	Doi Suthep	18.79954 N; 98.91867 E		1040	22.5.2011	PRC	bude
T1134	FCM 485	Globba nuda K.Larsen	Nudae-nudae	Pong Yaeng	18.90882 N; 98.85491 E	18.90983 N; 98.85467 E	870	23.5.2011	PRC	bude
E19680620	FCM 116	Globba patens Miq.	Sempervirens	Malaysia : Selangor/Pahang border		Collected by Woods, Patrick James Blyth Collection number: 596		1.4.1968	E	e00269263
M11-4	FCM 526	Globba patens Miq.	Sempervirens	Malaysia, Pahang, Fraser´s Hills	3°42'28" N; 101°43'10" E		1230	19.11.2011		
Yala prov.	FCM 340	Globba patens Miq.	Sempervirens							
M11-5	FCM 527	Globba patens x cernua	Sempervirens	Malaysia, Pahang, Fraser´s Hills	3°42'28" N; 101°43'10" E		1230	19.11.2011		
E19860743	FCM 130	Globba fasciata Ridl. = pendula Roxb.	Ceratanthera	Thailand, Nakhon Si Thammarat		Collected by Newman, Mark F.			E	e00269278
JLS 529	FCM 166	Globba pendula Roxb.	Ceratanthera	Đồng Nai Prov., Tân Phú forest, Ngã 3 Quân Y						
E19841210	FCM 106	Globba propinqua Ridl.	Sempervirens	Malaysia : Sabah		Collected by Argent, George C.G. Collection number: 84/58		1.3.1984		
E19841252	FCM 101	Globba propinqua Ridl.	Sempervirens	Malaysia : Sabah		Collected by Argent, George C.G. Collection number: 84/100			E	e00269271
E19772463	FCM 105	Globba propinqua Ridl.	Sempervirens	Malaysia : Sabah		Collected by Gardner, Martin Fraser Collection number: 28		30.5.1905		
E19841255	FCM 118	Globba propinqua Ridl.	Sempervirens	Malaysia : Sabah		Collected by Argent, George C.G. Collection number: 84/103				
E19841210	FCM 109	Globba propinqua Ridl.	Sempervirens	Malaysia : Sabah		Collected by Argent, George C.G. Collection number: 84/58		1.3.1984		
T1112	FCM 476	Globba purpurascens Craib	Globba	Doi Suthep	18.79954 N; 98.91867 E		1040	22.5.2011	PRC	bude
T1164	FCM 481	Globba purpurascens Craib	Globba	Pong Yaeng	18.92203 N, 98.81917 E		1070	24.5.2011	PRC	bude
T1154	FCM 480	Globba purpurascens Craib	Globba	Mueang Na	19.33428 N; 98.88434 E		850	23.5.2011	PRC	bude
E19920039	FCM 369	Globba clarkei Baker = racemosa Sm.	Haplanthera	Nepal		Collected by Edinburgh Makalu Expedition (1991) Collection number: 74		19.9.1991		
E20011052	FCM 368	Globba racemosa Sm.	Haplanthera	Nepal : Koshi Zone		Collected by Edinburgh Nepal Expedition (2001) Collection number: 102		28.9.2001		
T116	FCM 488	Globba racemosa Sm.	Haplanthera	Doi Pui	18.82380 N; 98.88854 E	18.82534 N; 98.88799 E	1580	22.5.2011		
E19962254	FCM 108	Globba racemosa Sm.	Haplanthera	China : Yunnan		Collected by Gaoligong Shan Biotic Survey Expedition (1996) Collection number: 7855		19.10.1996	E	e00294325
E19962152	FCM 362	Globba racemosa??		China - Yunnan		Collected by Gaoligong Shan Biotic Survey Expedition (1996) Collection number: 7411		12.10.1996		
BG Turku	FCM 705	Globba schomburgkii Hook.f.	Globba							
T11153	FCM 479	Globba siamensis (Hemsl.) Hemsl.	Globba	red form, Mukdahan						
E20060813	FCM 100	Globba siamensis (Hemsl.) Hemsl.	Globba	Lao People's Democratic Republic : Bolikhamxai		Collected by Newman, M F; Thomas, P I; Armstrong, K E; Sengdala, Khamphone & Lamxay, Vichith Collection number: LAO 1533		31.5.2006	E	e00310914
E20091357	FCM 124	Globba siamensis (Hemsl.) Hemsl.	Globba	Lao		Collected by Newman, Mark F. Collection number: VL1986				

E19991176	FCM 133	Globba aff. siamensis (Hemsl.) Hemsl.	Globba	Thailand		Collected by Newman, Mark F. Collection number: 964		6.8.1999	E	e00294297
KL20102320	FCM 536	Globba sp	Ceratanthera							
E20091380	FCM 364	Globba sp.	Globba	Lao		Collected by Newman, Mark F. Collection number: VL2008				
T1166	FCM 475	Globba sp.	Globba	between Thung Khao Phuang and Mae Na	19.65814 N; 98.95271 E		250	25.5.2011		
E20081125	FCM 111	Globba sp.	Globba	Viet Nam : Kien Giang Prov		Collected by L□ Ngoc SâmCollection number: LY257			E	e00421684
E20081055	FCM 128	Globba sp.	Globba	Viet Nam : Dak Nong Prov.		Collected by Tran, Huu Dang		24.6.2008		
T1135	FCM 474	Globba sp.	Globba	Pong Yaeng	18.90882 N; 98.85491 E		870	23.5.2011	PRC	bude
T1147	FCM 484	Globba sp.	Globba	Mueang Na	19.33443 N; 98.91802 E		620	23.5.2011	PRC	bude
T1120	FCM 477	Globba sp.	Globba	Doi Suthep foothills	18.81408 N; 98.93708 E		490	22.5.2011	PRC	bude
T1167	FCM 475	Globba sp.	Globba	between Thung Khao Phuang and Mae Na	19.65814 N; 98.95271 E		250	25.5.2011		
E20010323	FCM 115	Globba sp.	Sempervirens	Indonesia : Aceh		Collected by Smith, Paul S. Collection number: 79/62				
E19991625	FCM 132	Globba sp.	Haplanthera	Thailand		Collected by Argent, George C.G. Collection number: 4		24.8.1999		
T1146	FCM 483	Globba sp.	Nudae-nudae	Mueang Na	19.33526 N; 98.91690 E		650	23.5.2011	PRC	bude
E19972553	FCM 131	Globba sp.	Nudae-mediocalcaratae	Philippines : Luzon		Collected by RBGE & Philippine National Herb. Exped. (1997) Collection number: IS8		22.3.1997	E	e00269272
E20110269	FCM 632	Globba sp.								
T11151	FCM 489	Globba sp.		Phetchabun, G038						
E20110277	FCM 631	Globba sp.		Indonesia : Kalimantan Barat		Collected by Conlon, Tony; Argent, George; & Sharp, Nicky Collection number: 5		18.2.2011		
JLS 186	FCM 184	Globba sp. (bílá)	Ceratanthera	Peninsular Malaysia, exact locality unknown						
KL20090599	FCM 544	Globba sp. novum	Sempervirens							
T11138	FCM 473	Globba sp. novum	"Nisbetiana"	QSBG						
E20081114	FCM 129	Globba sp. novum	Globba	Viet Nam : Dak Nong Prov.		Collected by Tran, Huu Dang Collection number: 79		25.6.2008		
KL20100822	FCM 534	Globba unifolia Ridl.	Sempervirens							
Johor	FCM 547	Globba variabilis var. pustla S.N.Lim	Sempervirens							
T11162	FCM 482	Globba winitii C.H.Wright	Globba	Tak						
E19594068	FCM 114	Globba winitii C.H.Wright	Globba	Cultivated					E	e00294309
E19991652	FCM 075	Hemiorchis burmanica Kurz		Bangladesh : Chittagong		Collected by Newman, Mark F. Collection number: 1001		10.9.1999		
E19871260	FCM 079	Hemiorchis rhodorrhachis K.Schum		Thailand		Collected by Newman, Mark F.			E	e00198739

Příloha 3: Seznam použitých sekvencí z databáze GenBank.

Jméno taxonu	Informace o materiálu: sběratel, číslo, herbář	Stát	*GenBank accession number* pro ITS sekvenci	*GenBank accession number* pro *mat*K sekvenci
Outgroup				
Amomum longipetiolatum Merr.	Kress *et al*. (2002)	China	AF478722	AF478822
Boesenbergia rotunda (L.) Mansf.	Kress *et al*. (2002)	Myanmar	AF478727	AF478826
Caulokaempferia saxicola K. Larsen	Kress *et al*. (2002)	Thailand	AF478732	AF478831
Cornukaempferia aurantiflora J. Mood & K. Larsen	Kress *et al*. (2002)	Thailand	AF478736	AF478835
Curcuma roscoeana Wall.	Kress *et al*. (2002)	Thailand	AF478739	AF478839
Hedychium bordelonianum W. J. Kress & K. J. Williams	Kress *et al*. (2002)	Myanmar	AF478757	AF478856
Kaempferia rotunda L.	Kress *et al*. (2002)	Myanmar	AF478767	AF478868
Pommereschea lackneri Wittm.	Kress *et al*. (2002)	China	AF478776	AF478877
Roscoea purpurea Royle	Kress *et al*. (2002)	Himalayas	AF478787	AF478888
Siamanthus siliquosus K. Larsen & J. Mood	Kress *et al*. (2002)	Thailand	AF478790	AF478891
Vanoverberghia sepulchrei Merr.	Kress *et al*. (2002)	Philippines	AF478798	AF478899
Zingiber gramineum Blume	Kress *et al*. (2002)	Ex hort Hawaii	AF478800	AF478902
Ingroup				
Gagnepainia harmandii (Baill.) K. Schum.	Williams #02-601 [DUKE]	Thailand	AY339740	AY341103
Gagnepainia thoreliana (Baill.) K. Schum. #1	Kress *et al*. (2002)	Thailand	AF478752	AF478851
Gagnepainia thoreliana (Baill.) K. Schum. #2	Williams #00-290 [DUKE]	Thailand	AY339704	
Globba acehensis A. Takano & H. Okada#1	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049308	AB049263
Globba acehensis A. Takano & H. Okada #2	Kato et al. #8168 [BO]	Sumatra	AY339732	
Globba adhaerens Gagnep.	Williams #02-556 [DUKE]	Thailand	AY339729	AY341099
Globba albiflora Ridl. var. albiflora	Williams #00-211 [DUKE]	Thailand	AY339697	AY341091
Globba albiflora Ridl. var. aurea Holttum	Williams #98-57 [DUKE]	Ex hort Florida	AY339693	
Globba albobracteata N.E. Br.	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049314	AB049269
Globba annamenensis Gagnep.	Williams #02-582 [DUKE]	Thailand	AY339719	
Globba atrosanguinea Teijsm. & Binn. var. atrosanguinea #1	Williams #98-01 [DUKE]	Borneo	AF478753	AF478852
Globba atrosanguinea Teijsm. & Binn. var. atrosanguinea #2	Takano & Okada (2002)	Malaysia	AB049316	
Globba atrosanguinea Teijsm. & Binn. var. sumatrana A. Takano & H. Okada	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049315	AB049270
Globba aurantiaca Miq.	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049324	AB049278
Globba brachyanthera K. Schum.	Cannon #98-735 [DUKE]	Malaysia	AY339680	
Globba bulbifera Roxb.	Kress 96-5648 [US]	Myanmar	AY339691	AY341095
Globba candida Gagnep.	Williams #02-563 [DUKE]	Thailand	AY339715	
Globba cernua Baker #1	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049309	AB049264
Globba cernua Baker #2	Takano & Okada (2002)	Malaysia	AB049310	AB049265
Globba cernua Baker #3	Williams #98-12 [DUKE]	Ex hort Florida	AY339671	
Globba "complanata" sp. nov.	Williams #02-604 [DUKE]	Thailand	AY339737	
Globba copicola K. Schum.	Williams #99-51 [DUKE]	Thailand	AY339684	
Globba curtisii Holttum	Kress *et al*. (2002)	Malaysia	AF478754	AF478853
Globba deliana Valeton	Ng #2 [BO]	Sumatra	AY339733	
Globba expansa Baker	Kress #96-5643 [US]	Myanmar	AY339677	
Globba fecunda A. Takano & H. Okada #1	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049311	AB049266
Globba fecunda A. Takano & H. Okada #2	Kato *et al*. #8063 [BO]	Sumatra	AY339734	
Globba flagellaris K. Schum.	Williams #00-364 [DUKE]	Thailand	AY339743	AY341106
Globba flavibracteata A. Takano & H. Okada	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049323	AB049277
Globba fragilis S.N. Lim	Lindstrom #730 [DUKE]	Thailand	AY339721	AY341081
Globba geoffrayi Gagnep. #1	Newman #921 [E]	Thailand	AY339696	
Globba geoffrayi Gagnep. #2	Williams #00-387 [DUKE]	Thailand	AY339692	AY341087

Globba globulifera Gagnep.	Williams #99-48 [DUKE]	Ex. hort Florida	AY339690	AY341097
Globba gracilis K. Schum.	Williams #98-25 [DUKE]	Philippines	AY339669	
Globba holttumii S.N. Lim	Takano & Okada (2002)	Malaysia	AB049320	AB049275
Globba insectifera Ridl.	Williams #99-56 [DUKE]	China	AY339688	AY341080
Globba keithii Ridl.	Lindstrom #707 [DUKE]	Thailand	AY339742	AY341105
Globba laeta K. Larsen	Kress #98-6221 [US]	Thailand	AY339668	AY341086
Globba leucantha Miq. var. leucantha #1	Takano & Okada (2002)	Malaysia		AB049254
Globba leucantha Miq. var. leucantha #2	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049300	AB049255
Globba leucantha Miq. var. leucantha #3	Williams #98-03 [DUKE]	Malaysia	AY339679	AY341078
Globba leucantha Miq. var. flavidula (Ridl.) Holttum #1	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049301	AB049256
Globba leucantha Miq. var. flavidula (Ridl.) Holttum #2	Williams #98-06 [DUKE]	Malaysia	AY339675	
Globba “lindstromii” sp. nov.	Williams #01-424 [DUKE]	Thailand	AY339718	
Globba “lithophytica” sp. nov.	Williams #00-334 [DUKE]	Thailand	AY339741	AY341104
Globba macroclada Gagnep.	Kress *et al*. (2002)	India	AF478755	AF478854
Globba “magnifica” sp. nov. #1	Williams #99-53 [DUKE]	Myanmar	AY339686	
Globba “magnifica” sp. nov. #2	Lindstrom #784 [DUKE]	Thailand	AY339713	AY341100
Globba “magnifica” sp. nov. #3	Williams #98-11 [DUKE]	Thailand	AY339674	
Globba marantina L.	Williams #99-52 [DUKE]	Philippines	AY339685	AY341094
Globba mogokensis W.W. Sm. & Banerji	Kress #01-6907 [US]	Myanmar	AY339731	
Globba multiflora Wall. ex Baker	Williams #00-271 [DUKE]	China	AY339667	AY341083
Globba multifolia A. Takano & H. Okada #1	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049312	AB049267
Globba “nongnoochensis” sp. nov.	Williams #02-578 [DUKE]	Thailand	AY339726	
Globba nuda K. Larsen	Kress #98-6233 [US]	Thailand	AY339672	
Globba ophioglossa Wight	Williams #02-428 [DUKE]	India	AY339725	
Globba orixensis Roxb.	Kress #01-6897 [US]	Myanmar	AY339736	AY341101
Globba orixensis Roxb.	Kress #01-6932 [US]	Myanmar	AY339738	
Globba paniculata Valeton #1	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049296	AB049286
Globba paniculata Valeton #2	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049298	AB049253
Globba patens Miq. var. patens #1	Takano & Okada (2002)	Sumatra	AB049317	AB049272
Globba patens Miq. var. patens #2	Williams #98-08 [DUKE]	Ex hort Florida	AY339673	
Globba patens Miq. var. costulata S.N. Lim	Takano & Okada (2002)	Malaysia	AB049319	AB049274
Globba pendula Roxb. #1	Williams #98-23 [DUKE]	Ex hort Hawaii	AY339689	
Globba pendula Roxb. #2	Williams #98-24 [DUKE]	Ex hort Hawaii	AY339678	
Globba pendula Roxb. #3	Williams #02-603 [DUKE]	Thailand	AY339720	AY341088
Globba propinqua Ridl. #1	Takano & Okada (2002)	Malaysia	AB049321	AB049276
Globba propinqua Ridl. #2	Williams #98-22 [DUKE]	Ex hort Hawaii	AY339665	
Globba racemosa Sm. #1	Williams #99-58 [DUKE]	Bangladesh	AY339694	
Globba racemosa Sm. #2	Williams #00-270 [DUKE]	China	AY339703	AY341084
Globba racemosa Sm. #3	Williams #00-316 [DUKE]	Thailand	AY339699	AY341093
Globba racemosa Sm. #4	Williams #00-259 [DUKE]	China	AY339698	
Globba racemosa Sm. #5	Williams #01-500 [DUKE]	Nepal	AY339724	
Globba radicalis Roxb. #1	Kress #01-6920 [US]	Myanmar	AY339707	
Globba radicalis Roxb. #2	Kress #99-6431 [US]	Bangladesh	AY339695	AY341089
Globba reflexa Craib	Williams #99-55 [DUKE]	Thailand	AY339687	
Globba rosea Gagnep.	Williams 02-555 [DUKE]	Thailand	AY339709	
Globba schomburgkii Hook. f. #1	Takano & Okada (2002)	Thailand	AB049305	AB049260
Globba schomburgkii Hook. f. #2	Williams #98-13 [DUKE]	Ex hort Florida	AY339670	
Globba schomburgkii Hook. f. aff. (Red)	Williams #02-560 [DUKE]	Thailand	AY339728	
Globba schomburgkii Hook. f. aff. (white)	Williams #98-17 [DUKE]	Thailand	AY339681	
Globba sessiliflora Sims #1	Kress #98-5613 [US]	Myanmar	AY339666	AY341096
Globba sessiliflora Sims #2	Kress #98-6210 [US]	Thailand	AY339702	
Globba siamensis (Hemsl.) Hemsl.	Williams #02-605 [DUKE]	Thailand	AY339727	
Globba spathulata Roxb. #1	Kress et al. (2002)	Bangladesh	AF478769	AF478870
Globba spathulata Roxb. #2	Kress #01-6910 [US]	Myamar	AY339708	
Globba sp. nov.	Lindstrom #713 [DUKE]	Thailand	AY339717	

Globba sp. nov.	Williams #01-438 [DUKE]	Thailand	AY339714	
Globba sp. nov. (sect. Nudae) #2	Williams #01-443 [DUKE]	Thailand	AY339730	
Globba sp. nov. 'Saraburi winitii'	Williams #02-588 [DUKE]	Thailand	AY339711	
Globba sp. nov. 'white adherans' #1	Williams #00-385 [DUKE]	Thailand	AY339701	
Globba sp. nov. 'white adherans' #2	Williams #02-589 [DUKE]	Thailand	AY339710	
Globba substrigosa King ex Baker #1	Williams #02-602 [DUKE]	Thailand	AY339722	AY341082
Globba substrigosa King ex Baker #2	Williams #01-400 [DUKE]	Thailand	AY339723	AY341092
Globba talangensis A. Takano & H. Okada #2	Mori & Takano #8856 [BO]	Sumatra	AY339735	
Globba variabilis Ridl.	Williams #99-50 [DUKE]	Ex hort Maryland	AY339683	AY341098
Globba wardii (Burtt & R.M. Smith) K. J. Williams	Ward #22356 [L]	Myanmar	AY339739	AY341102
Globba wengeri (C. E. C. Fischer) K. J. Williams	Kress et al. (2002)	Myanmar	AF478770	AF478871
Globba winitii C. H. Wright	Williams #98-10 [DUKE]	Ex hort Florida	AY339676	
Globba winitii C. H. Wright	Lindstrom #778 [DUKE]	Thailand	AY339712	AY341085
Globba winitii aff. sp. nov.	Williams #99-33 [DUKE]	Ex hort Maryland	AY339682	
Globba xantholeuca Craib #1	Williams #00-378 [DUKE]	Thailand	AY339700	
Globba xantholeuca Craib #2	Williams #594 [DUKE]	Thailand	AY339716	AY341079
Hemiorchis pantlingii King #1 (=H. rhodorrachis of Kress *et al*. 2002)	Kress *et al*. (2002)	Thailand	AF478764	AF478862
Hemiorchis pantlingii King	Kress *et al*. (2002)	Thailand	AF478763	AF478863
Hemiorchis rhodorrachis Baker ex. K. Schum. #1	Kress #00-6666 [US]	Myanmar	AY339705	AY341090
Hemiorchis rhodorrachis Baker ex. K. Schum. #1	Kress #00-6670 [US]	Myanmar	AY339706	

Příloha 4: Vybrané fotografie metafází mitotických buněk kořenových špiček.

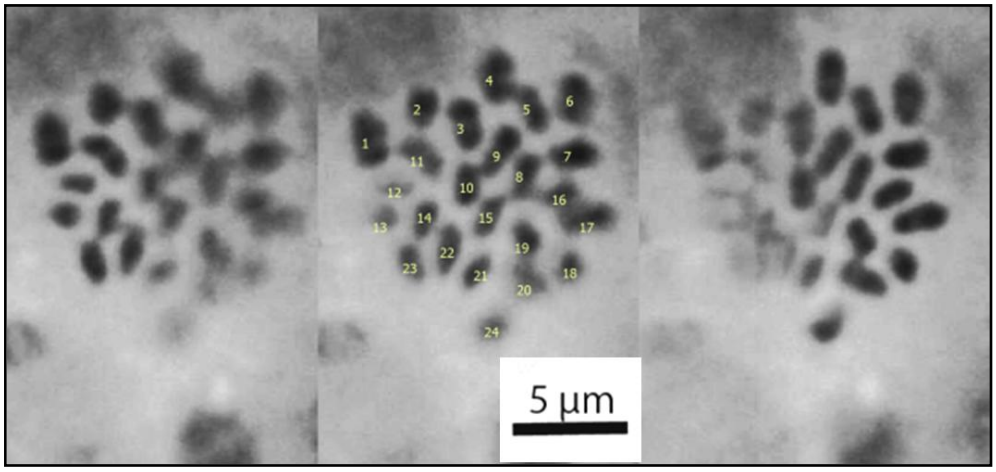


Foto 1: Chromozómy *Hemiorchis burmanica* E19991652 (2n = 24).

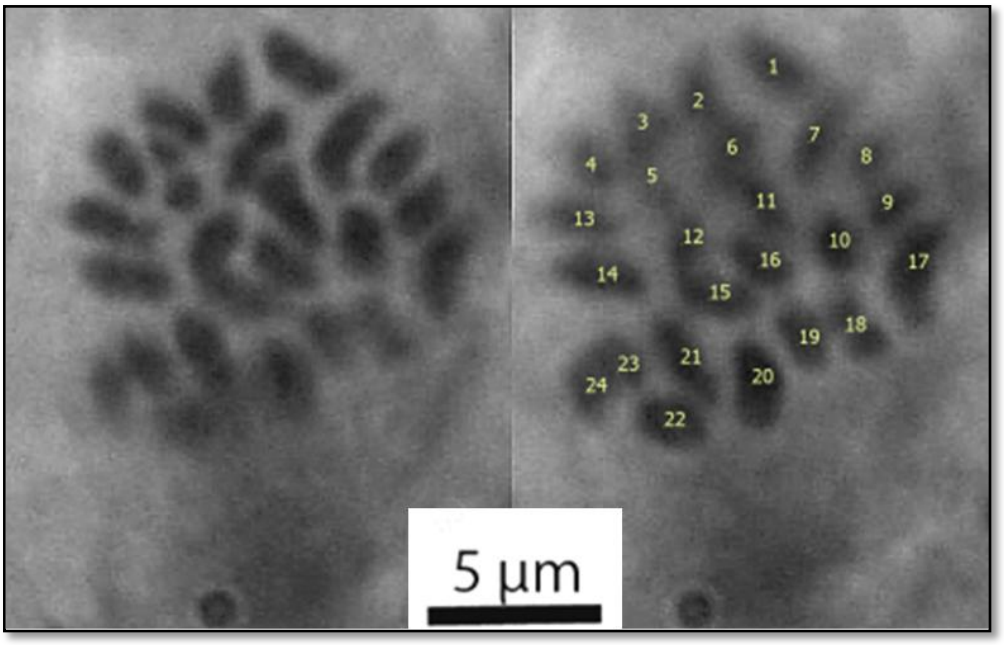


Foto 2: Chromozómy *Globba sp.* E19991625 (2n = 24).

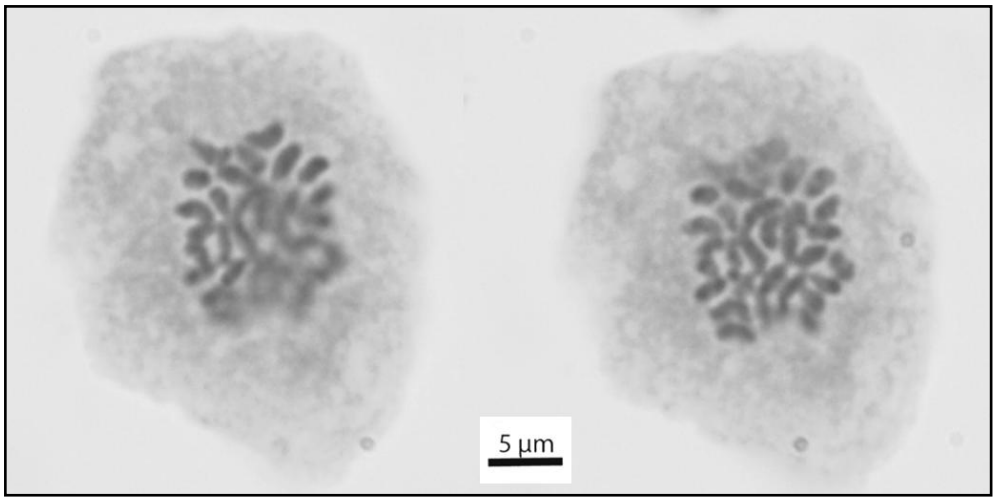


Foto 3: Chromozómy *Globba atrosanguinea* E19820784 (2n = 32).

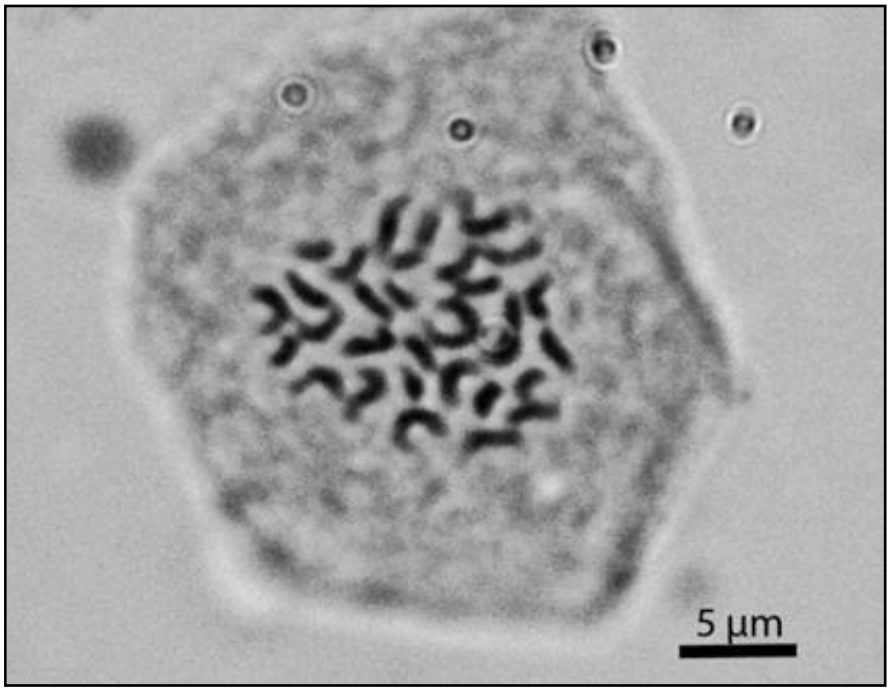


Foto 4: Chromozómy *Globba winitii* E19594068 (2n = 32).

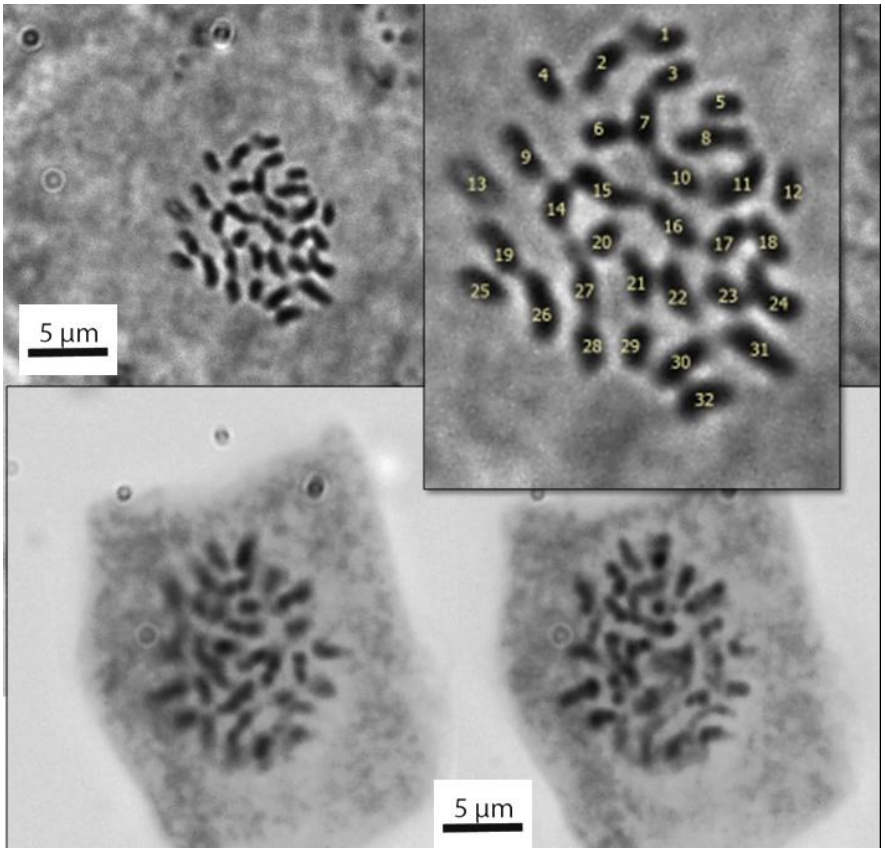


Foto 5: Nahoře chromozómy *Globba purpurascens* T-11-64 (2n = 32)*;* Dole chromozómy *G. sp. novum* E20081114 (2n = 32).

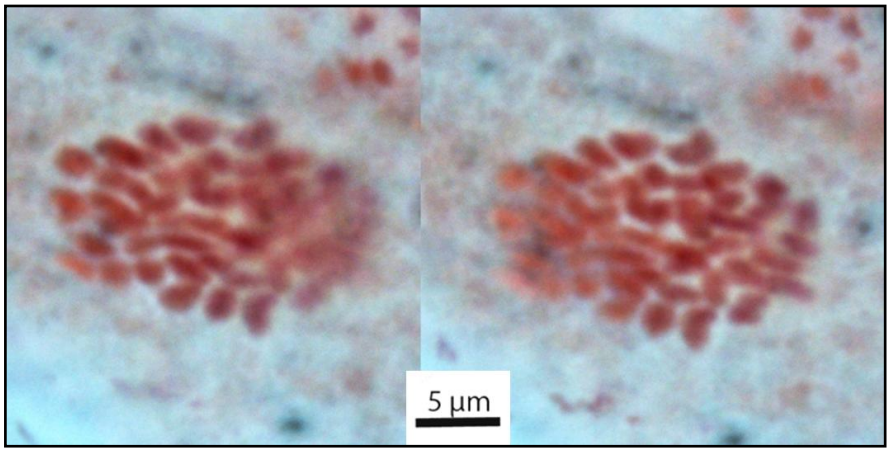


Foto 6: Chromozómy *Globba propinqua* 19841252 (2n = 48).