

Byl hořec panonský (*Gentiana pannonica*) v Krkonoších opravdu vysazen?

Was Hungarian Gentian (*Gentiana pannonica*) really introduced in the Giant Mts?

ESTER ĚKRTOVÁ

Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, CZ,
ester.hofhanzlova@centrum.cz

Abstrakt Dvě krkonošské populace hořce panonského byly součástí molekulárních analýz (AFLP, cpDNA), které se zabývaly studiem genetické struktury 20 populací ve třech různých oblastech výskytu. Kromě Krkonoš (status druhu je zde nejasný) pocházelo 11 populací z centra areálu druhu ve východních Alpách a 7 populací bylo ze Šumavy jako severního okraje předpokládaného původního areálu druhu. V případě analýz chloroplastové DNA (cpDNA) nebyla odhalena variabilita mezi testovanými populacemi. Překvapivý výsledek přinesla analýza AFLP. I přes celkově nízkou variabilitu mezi testovanými jedinci (10,3 % variability vázáno na meziregionální úroveň) tvořila převážná část krkonošských rostlin samostatnou, geneticky odlišnou skupinu. Ve všech třech zkoumaných regionech bylo maximum genetické variability soustředěno na vnitropopulační úrovni. Signifikantně vyšší hodnoty genetické variability vykazovaly populace z Alp. Genetická variabilita šumavských a krkonošských populací byla srovnatelná. Hodnota DW indexu (měřítko reliktnosti populací) byla srovnatelná ve všech regionech. Na základě získaných výsledků nelze vyloučit, že se hořec panonský v otevřené krajině konce pleistocénu vyskytoval od Alp až po Krkonoše a ustoupil až vlivem klimatických a vegetačních změn do současných horských refugií. Výsledky nepotvrzují introdukci druhu v Krkonoších, ale zároveň nemohou původnost druhu přímo dokázat. Proto se diskuze zabývá analýzou argumentů pro i proti původnosti druhu na základě současných poznatků o biologii druhu.

Klíčová slova: genetická diverzita, původnost druhu, AFLP

Abstract Two populations of *Gentiana pannonica* with unclear status from the Giant Mts (Krkonoše in Czech / Karkonosze in Polish) were included to molecular analyses of population structure together with 11 populations from the Eastern Alps (distribution centre of the species) and 7 populations from the Bohemian Forest (northern margin of distribution range). No plastid DNA polymorphisms were found. The AFLP data revealed grouping of populations at the regional level. The majority of samples from the Giant Mts were grouped together being separated from the other samples from the Alps and the Bohemian Forest. However, differentiation at the regional level was low (10.3 %). The pattern at the inter and intrapopulational levels was similar in all three analyzed regions (within-population variation was high). Genetic variation was higher for the alpine populations than for the Bohemian Forest populations, but variation of the population from the Giant Mts was comparable to the native regions. The results indicate the possibility of a large distribution of *G. pannonica* in the unglaciated areas of Central Europe (from the Alps to the Giant Mts), irrespective of altitude, during the late Pleistocene and early Holocene. Our results do not confirm that *G. pannonica* was introduced in the Giant Mts. On the other hand, we have no clear evidence for the native status of the species. Therefore, we discuss the arguments for and against species status in terms of biological traits and other information about *G. pannonica*.

Keywords: genetic diversity, native origin, AFLP

Úvod

Spory o původnosti výskytu druhů na exklávních lokalitách bývají častým předmětem diskuzí v odborných

botanických kruzích i mezi místními floristy. Pokud neexistují nezvratné důkazy o umělé introdukci (osobní svědectví, písemné záznamy, nepochybná vazba na stavení apod.), je jednoznačně prokázání

alochtonního původu často velmi obtížné. Platí to zejména o druzích, které byly historicky člověkem vědomě využívány pro své léčivé, užitkové či okrasné vlastnosti (KOPECKÝ 1973) a jejichž výskyty byly zjištěny až v relativně nedávné době. V současnosti se díky běžné dostupnosti řady typů molekulárních analýz otvírají nové možnosti, které mohou vnést světlo do dosud nejasných případů izolovaného výskytu druhů, o jejichž původnosti se vedou dlouholeté spory (KUCERA et al. 2013).

Typickým případem takového druhu je hořec panonský (*Gentiana pannonica*). Jedná se o floristický prvek východních Alp, který se ojediněle vyskytuje i v jižních (Itálie) a centrálních (Švýcarsko) Alpách. Mimo Alpy zasahuje na Šumavu, která je tradičně považována za severní hranici rozšíření druhu (PROCHÁZKA 1961, HEGI 1975). U lokalit v Sudetech (Krkonose a Jeseníky) převládá názor, že se jedná o výskyty nepůvodní, protože k nálezu druhu zde došlo až krátce po druhé světové válce. Vzhledem k nápadnosti této rostliny bylo jeho přehlížení v tak intenzivně botanicky prozkoumaných územích považováno za prakticky nemožné (KLÁŠTERSKÝ 1961, PROCHÁZKA 1961). Ovšem zejména v případě Krkonos existovaly i hlasy, které jeho původnost nevyklučovaly (ŠOUREK 1963, JENIK 1979). Tento druh se tam vyskytuje na stanovištích ekologicky velmi podobných autochtonnímu výskytu v Alpách, navíc na lokalitách vzdálených od aktuální i historické zástavby. Existují dokonce i písemné údaje o výskytu hořců v Krkonosích z konce 18. století (MATTUSCHKA 1776, KROCKER 1787), tradičně ovšem považované za nepřilíš spolehlivé.

V rámci téměř desetileté populačně ekologické a molekulární studie hořce panonského na Šumavě a v Alpách byly do analyzovaného souboru dat zařazeny i vzorky z krkonošských populací. Cílem studia bylo odpovědět pomocí moderních molekulárních a populačně-ekologických metod na následující otázky: (1) Odpovídá genetická diferenciacie populací jejich geografickému rozšíření? (2) Je struktura vnitropopulační genetické variability závislá na velikosti populace, historii a charakteru stanoviště zkoumaných populací? (3) Jak se liší genetická struktura populací z autochtonních oblastí výskytu (Šumava, východní Alpy) a populací z Krkonoš, kde předpokládáme nepůvodní výskyt?

Výsledky studie jsou shrnuty v mojí dizertační práci (EKRTOVÁ 2012) a byly publikovány v mezinárodních

periodicích (EKRTOVÁ et al. 2012, EKRTOVÁ & KOŠNAR 2012). V tomto příspěvku představuji výsledky pro českého čtenáře formou stručného shrnutí výše uvedených článků. Jádrem příspěvku tvoří diskuse zaměřená na výskyt druhu v Krkonosích. Problematika výskytu v Jeseníkách není diskutována, protože populace z tohoto území nebyly bohužel do studie zahrnuty a nemám k dispozici žádná konkrétní data z molekulárních analýz. Hlavním důvodem byl původní předpoklad, že vzhledem k nepůvodnosti druhu v Sudetech nelze předpokládat zajímavé výsledky v tomto regionu. Rovněž s ohledem na finanční náročnost molekulárních analýz je zahrnutí jednoho pohoří pro srovnání s původními populacemi dostatečné.

Materiál a metodika

Studovaný druh

Hořec panonský je vytrvalá mohutná rostlina, která je značně dlouhověká a silně klonální. Druh se vegetativně šíří tlustými oddenky, pomocí kterých vytváří často rozsáhlé pokykormony (Obr. 1). Úlomky oddenků může kolonizovat nová stanoviště níže po svazích karových stěn nebo podél potoků, kde roste. Kvete ve vrcholném létě, z listové růžice vyrůstá většinou



Obr. 1. Populace hořce panonského na úbočí Studniční hory.
Fig. 1. *Gentiana pannonica* on the slope of the Studniční hora Mt.

Tabu. 1. Charakteristika 20 analyzovaných populací hořce panonského: velikost populace – udává odhad počtu trsů a polykormonálních skupin, počet analyzovaných rostlin (N), respektive počet úspěšné analyzovaných vzorků použitelných pro statistické zpracování dat (a), typ stanoviště, genetická diverzita (D), hodnota DW indexu.

Tab. 1. Characteristics of 20 studied populations of *Gentiana pannonica*: population size – represents approximate number of leaf rosettes and polycormons, number of analysed plants (N) respektive numbers of samples used for statistical analyses (a), type of habitat, mean genetic diversity (D), and frequency-down-weighted marker values (DW) of 20 populations of *Gentiana pannonica*.

Lokalita / Location	Kód / Code	Velikost populace / Population size	N(a)	Stanoviště / Habitat	D	DW
Plešné jezero	PJ	~ 100	16 (16)	primary	0,132	24,96
Černé jezero	CJ	~ 100	16 (14)	primary	0,095	18,19
Modravský potok	MP	~ 60	16 (14)	primary	0,134	21,40
Luzenské údolí	LU	~ 100	16 (12)	secondary	0,145	17,89
Rokytká	R	~ 50	16 (14)	secondary	0,131	19,39
Slunečná	S	>500	16 (14)	secondary	0,099	19,28
Horská Kvilda	HK	>500	16 (14)	secondary	0,118	19,70
Globucken See	RT	>400	16 (13)	primary	0,182	19,63
Alois Günther Haus	A	~ 60	16 (14)	primary	0,120	20,21
Pfaffensattel	PF	~ 40	16 (10)	secondary	0,207	16,89
Schneeberg (1)	Sch1	~ 50	16 (11)	primary	0,148	15,11
Schneeberg (2)	Sch2	>400	16 (14)	primary	0,189	23,57
Schneeberg (3)	Sch3	~ 100	16 (15)	primary	0,139	25,29
Raxalpe	RA	~ 100	16 (12)	primary	0,159	18,48
Heßhütte (1)	HH1	>400	16 (13)	primary	0,180	21,48
Heßhütte (2)	HH2	~ 200	16 (14)	primary	0,141	20,11
Priel-Schutzhaus (1)	PS1	~ 50	15 (10)	primary	0,184	14,82
Priel-Schutzhaus (2)	PS2	~ 15	13 (11)	primary	0,201	18,78
Studniční hora	KR1	~ 20	15 (13)	primary	0,116	24,20
Modrý důl	KR2	~ 100	13 (10)	primary	0,153	17,50

několik lodyh s jedním až čtyřmi shluky květů (KIRSCHNER & KIRSCHNEROVÁ 2000). Frekvence kvetení vykazuje značné sezónní výkyvy. Jedná se o typický cizosprašný druh opylovaný hmyzem, samosprašné ve d významně snížené produkci semen. Generativně se druh rozmnožuje křídlatými semeny, kterých jedna kvetoucí rostlina vyprodukuje až několik tisíc, ale jejich klíčivost se pohybuje okolo 30 % (HOFHANZLOVÁ & KRENOVÁ 2007). Úspěšné vyklíčení a růst mladých semenáčků je záležitost značně komplikovaná a v reálných podmínkách nepřilíší úspěšná. Zásadní se zdá být přítomnost otevřených plošek ve vegetaci s nízkou konkurencí jiných druhů a zároveň musí být stanoviště dostatečně zásobené vodou (semenáčky jsou extrémně citlivé k letnímu přísušku), ale nesmí to být místa trvale zvodnělá (EKRTOVÁ & KOŠNAR 2012). Přesné informace o délce generační doby v přírodních podmínkách nejsou známé, ale na základě pěstování v kultuře předpokládáme, že se pohybuje mezi 10–20 lety (ŠOUREK 1963).

Sběr vzorků

Analyzováno bylo 20 populací ze tří rozdílných regionů (11 – z východních Alp, 2 – z Krkonoš, 7 – z Šumavy; viz Tab. 1, podrobná lokalizace je uvedena v publikované studii EKRTOVÉ et al. [2012]). V případě východních Alp se jednalo o populace rostoucí na primárních stanovištích v subalpínském a alpínském stupni, pouze jediná populace se nacházela na světlině pod horní hranicí lesa (PF). Také v případě Krkonoš se jednalo o populace rostoucí v subalpínském pásmu. Na Šumavě byly studovány jednak populace z fragmentů primárního bezleší jezerních karů a okrajů toků (PJ, CJ, MP) a také populace vázané na sekundární horské louky (R, S, HK, LU) (Tab. 1). Sbírány byly listy ze 13–16 listových růžic navzájem prostorově oddělených a vzdálených 5–10 m. Materiál byl vysušen v silikagelu a skladován při -20 °C.

Molekulární analýzy

Ke zjištění genetických charakteristik populací byly použity dvě metody. Celkový soubor 258 jedinců

z 20 populací byl analyzován pomocí metody AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Jedná se o metodu využívající dominantní DNA markery, která umožňuje analyzovat genetickou diverzitu napříč celým genomem. Používá se u druhů, kde chybí hlubší informace o sekvencích studovaného organismu (Vos et al. 1995, FÉR 2011).

V druhém kroku bylo vybráno sedm jedinců z geograficky navzájem nejvzdálenějších populací. U těchto rostlin bylo sekvenováno 9 nekódujících úseků chloroplastové DNA ke zjištění haplotypové variability (KRAK 2011) mezi geograficky vzdálenými populacemi. Chloroplastový haplotyp lze vysvětlit jako část cpDNA s jedinečnou kombinací znaků, která se u většiny vyšších rostlin dědí po mateřské linii a nedochází u ní k rekombinaci.

Podrobný popis izolace DNA a metodiky molekulárních analýz je uveden v publikované studii EKRTOVÉ et al. (2012).

Statistické analýzy

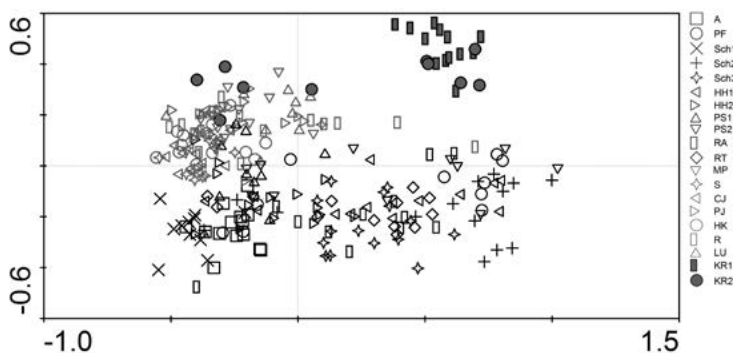
Primárním výsledkem analýzy AFLP je binární matice (matice nul a jedniček) vyjadřující přítomnost nebo nepřítomnost jednotlivých náhodně amplifikovaných fragmentů celkové DNA o velikosti 70 až 500 bází v každém studovaném jedinci. Na základě této matice byla genetická podobnost mezi jedinci hodnocena

analýzou hlavních koordinát (PCoA) v programech PrCoord 1.0 a Canoco for Windows 4.5 (TER BRAAK & ŠMILAUER 2002). Podíl genetické variability na mezi- a vnitropopulační úrovni byl zjištěn analýzou molekulární variance (AMOVA; EXCOFFIER et al. 1992) v programu Arlequin v3.11 (EXCOFFIER et al. 2006). Dále byla pro každou populaci stanovena hodnota vnitropopulační genetické diverzity a DW index (vyjadřuje zastoupení vzácných fragmentů v populaci; program AFLPdat; EHRICH 2006). Rozdíly dosažených hodnot vnitropopulační genetické diverzity a DW indexu byly statisticky testovány mezi třemi geograficky definovanými regiony (ANOVA; Statistica for Windows 6.0; STATSOFT 2001). Podrobný popis postupu analýzy dat je uveden v práci EKRTOVÉ et al. (2012).

Výsledky

AFLP

Při analýze 258 jedinců byl získán vysoký počet hodnotitelných fragmentů (367), z nichž většina byla polymorfní (83 %). V celém souboru dat nebyly nalezeny žádné identické genotypy (klony) a ani žádné regionálně specifické fragmenty, které by byly přítomny



Obr. 2. Ordinační diagram analýzy hlavních koordinát (PCoA). Jedná se o statistickou metodu, která umožňuje zobrazit 258 jedinců hořce panonského z 20 populací na základě jejich vzájemné genetické podobnosti získané pomocí molekulární analýzy AFLP. První (vodorovná) a druhá (svislá) osa vysvětlují 21,5 % z celkové variability dat. Prázdné černé symboly patří jedincům z alpských populací, prázdné šedé symboly náležejí jedincům ze Šumavy a plně tmavě šedé symboly jsou přiřazeny vzorkům z Krkonoš.

Fig. 2. Principal coordinates analysis (PCoA) plot based on Jaccard distances calculated on amplified fragment length polymorphism (AFLP) data for *Gentiana pannonica*. Ordination of 258 samples from all 20 populations; the first and second coordinates described 21.5 % of the total variation. Empty black symbols indicate samples from the Alps, empty grey symbols samples from the Bohemian Forest, and filled dark-grey symbols samples from the Giant Mts.

Tab. 2. Výsledky analýzy molekulární variance (AMOVA) 20 populací hořce panonského z Alp, Šumavy a Krkonoš. Analýza byla provedena na základě datového souboru 367 AFLP fragmentů získaných analýzou 258 jedinců. Byla provedena celková analýza, která ukazuje distribuci variability na meziregionální, mezipopulační a vnitropopulační úrovni v celém datovém souboru. Tři dílčí analýzy vyjadřují distribuci mezi- a vnitropopulační variability v každém konkrétním testovaném regionu. Vysvětlivky: počet stupňů volnosti (df), hodnota testovacího kritéria (F_{ST}), dosažená hladina významnosti (P; signifikantně významné hodnoty označeny tučně).

Tab. 2. Analyses of molecular variance (AMOVA) of 20 populations of *Gentiana pannonica* in the Alps, the Bohemian Forest, and the Giant Mts. Explanations: the analysis was based on 367 AFLP bands of 258 *G. pannonica* individuals. Degrees of freedom (df), value of test criteria (F_{ST}), P-values (P; significant values marked in bold).

Úroveň variability / Level of variation	df	Suma čtverců / Sum of squares	Komponenta variance / Variance component	% z celkové variability / % of total variation	F_{ST}	P
Všechny vzorky / All samples						
Mezi regiony / Among regions	2	714,41	3,65	10,3		<0,001
Mezi populacemi v regionu / Among populations within region	17	1566,16	5,60	14,2	0,245	<0,001
Uvnitř populací / Within populations	238	6378,09	26,80	75,5		
Šumava / The Bohemian Forest						
Mezi populacemi v regionu / Among populations within region	6	512,19	4,51	16,8	0,168	<0,001
Uvnitř populací / Within populations	91	2032,97	22,34	83,2		
Alpy / The Alps						
Mezi populacemi v regionu / Among populations within region	10	983,31	5,46	15,2	0,152	<0,001
Uvnitř populací / Within populations	126	3836,47	30,45	84,8		
Krkonoše / The Giant Mts						
Mezi populacemi v regionu / Among populations within region	1	70,66	4,11	14,5	0,145	<0,001
Uvnitř populací / Within populations	21	508,65	24,22	85,5		

pouze u jedinců pocházejících z jednoho z testovaných regionů.

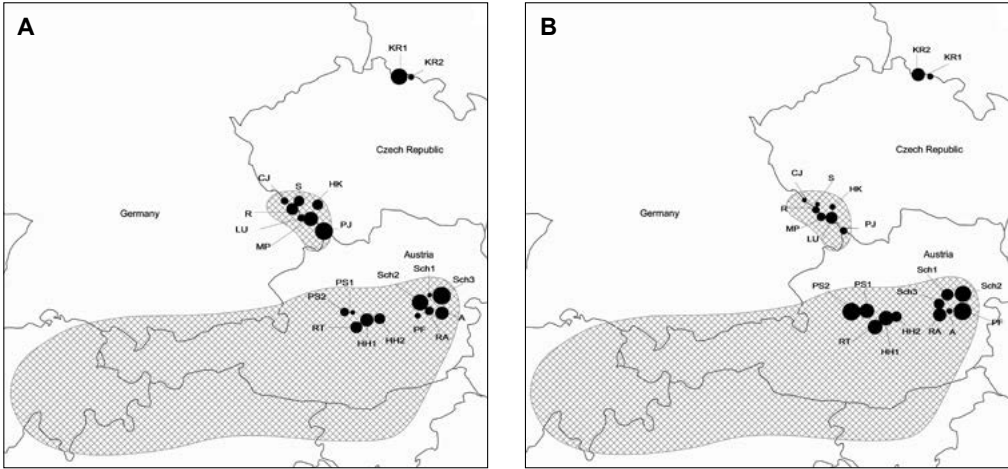
Z analýzy hlavních koordinát (PCoA) je patrné, že genetické vzdálenosti mezi analyzovanými jedinci nejsou příliš velké. Přesto se poněkud zřetelněji oddělila naprostá většina krkonošských rostlin od vzorků z Alp a Šumavy, které jsou částečně také navzájem odděleny podél druhé osy ordinačního diagramu (Obr. 2).

Analýza molekulární variance ukázala vysoký podíl vnitropopulační variability na celkové variabilitě získaných fragmentů (75,5 %). Podíl meziregionální (10,3 %) a mezipopulační variability (14,2 %) byl nesrovnatelně nižší. Podobná struktura vnitro

a mezipopulační variability se ukázala také v případě dílčích analýz provedených odděleně pro každý testovaný region (viz Tab. 2).

Hodnoty vnitropopulační diverzity populací jsou mezi jednotlivými testovanými regiony rozdílné ($F_{df(treatment-2, error-17)} = 7,52$; $P = 0,0046$). Jednoznačně vyšší vnitropopulační diverzitu vykazují alpské populace (Tab. 1, Obr. 3). Ovšem krkonošské populace mají vnitropopulační genetickou diverzitu srovnatelnou s populacemi v obou regionech původního výskytu ($P > 0,8124$; $0,2207$).

Překvapivě se ukázalo, že také v zastoupení vzácných fragmentů v populacích (DW index) jsou všechny tři regiony srovnatelné ($F_{df(treatment-2, error-17)} = 0,14$;



Obr. 3A–B. Hodnota DW indexu (měřítko reliktnosti populací) u jednotlivých analyzovaných populací hořce panonského (A). Velikost černého kruhu ukazuje na podíl zastoupení vzácných fragmentů v populaci, generalizovaný celkový areál druhu je vyznačen v mapě šedou šrafází (dle PROCHÁZKY 1961). Hodnota genetiké diverzity (Nei) v analyzovaných populacích – ukazuje genetikou rozdílnost jednotlivých jedinců v konkrétní populaci (B). Velikost kruhu je úměrná zjištěné hodnotě genetiké diverzity (podrobněji viz Tab. 1).

Fig. 3A–B. Frequency down-weighted fragment values per population (DW) used for estimation of the proportion of rare AFLP fragments within populations of *Gentiana pannonica* (A). The number of rare fragments per population is indicated by circle size (values are listed in Table 1). Generalized distribution of *G. pannonica* (according to PROCHÁZKA 1961) shaded. Level of within-population variation expressed as Nei's gene diversity (B).

$P=0,8744$). V každém z analyzovaných regionů byla zastoupena populace (PJ, KR1, Sch3) s vyšší hodnotou DW indexu a jednalo se o populace na podobném, výrazně reliktním typu stanoviště (Tab. 1, Obr. 3).

Sekvenční analýza haplotypů cpDNA

Při analýze jedinců ze sedmi vybraných navzájem genetiky i geograficky nejvzdálenějších populací nebyla nalezena žádná haplotypová variabilita. Na celém území, které bylo do souboru analyzovaných dat zahrnuto, se zřejmě se značnou pravděpodobností vyskytuje jediný chloroplastový haplotyp.

Diskuze

Přestože genetiká diverzita v analyzovaném souboru dat nebyla vysoká, analýza AFLP přinesla překvapivý výsledek. Míra genetiké podobnosti jedinců reflektovala jejich původ ze tří analyzovaných regionů. K částečnému překryvu dochází jak mezi alpskými a šumavskými populacemi, tak mezi vzorky

ze Šumavy a Krkonoš, což však odpovídá geografické poloze zkoumaných pohoří. Hodnota vnitro a mezipopulační variability je srovnatelná mezi těmito třemi regiony. Také zastoupení vzácných fragmentů, které je považováno za měřítko reliktnosti populací (SCHÖN-SWETTER & TRIBSCH 2005) nabývá podobných hodnot v Alpách, na Šumavě i v Krkonoších. Pokud získané výsledky zasadíme do obecně používaného interpretačního schématu genetiké variability, nelze vyloučit, že i výskyt v Krkonoších je pozůstatkem původně souvislého areálu druhu sahajícího od Alp až do Krkonoš. Vzhledem k ekologickým nárokům druhu a současné představě o charakteru pozdně glaciální a ranně holocénní krajiny (CHYTRÝ et al. 2007, CHYTRÝ et al. 2008, KUNES et al. 2008, PELÁNKOVÁ et al. 2008) lze předpokládat, že druh měl v prostoru mezi Alpami a sudetskými pohořími dostatek vhodných stanovišť. Ustoupil až vlivem oteplení a rozšířením lesní vegetace. Nízkou genetikou diferenciací mezi jednotlivými populacemi a regiony lze vysvětlit příliš krátkou dobou na výraznější mezipopulační a meziregionální diferenciaci v genomu. Je všeobecně známo, že míra diferenciací úzce souvisí s biologickými vlastnostmi

a životní strategií druhů. Pro dlouhověké a silně klonální druhy, jakým je hořec panonský, je nízká míra diferenciací na mezipopulační úrovni typická (GABRIELSEN et al. 1997, SEGARRA-MORAGUES & CATALÁN 2003, MICHL et al. 2010, ŠMÍDOVÁ et al. 2011). Omezenou genetickou diverzitou v oblasti východních Alp, Šumavy a Krkonoš potvrzuje také zjištění jediného haplotypu chloroplastové DNA.

Molekulární data tohoto typu však nemohou původnost druhu v Krkonoších dokázat. Souboru dat bohužel chybí vzorky z dalších exklávních populací z jižních a centrálních Alp. Nelze totiž vyloučit teoretickou možnost, že introdukovány byly rostliny pocházející z italské či švýcarské lokality. Vzhledem ke genetické podobnosti části krkonošských vzorků se šumavskými rostlinami se však tato možnost nezdá příliš logická. Lze však říci, že zjištěná genetická diverzita krkonošských populací nepotvrzuje umělou introdukci v polovině 20. století. Chceme-li zaujmout stanovisko k původnosti či nepůvodnosti druhu v Krkonoších, je potřeba kriticky zhodnotit argumenty pro nepůvodnost z pohledu současných poznatků o biologii druhu.

Introdukce v době protektorátu a možnost přehlédnutí druhu v Krkonoších

V Krkonoších, na plochách subalpinského bezlesí roste hořec panonský vzácně na východním svahu Studniční hory a na několika místech na jižním svahu Modrého dolu pod Modrým sedlem a na západním úbočí Studniční hory.

Stěžejním argumentem pro nepůvodnost druhu byl jeho pozdní nález až v roce 1947, kdy byla nalezena jedna stará kvetoucí rostlina a dvě mladé sterilní v těsné blízkosti kvetoucího trsu (ŠOUREK 1963). Předpokládalo se, že druh byl vysazen nebo vyset mezi lety 1938–1945, kdy byl přístup do hor vzhledem k zabránění Sudet a následující druhé světové válce českým botanikům omezen a botanická aktivita se za války celkově snížila (KLÁSTERSKÝ 1961, PROCHÁZKA 1961). Předpoklad výsevu však není podporován znalostmi o biologii druhu. Hořec panonský roste velice pomalu a kvete obvykle po 10–20 letech od vyklíčení. Rostlina, kterou našel J. Šourek byla určitě starší 10ti let. Výsev v předpokládané době lze tedy vyloučit (ŠOUREK 1963). Výsadba rostliny je teoreticky možná. Ovšem předpoklad výsadby v 1. pol. 20. stol. příliš nepodporují data o vnitropopulační genetické variabilitě krkonoš-

ských populací. Podle současných znalostí se předpokládá, že populace introdukované v nedávné minulosti (navíc velmi pravděpodobně z jediného zdroje) by měly vykazovat sníženou míru vnitropopulační variability ve srovnání s populacemi v původním areálu výskytu (GENTON et al. 2005).

Je nepravděpodobné, že by druh s tak dlouhým životním cyklem a konzervativním genomem mohl za necelých 100 let (max. 4 generace) vygenerovat genetickou variabilitu srovnatelnou s populacemi v Alpách a na Šumavě. Navíc úspěšná generativní reprodukce druhu není běžná, vyžaduje specifické podmínky, semennáčky rostou velice pomalu a dlouhodobě jich přežívá většinou nepatrné množství (EKRTOVÁ & KOŠNAR 2012). Pokud by byl druh vyset nebo vysazen, muselo by k tomu dojít mnohem dříve, než se předpokládalo (KLÁSTERSKÝ 1961, PROCHÁZKA 1961). Teoreticky lze uvažovat, že hořce mohly do Krkonoš doputovat například s tyrolskou kolonizací. Obtížné lze však vysvětlit, proč by byl druh v té době vysazen mimo osídlení.

Touto skutečností argument o nemožnosti přehlédnutí druhu v 19. století a 1. polovině 20. století poněkud ztrácí sílu. Po mnoha letech hledání hořce panonského v Alpách i na Šumavě se také domnívám, že druh není zdaleka tak nápadný, jak je tradičně chápán. Nápadný je pouze v době květu, což je 14 dní v roce. Na srovnatelných stanovištích v Alpách rostliny v některých letech vůbec nekvetou. Sterilní rostliny lze přehlédnout snadno, zejména v případě, že nejsou cíleně vyhledávány. V regionech, kde se vyskytují společně s kýchaví bílou (*Vératrum album*), což je právě příklad Krkonoš, je možno při zběžném pohledu sterilní rostliny hořce s kýchaví snadno zaměnit. Také si je třeba uvědomit, že oblast této části Studniční hory a Modrého sedla je po botanické stránce monotónní a nezajímavá. Není divu, že se na ni nikdo ze starých botaniků detailně nezaměřoval (podobně to platí také u mechorostů; J. Kučera, ústní sdělení).

Posledním faktorem, který mohl mít na přehlížení druhu před rokem 1947 vliv, je pastva. Podle současných zkušeností ze Šumavy hovězí dobytek hořce selektivně spásá a druh se stává na pastvinách prakticky „neviditelný“ (EKRTOVÁ & KOŠNAR 2012). Například na Šumavě došlo po poklesu intenzity pastvy vlivem odsunu německého obyvatelstva k výraznému nárůstu početnosti (resp. „zviditelnění“) jeho populací (PROCHÁZKA 1961, PROCHÁZKA & ŠTECH 2002). Podobně mohly být ovlivněny i zbytky krkonošské

populace zejména v případě lokality nad Modrým dolem, kde se určitě tradičně páslo.

Přiznání k výsadbě

V osmdesátých letech minulého století se zdálo, že je problém původnosti hořce panonského v Krkonoších vyřešen. V sídle České botanické společnosti v Praze se přihlásil muž, který tvrdil, že hořec na Studniční hoře vysadil. Ovšem znal pouze lokalitu nalezenou J. Šourkem v r. 1947. O dalších místech výskytu, která našli nezávisle J. Štursa a J. Vaněk na západním úbočí Studniční hory a nad Modrým dolem, nevěděli. Tato skutečnost uvrhla už v době přiznání na jeho věrohodnost značný stín (DVOŘÁK 1997).

Neznalost lokalit nalezených na počátku 70. let však není v otázce věrohodnosti přiznání zásadní. Je totiž teoreticky možné, že výskyty nalezené pány Štursou a Vaňkem vznikly přirozeným šířením semen z lokality nalezené v r. 1947, přestože pravděpodobnost šíření semen proti převládajícímu větrnému proudění a „proti svahu“ a jejich následného úspěšného uchycení je velice malá. Genetickou odlišnost některých analyzovaných jedinců z populace v Modrém dole – teoretický argument pro jejich umělou introdukci – lze vysvětlit tím, že jsou příbuzní s jedinci, kteří nebyli zahrnuti v analyzovaném souboru dat z východního úbočí Studniční hory. Možnost přirozeného vzniku populace v oblasti Modrého dolu je ovšem rozhodně méně pravděpodobná, než skutečnost, že druh zde byl před r. 1970 přehlížen.

Možnost výsadby ve 30. nebo 40. letech 20. století ovšem jednoznačně nepodporují data o vnitropopulační struktuře krkonošských populací, jak bylo zmíněno v předchozím bloku. Člověk, který se k výsadbě přiznal, ji nemohl vysadit dříve, jelikož by se přiznání v 80. letech 20. století jednoduše nemohl dožít.

Dále by pro posouzení věrohodnosti přiznání byla zásadní informace, kolik rostlin, jak a kdy měl dotyčný vysadit. Tuto informaci zřejmě bohužel nikdo neznamenal a je možné, že už v době přiznání nesla nějaké nesrovnalosti, a proto bylo přiznání považováno za podezřelé. ŠOUREK (1963) uvádí zásadní informaci, že v r. 1960 byly nalezeny další čtyři mohutné kvetoucí rostliny na různých místech mezi klečí ca 200 a 300 m vzdálené od jím původně nalezené rostliny. Pokud se jednalo o rostliny srovnatelné svým vzrůstem s původním nalezeným trsem, musely tam být již v době prvního nálezu v. 1947 a byly přehlédnuty.

Vzhledem k dlouhé generační době a velice pomalému růstu polykormonů je vyloučeno, že se jednalo o rostliny vzniklé vysemeněním nebo vyrostlé z fragmentů oddenků původně nalezené rostliny. Z toho vyplývá, že pokud by byly známy podrobnosti o jeho údajné výsadbě, byla by věrohodnost přiznání vyřešena.

V této souvislosti je velice zajímavé poznamenat, že J. Šourek se po nálezu druhu v r. 1947 také domníval, že se jedná o výsadbu či výsev (ŠOUREK 1948). Ovšem poté co vyrýpnutou rostlinu v kultuře pěstoval, zkoušel ji vysévat a shromažďoval další informace o druhu, začal vážně připouštět i možnost její původnosti (ŠOUREK 1963).

Šíření druhu v posledních 20 letech

Při shromažďování argumentů pro a proti původnosti hořce panonského v Krkonoších jsem se setkala s názorem: „Druh se v posledních 20 letech výrazně šíří, tím ukazuje na typický průběh vývoje introdukované populace, kdy po fázi naturalizace nastupuje fáze expanzivního šíření.“

Ovšem vegetativní i generativní rozmnožování druhu je značně zdoluhavá záležitost. Klonální rozrůstání polykormonů se v měřítku 2–5 let mění naprosto minimálně (Ekrťová, osobní pozorování; Křenová nepublikovaná data). Generativní reprodukce je vzácná a vyžaduje specifické podmínky. Semenáčky rostou velice pomalu a přežívají jich malé množství (EKRTOVÁ & KOŠNAR 2012). Zvětšení početnosti populací lze vysvětlit také velmi prostě tím, že se jedná o reakci na změnu podmínek v subalpínské zóně po r. 1945, kdy se dramaticky změnilo hospodářské využívání krkonošských hřebenů. Změna byla, jak se zdá, pro tento druh velmi příznivá. Dle současných pozorování druh při spásání většinou nevykvétá, často jsou veškeré nadzemní části zcela spaseny. Klíčení velmi dobře probíhá na narušovaných místech, ovšem semenáčky jsou naopak na narušení citlivé (EKRTOVÁ & KOŠNAR 2012; Ekrťová, osobní pozorování). Trvá velice dlouho, než rostliny vykvetou; zaznamenány bývají přitom obvykle až kvetoucí jedinci. Z toho plyne, že druh zaznamenáme zpravidla až mnoho let poté, co vyklíčil. Navíc je velice důležité si uvědomit, že druh nikdo už desítky let neeliminuje vyrýpáváním za účelem sběru oddenků. Výše uvedené důvody mohou vést k pocitu, že se druh najednou od určité doby začal šířit, ale ve skutečnosti se možná jedná o postupný proces od poloviny 20. stol., který souvisí s prostou změnou

využívání hor, která zrovna tomuto druhu na hřebenech Sudet vyhovuje. Samozřejmě, že nelze vyloučit i pozitivní efekt některých abiotických změn (eutrofizace, acidifikace), ale o vlivu těchto faktorů na populace hořce nic konkrétního nevíme.

Historické údaje o výskytu hořce panonského v Krkonoších

Na celé záležitosti je nejvíce zarážející skutečnost, jak se dosud přistupovalo k historickým údajům o výskytu druhu v Krkonoších. ŠOUREK (1963) poměrně podrobně zpracoval historické údaje o hořci panonském v Krkonoších. Z nich vyplývá, že první zprávy o krkonošských hořcích přináší MATTUSCHKA (1776), konkrétně uvádí hořec žlutý (*Gentiana lutea*) a hořec tečkovaný (*Gentiana punctata*). Poté KRÖCKER (1787) nově uvádí hořec nachový (*Gentiana purpurea*; druh velmi podobný hořci panonskému, v historické literatuře je druh pod tímto jménem uváděn). Jelikož se jedná o zejména ve sterilním stavu podobné druhy, nelze vyloučit, že údaje nejsou zcela mylné a nějaké hořce v Krkonoších historicky vzácně rostly. ŠOUREK (1963) vysvětluje jejich ústup vyrýpáváním pro lékařnické účely. Zachován zůstal jen nepatrný zbytek populace, který unikl pozornosti. Je podivné, že v novější botanické literatuře (JENÍK 1979, PROCHÁZKA 1999, KIRSCHNER & KIRSCHNEROVÁ 2000, KUBÁT et al. 2002) byl převzat názor, že druh je v Krkonoších nepůvodní, bez komentáře k existenci těchto údajů, aniž by je někdo jasně rozporoval. Argument, že všechny údaje starší r. 1800 jsou pochybné, není dostatečný.

Závěr

Připustíme-li existenci původního areálu sahajícího od Alp až do Krkonoš, který je znám i u jiných druhů (např. rozrazilu chudobkovitého [*Veronica bellidoides*]), je současná i historická vzácnost druhu v Krkonoších vysvětlitelná. Všeobecně platné pravidlo říká, že druh na okraji svého areálu se často vyskytuje vzácně a jeho populace nejsou početné. Existuje tedy i vyšší pravděpodobnost, že populace mohou zaniknout z vnějších (vyrýpávání oddenků) či vnitřních stochastických příčin (FALK & HOLSINGER 1991, BEGON et al. 1997).

Na základě výše uvedených skutečností nelze původnost druhu v Krkonoších jednoznačně potvrdit. Ovšem dle současných znalostí a rozboru problematiky podporuje původnost druhu většina argumentů. Navíc genetickou odlišnost krkonošských rostlin ukázaly už pilotní molekulární analýzy publikované před více než deseti lety (ČURN et al. 2001). Bohužel kvůli omezenému datovému souboru a způsobu zpracování z nich nebylo možno vytvořit jasné závěry.

Tuto diskuzi lze tedy uzavřít tvrzením, že disjunktní výskyt a prostý argument o nemožnosti přehlédnutí druhu nejsou dostatečnými důvody pro označení druhu za nepůvodní. Zvláště v současnosti, kdy máme rozsáhlé možnosti zkoumání molekulárně genetických a ekologických vlastností populací konkrétních druhů.

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem spolupracovníkům, kteří se na projektu podíleli. M. Štechovi za cenné rady a pomoc v průběhu celé práce a kritické připomínky k textu tohoto manuskriptu. L. Ekrtovi a J. Zahradníkové patří dík za pomoc při sběru vzorků v terénu. T. Férovi děkuji na poskytnutí zázemí pro provedení molekulárních analýz v DNA laboratoři Katedry botaniky PřF UK a pomoc při vyhodnocení získaných dat. V. Kučabové a E. Duškové děkuji za pomoc a rady při provedení analýz AFLP, M. Herbustové a J. Košnarovi za provedení analýz cpDNA. J. Greimlerovi děkuji za tipy na lokality druhu v Alpách, A. Čejkové za pomoc s grafickou úpravou obrázků. Projekt byl podpořen z následujících grantových zdrojů: 32/2007/P-PřF, MSM6007665801, MSM0021620828.

Summary

Introduction The status of *Gentiana pannonica* on disjunct localities has been discussed at the scientific and regional floristic levels, especially in regards to medicinal or ornamental species. The molecular analysis of population structure may be helpful in resolving the questions about species status. *G. pannonica* is a typical east-alpine element. Outside of the Alps, it occurs in the Bohemian Forest and in the Sudetes (The Giant Mts and Jeseníky Mts). In the Sudetes,

is traditionally considered to be non-indigenous. However, the species status is unclear, especially in the Giant Mts. This study attempted to answer the following questions: (1) Is genetic variation and differentiation related to the geographical distribution of populations? (2) Is the pattern of intrapopulation diversity correlated with habitat type and history? (3) Are there differences in genetic structure between native populations and the presumably introduced populations in the Giant Mts?

Material & Methods Twenty populations of *G. pannonica* were sampled in three regions (11 in the Eastern Alps, 7 in the Bohemian Forest, 2 in the Giant Mts). The leaves of 13–16 individual leaf rosettes per population were collected with a distance of at least 5–10 m between rosettes. The leaves were dried over silica gel and stored at -20 °C. In total, 258 individuals from 20 populations were analysed by AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). We searched for cpDNA variation in nine mostly non-coding regions. Seven plants from the geographically most distant populations were sequenced. Principal-coordinates analyses (PCoA) based on pair-wise Jaccard similarity measurements were used to visualize the pattern of similarity among all samples. The partitioning of genetic variance within populations, among populations and among regions was assessed by analysis of molecular variance (AMOVA). The level of within-population genetic diversity was expressed as Nei's gene diversity (D) for each population. Frequency down-weighted marker values (DW) were calculated as an additional measure of divergence among populations. Differences in gene diversity (D) and DW values for each population among the three regions (the Alps, the Bohemian Forest, the Giant Mts) were tested by one-way analysis of variance (ANOVA). A detailed description of the molecular analyses and data analysis are presented in EKRTOVÁ et al. (2012).

Results In total, 258 plants were successfully analysed and scored for three primer combinations, resulting in 367 unambiguously scorable fragments (83 % were polymorphic). No identical AFLP phenotypes were found across all analysed individuals. No region diagnostic markers were recorded for the Alps, the Bohemian Forest or the Giant Mts. PCoA revealed two quite separate groups of samples. The first group includes the plants from the Giant Mts whereas the second group contains mainly samples from the Alps and

the Bohemian Forests. Although a close relationship between samples from the Alps and the Bohemian Forests is evident, samples from each of these two regions tended to cluster separately. AMOVA analysis of the entire data set revealed high within-population variation (75.5 %). Variation among the three geographical groups and among populations within these groups represented 10.3 and 14.2 % of the total variation, respectively. Separate analyses (AMOVA) performed within each geographical region revealed the same pattern of high within-population variation (84.8, 83.2, and 85.5 % in the Alps, the Bohemian Forest, and the Giant Mts, respectively). The level of genetic diversity (D) was significantly different among the three regions ($F_{df(treatment-2, error-17)} = 7.52$, $P = 0.0046$). Within-population diversity was significantly higher in the Alps than in the Bohemian Forest ($P = 0.0041$), but did not significantly differ between the Giant Mts and either the Alps or the Bohemian Forest ($P > 0.8124$, 0.2207). Down-weighted marker values were highest in the populations linked to sub-alpine vegetation of cirques (PJ, KR1) and avalanche tongues (Sch3) in all three regions. The average DW values did not significantly differ among all three regions ($F_{df(treatment-2, error-17)} = 0.14$, $P = 0.8744$). No variation was detected in any of the nine amplified regions of the cpDNA in the samples from seven populations covering the central and northern edge of the distribution range.

Discussion The AFLP data from the *G. pannonica* populations revealed a surprising pattern, which was the grouping of populations by region. Separation of populations from the Giant Mts was unexpected. The results indicate long-term isolation of populations from the Giant Mts. *G. pannonica* might have been present at low altitudes between the Alpine ice sheets and the Bohemian Forest. The possibility that this large distribution extended to the Giant Mts cannot be dismissed. During the Early Holocene, the climate moderated, and the continuity between populations of *G. pannonica* was disrupted due to forest expansion or the disappearance of suitable habitats in lowlands. The postglacial period has probably been too short to enable strong genetic divergence among extant, more or less disjunctively distributed populations of long-lived perennial, clonal, and allogamous species such as *G. pannonica*. The species was first recorded in the Giant Mts in 1947, and the possibility

that this species was previously overlooked in that region was considered impossible. However, the estimated term (1938–1945) of introduction is in conflict with the biological traits of the species (10–20 year long generation cycle, slow growth etc.). In the second half of the 20th century, some man confessed to introducing *G. pannonica*. However his confession was doubtful, because he knew only one locality. On the other hand, historical data (eighteenth century) indicate the presence of *G. pannonica* in the Giant Mts. Our results can not conclusively confirm the indigenous status of the species in the Giant Mts (missing data from peripheral alpine population). However, the arguments for and against species status have recently favored an indigenous origin of *G. pannonica* in the Giant Mts.

Literatura

- BEGON M., HARPER J. L. & TOWNSEND C. R. 1997: Ekologie, jedinci, populace a společenstva. Vydavatelství University Palackého Olomouc. 949 str.
- ČURN V., DOLANSKÁ L. & HARAŠTOVÁ M. 2001: Genetic variation in populations of *Gentiana pannonica* (L.) Scop. *Silva Gabreta* 7: 141–146.
- DVORÁK J. 1997: Hořec panonský – cizinec, nebo domorodec? *Krkonoše* 9: 12–13.
- EHRICH D. 2006: AFLPDAT: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes* 6: 603–604.
- EKRTOVÁ E. & KOŠNAR J. 2012: Habitat-related variation in seedling recruitment of *Gentiana pannonica*. *Acta Oecologica* 45: 88–97.
- EKRTOVÁ E. 2012: Ecology and genetic diversity of *Gentiana pannonica* populations in different geographical and habitat scales. Ph.D. Thesis Series, No. 15. University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic. 222 str.
- EKRTOVÁ E., ŠTECH M. & FÉR T. 2012: Pattern of genetic differentiation in *Gentiana pannonica* Scop.: did subalpine plants survive glacial events at low altitudes in Central Europe? *Plant Systematics and Evolution* 298, 7: 1383–1397.
- EXCOFFIER L., LAVAL G. & SCHNEIDER S. 2006: ARLEQUIN version 3.01 an integrated software package for population genetics, University of Berne, Bern [online]. [cit. 9. 3. 2010]. Dostupné z WWW: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.
- EXCOFFIER L., SMOUSE P. E. & QUATTRO J. M. 1992: Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics* 131: 479–491
- FALK D. A. & HOLSINGER K. E. (eds) 1991: Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press New York. 304 str.
- FÉR T. 2011: Dominantní (binární) molekulární markery a jejich využití v populační a systematické biologii. In: MANDAK B., KRAHULEC F. & HROUDOVÁ Z. (eds), Evoluční aspekty biologie rostlin. Zprávy České Botanické Společnosti, Materiály 25: 61–78.
- GABRIELSEN T. M., BACHMANN K., JAKOBSEN K. S. & BROCHMANN C. 1997: Glacial survival does not matter: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga oppositifolia*. *Molecular Ecology* 6: 831–842.
- GENTON B. J., SHYKOFF J. A. & GIRAUD T. 2005: High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Molecular Ecology* 14: 4275–4285.
- HEGI G. 1975: *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, Band V, Teil 3. Verlag Paul Parey Berlin, Hamburg.
- HOFHANZLOVÁ E. & KRENOVÁ Z. 2007: Pollination strategy and reproductive success of *Gentiana pannonica* in a natural population. *Silva Gabreta* 13, 2: 83–94.
- CHYTRÝ M., DANIHELKA J., ERMAKOV N., HÁJEK M., HÁJKOVÁ P., KOČÍ M., KUBEŠOVÁ S., LUSTYK P., OTÝPKOVÁ Z., POPOV D., ROLEČEK J., ŘEZNIČKOVÁ M., ŠMARDA P. & VALACHOVIČ M. 2007: Plant species richness in continental southern Siberia: effects of pH and climate in the context of the species pool hypothesis. *Global Ecology and Biogeography* 16: 668–678.
- CHYTRÝ M., DANIHELKA J., KUBEŠOVÁ S., LUSTYK P., ERMAKOV N., HÁJEK M., HÁJKOVÁ P., KOČÍ M., OTÝPKOVÁ Z., ROLEČEK J., ŘEZNIČKOVÁ M., ŠMARDA P., VALACHOVIČ M., POPOV D. & PIŠUT I. 2008: Diversity of forest vegetation across

- a strong gradient of climatic continentality: Western Sayan Mountains, southern Siberia. *Plant Ecology* 196: 61–83.
- JENÍK J. 1979: Záhady kolem hořců. *Krkonoše* 12, 8: 19–21.
- KIRSCHNER J. & KIRSCHNEROVÁ L. 2000: Gentianaceae Juss. – hořcovité. In: SLAVÍK B (ed.). *Květena ČR 6*, Academia Praha: 72–110.
- KLÁSTERSKÝ I. 1961: Florogenetische Elemente der Tschechoslowakei. *Sborník Národního Muzea v Praze XVI. B 3–4*: 148–150.
- KOPECKÝ K. 1973: Je štovík alpský (*Rumex alpinus* L.) v Orlických horách původní? *Preslia* 45: 132–139.
- KRAK K. 2011: Využití sekvencí DNA při studiu evoluce rostlin. In: MANDAČ B., KRAHULEC F. & HROUDOVÁ Z. (eds), *Evoluční aspekty biologie rostlin. Zprávy České Botanické Společnosti, Materiály* 25: 95–125.
- KROCKER A. J. 1787: *Flora Silesiaca. Sumptibus G. T. Kornii Vratislaviae*.
- KUBÁT K., HROUDA L., CHRTEK J. jun., KAPLAN Z., KIRSCHNER J. & ŠTĚPÁNEK J. (eds) 2002: *Klíč ke květeně České republiky*. Academia Praha. 927 str.
- KUČERA J., TURIS P., ZOZOMOVÁ-LIHOVÁ J. & SLOVÁK M. 2013: *Cyclamen fatrense*, myth or true Western Carpathian endemic? Genetic and morphological evidence. *Preslia* 85: 133–158.
- KUNES P., PELÁNKOVÁ B., CHYTRÝ M., JANKOVSKÁ V., POKORNÝ P. & PETR L. 2008: Interpretation of the last-glacial vegetation of easterncentral Europe using modern analogues from southern Siberia. *Journal of Biogeography* 35: 2223–2236.
- MATTUSCHKA H. G. 1776: *Flora Silesiaca*. W. G. Korn Leipzig.
- MICHL T., HUCK S., SCHMITT T., LIEBRICH A., HAASE P. & BÜDEL B. 2010: The molecular population structure of the tall forb *Cicerbita alpina* (Asteraceae) supports the idea of cryptic glacial refugia in central Europe. *Botanical Journal of Linnean Society* 164: 142–154.
- PELÁNKOVÁ B., KUNES P., CHYTRÝ M., JANKOVSKÁ V., ERMAKOV N. & SVOBODOVÁ-SVITAVSKÁ H. 2008: The relationships of modern pollen spectra to vegetation and climate along a steppe-forest tundra transition in southern Siberia, explored by decision trees. *Holocene* 18: 1259–1271.
- PROCHÁZKA F. & ŠTECH M. 2002: Komentovaný černý a červený seznam cévnatých rostlin české Šumavy. *Správa NP a CHKO Šumava & Eko-Agency KOPR Vimperk*. 140 str.
- PROCHÁZKA F. 1961: *Gentiana pannonica* Scop. v ČSSR. *Preslia* 33: 268–276.
- PROCHÁZKA F. 1999: *Gentiana pannonica* (L.) Scop. In: ČEŘOVSKÝ J., FERÁKOVÁ V., HOLUB J., MAGLOCKÝ Š. & PROCHÁZKA F. (eds), *Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů ČR a SR, 5, Vyšší rostliny. Příroda* Bratislava. 167 str.
- SEGARRA-MORAGUES J. G. & CATALÁN P. 2003: Life history variation between species of the relictual genus *Borderea* (Dioscoreaceae): phylogeography, genetic diversity, and population genetic structure assessed by RAPD markers. *Biological Journal of Linnean Society* 80: 483–498.
- SCHÖNSWETTER P. & TRIBSCH A. 2005: Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). *Taxon* 54: 725–732.
- STATSOFT INC. 2001: *STATISTICA* (data analysis software system), version 6. StatSoft Tulsa.
- ŠMÍDOVÁ A., MÜNZBERGOVÁ Z. & PLAČKOVÁ I. 2011: Genetic diversity of a relict plant species, *Ligularia sibirica* (L.) Cass. (Asteraceae). *Flora* 206, 2: 151–157.
- ŠOUREK J. 1948: Výsledky botanického průzkumu Krkonoš za léta 1945–1947. Se zvláštním zřetelem k ochraně rostlin. *Ochrana přírody* 3, 3: 60–65.
- ŠOUREK J. 1963: *Gentiana pannonica* Scop. v Krkonoších. *Preslia* 35: 18–22.
- TER BRAAK C. J. F. & ŠMILAUER P. 2002: *CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination* (version 4.5). Microcomputer Power Ithaca, NY, USA.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJNS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRITERS A., POT J., PALEMAN J., KUIPER M. & ZABEAU M. 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407.