

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie (B1501)
Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie (1501R023)



Aneta Tröglerová

**Efektivní ochrana druhů ohrožených mezidruhovou hybridizací se
zvláštním přihlédnutím k rodu *Pulsatilla***

**Efficient conservation of species endangered by introgressive hybridization with a special
respect to genus *Pulsatilla***

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Konzultanti: Mgr. Marek Slovák, Ph.D.

RNDr. Petr Vít, Ph.D.

Praha, 2021

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, 6.5. 2021

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Tomáši Urfusovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu a cenné rady, kterými mě provázel. Také bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu.

Abstrakt

Mezidruhová hybridizace je v rostlinné říši velmi rozšířený fenomén. Je považována za mechanismus, díky kterému vznikají nové adaptace a potenciálně i nové druhy. Nejčastěji ke křížení dochází mezi blízce příbuznými taxony. Tato bakalářská práce shrnuje poznatky o projevech a důsledcích hybridizace. Jsou rozebírány zejména negativní vlivy jako např. demografický a genetický „swamping“. Ty jsou představeny v kontextu hybridizace vzácných druhů s běžnějšími a kompetičně silnějšími příbuznými taxony. Zjišťování míry mezidruhového křížení je důležité pro stanovení efektivní ochrany ohrožených taxonů.

Dále se práce zabývá vybranými druhy z rodu *Pulsatilla* (koniklec), konkrétně *Pulsatilla patens*, *P. pratensis* subsp. *bohemica* a *P. vernalis*, které jsou potenciálně ohroženy hybridizací. Početnost populací konikleců v posledních desetiletích prudce klesá nejen v České republice, ale i po celé Evropě. Navíc se mezi sebou ochotně vzájemně kříží, což představuje problém pro jejich ochranu.

Klíčová slova

Mezidruhová hybridizace, demografický „swamping“, genetický „swamping“, průtoková cytometrie, *Pulsatilla*

Abstract

Interspecific hybridization is a common phenomenon within plants. It is considered a mechanism through which new adaptations and potentially new species arise. Interspecific crossing frequently occurs between closely related taxa. This bachelor thesis summarizes the knowledge of the effects and consequences of hybridization. In particular, negative influences such as demographic and genetic swamping are discussed. These are presented in the context of hybridization of rare species with more common and competitively stronger related taxa. Assessing the degree of interspecific crossing is important to determine an efficient conservation of endangered species.

Furthermore, the work deals with selected species of the genus *Pulsatilla* (Pasque flower), specifically *Pulsatilla patens*, *P. pratensis* subsp. *bohemica* and *P. vernalis*, which are potentially endangered by hybridization. Populations of Pasque flower have been rapidly decreasing in recent decades not only in the Czech Republic but also throughout Europe. In addition, they are willing to hybridize with each other, which is a problem for their conservatoin.

Key words

Interspecific hybridization, demographic swamping, genetic swamping, flow cytometry, *Pulsatilla*

Obsah

1	Úvod	1
2	Hybridizace a její význam pro rostliny	2
3	Nebezpečí mezidruhov \acute{e} hybridizace pro vz \acute{a} cn \acute{e} druhy	5
4	Techniky zkoum \acute{a} n \acute{i} mezidruhov \acute{e} hybridizace	8
5	Vybran \acute{e} druhy \acute{C} esk \acute{e} republiky ohrožen \acute{e} mezidruhovou hybridizací z rodu <i>Pulsatilla</i>	9
5.1	Systematické zařazení rodu <i>Pulsatilla</i>	9
5.2	Morfologie	12
5.3	<i>Pulsatilla pratensis</i> subsp. <i>bohemica</i>	12
5.3.1	Morfologie	12
5.3.2	Ekologie	13
5.3.3	Rozšíření a výskyt v \acute{C} R.	14
5.4	<i>Pulsatilla patens</i>	14
5.4.1	Morfologie	14
5.4.2	Ekologie	15
5.4.3	Rozšíření a výskyt v \acute{C} R.	15
5.5	<i>Pulsatilla vernalis</i>	16
5.5.1	Morfologie	16
5.5.2	Ekologie	17
5.5.3	Rozšíření a výskyt v \acute{C} R.	17
6	Ohrožen \acute{i} a ochrana vybran \acute{y} ch druh \acute{u} koniklec \acute{u}	18
7	Mezidruhov \acute{a} hybridizace v rámci rodu <i>Pulsatilla</i>	19
8	Z \acute{a} v \acute{e} r	21
9	Literatura	23

1 Úvod

Lidé svou činností významně ovlivňují a přetvářejí přírodu kolem sebe. Vytvářejí mnoho typů disturbancí, které umožňují pronikání nových taxonů či propojení areálů dříve oddělených druhů (Crutzen, 2006). To má za následek, že spolu interagují druhy, které by jinak pravděpodobně do kontaktu nepřišly. Taková interakce mezi příbuznými druhy může vyústit v mezidruhovou hybridizaci. V případě, že se vzájemně kříží vzácné a běžné, konkurenceschopnější taxony, může se to pro ohrožené druhy stát rizikem (Levin, 2002). Hybridi představují nebezpečí jak demografické, tak genetické. Pokud je míra hybridizace vysoká, ztrácí se unikátní genofond vzácného druhu (Todesco *et al.*, 2016).

Jedním z rodů, který může být ohrožen mezidruhovou hybridizací, je *Pulsatilla* Mill. (koniklec). Jedná se o monofyletický rod (Sramkó *et al.*, 2019), skládající se zhruba ze 40 druhů (Aichele & Schwegler, 1957). Jednotlivé druhy mají vyvinuté jen velmi slabé vzájemné reprodukční bariéry, takže se v sympatrických areálech snadno kříží. V České republice se vyskytuje pět druhů konikleců a všechny patří mezi ohrožené. Mezi silně ohrožené druhy se řadí *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* Skalický, *P. grandis* Wender subsp. *grandis*, a *P. alpina* subsp. *alba* Zâmelis et Paegle. Zbývající dva druhy *P. patens* (L.) Mill. a *P. vernalis* (L.) Mill. patří mezi kriticky ohrožené. Zároveň jsou z našeho území popsáni tři hybridy. Z nichž je nejběžnější *P. × hackelii* Pohl (Skalický, 1988). Tento hybrid může představovat riziko v sympatrických populacích rodičovských druhů, kterými jsou *P. pratensis* subsp. *bohemica* a *P. patens*. Jelikož se rodiče i hybrid liší ve velikosti genomu, představuje pro jejich studium velmi efektivní metodu průtoková cytometrie.

Cílem této práce je shrnout dosud známé informace o mezidruhové hybridizaci a zejména jejím negativním vlivu na ohrožené druhy. Mezi další cíle patří představení vybraných druhů z rodu *Pulsatilla*, zhodnocení znalostí o vzájemném křížení a nastínění možného využití průtokové cytometrie pro efektivní studium hybridizace konikleců.

2 Hybridizace a její význam pro rostliny

Po staletí se předpokládalo, že hybridizace je vzácný fenomén, a pokud hybridi vzniknou, budou vždy neplodní (Knobloch, 1972). Vědci se dlouho domnívali, že evoluce probíhala pomalými, postupnými kroky. Až později začalo vycházet najevo, že se často jednalo o rychlý rozmach diverzity způsobený právě mezidruhovým křížením (Anderson & Stebbins, 1954).

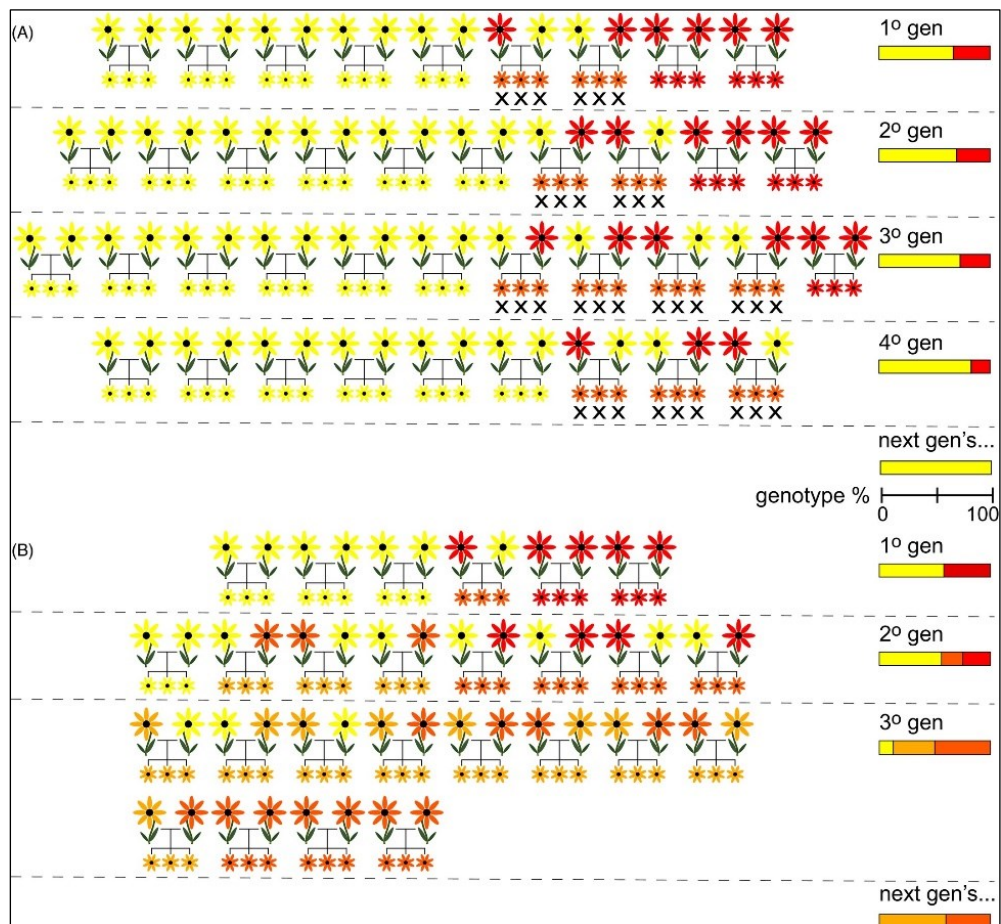
Přestože se hybridizaci po dlouhou dobu nepřikládala velký význam, měla zásadní roli od počátku domestikace a šlechtění rostlin i zvířat. Nejdříve se jednalo zřejmě o nevědomý proces. Později vybíráním vhodných jedinců s nejlepšími znaky a vzájemným křížením vznikaly nové druhy (Zirkle, 1935).

S přibývajícými experimenty se ukázalo, že mezidruhové křížení je velmi rozšířené. Například Knobloch (1972) uvádí 23 675 hybridů, ale ne u všech byl hybridní původ skutečně prokázán. Nicméně Ellstrand *et al.* (1996) porovnali pět velkých flór (Britské ostrovy, Skandinávie, dvě flóry severní Ameriky a Havajské ostrovy) a prokázal průměrné 11% zastoupení hybridizujících druhů. Zároveň ukázali, že pouze 6-16 % rodů podstupuje hybridizaci, a že tedy není rovnoměrně zastoupena. Z tohoto srovnání nelze vyvozovat obecné závěry, avšak předpokládají se podobné výsledky i pro jiné oblasti.

Ve dvacátém století se začalo hybridizačním procesům věnovat více pozornosti. Již od prvních pokusů s hybridizací rostlin byl pozorován stimulační efekt – heteroze. Projevuje se vyšší životaschopností, biomasou, reprodukcí a rychlejším růstem (Jones, 1917). Velmi hojně se využívá v zemědělství pro zvýšení výnosu ze sklizně, např. *Oryza sativa* (Zhou *et al.*, 2012); *Gossypium hirsutum* (Shang *et al.*, 2016). Hybridy mohou vykazovat tzv. transgresivní segregaci, což znamená, že v některých znacích mohou přesahovat rodičovské linie. Zvyšuje se jejich adaptibilita a mohou snadněji osidlovat nová prostředí. Tyto vlastnosti se na rozdíl od heteroze objevují až v pozdějších filialních generacích (Vega & Frey, 1980).

Kromě výše zmíněného utilitárního pohledu se však zpočátku na hybridizaci pohlíželo spíše jako na "slepu uličku" evoluce, která je v přírodě velmi ojedinělá. Významným pokrokem v pochopení evolučních důsledků hybridizace byl objev procesu polyploidizace (multiplikace genomu), která je často s hybridizací kombinována (alopolyploidie; Wingě, 1917). Alopolyloidizace je v současné době považována za jeden z nejdůležitějších kroků pro stabilizaci hybridů (Soltis & Soltis, 1993). S ohledem na ploidní úroveň je rozeznávána hybridizace homoploidní (stejná ploidní úroveň; Yakimowski & Rieseberg, 2014) a heteroploidní (různá ploidní úroveň; Olšavská & Löser, 2013). Dalším objevem, který formoval pohled na hybridizaci, bylo prokázání zpětného křížení hybridů s rodičovským druhem (příp. druhy), tzv. introgrese (Anderson & Hubricht, 1938).

Hybridizace může mít na některé druhy, zvláště ty vzácné, výrazně negativní až ohrožující vliv. Ohrožující je i druhové křížení, jehož produktem jsou sterilní nebo málo plodní hybridi. Soutěží s rodiči o místo, zdroje (např. voda, světlo) nebo například o opylovače. Vzácný rodičovský druh se vyčerpá tvorbou slabých a neplodných kříženců s početnějším druhem. V takovém případě se jedná o tzv. demografický „swamping“ (Wolf *et al.*, 2001). Pokud jsou potomci fertillní a nemají vyvinuté reprodukční bariéry, mohou se zpětně křížit s rodičovskými druhy. V případě, že mají hybridi vysokou kompetiční schopnost může dojít k tzv. genetickému „swamingu“. Hybridy nahradí jeden, případně oba druhy, a dojde tak k vymizení čistých rodičovských linií (viz. Obrázek č. 1; Rhymer & Simberloff, 1996; Todesco *et al.*, 2016).



Obrázek č. 1: Pokud dojde ke křížení vzácného (červeného) a běžného (žlutého) druhu, může dojít k vyhynutí vzácného druhu skrze demografický (A) „swamping“ v případě sterility hybridů nebo skrze genetický (B) „swamping“ pokud jsou hybridy fertillní a mohou se zpětně křížit s rodiči. (převzato z Todesco *et al.*, 2016)

Jestliže dojde ke kontaktu druhů, které od sebe nejsou úplně reprodukčně izolované, může mezi nimi vzniknout hybridní zóna. Tradiční pohled předpokládá parapatrický areál rozšíření dvou druhů a křížení v regionu, ve kterém se stýkají. Takový region může být dlouhý od pár metrů až po několik kilometrů (Barton & Hewitt, 1985). V zónách proti sobě působí selekce proti hybridům vůči jejich

disperzi. Proto se tyto oblasti mohou v průběhu času lehce posouvat a měnit. Takovéto zóny byly několikrát skutečně potvrzeny, například u druhů *Centaurea* (Hardy *et al.*, 2000), *Populus* (Martinsen *et al.*, 2001), *Senecio* (Prentis *et al.*, 2007). V některých případech jsou kontaktní zóny nepravidelné a spíše mozaikovitě uspořádané v rámci celého areálu rozšíření rodičovských druhů. Vzájemně se kříží a vytvářejí ostrůvkovité areály hybridů, ale na jiných místech si zachovávají svou integritu. Výskyt hybridů je většinou podmíněn ekologickými změnami, např. odlišný typ půdy (Harrison & Larson, 2016). Již od počátku vědce zajímalo, zda se jedná o primární kontaktní zónu, a tedy druhy se od počátku vyvíjejí v sympatrických populacích, např. *Knautia arvensis* (Hanzl *et al.*, 2014), případně o zónu sekundární, kde druhy přišly druhotně do kontaktu poté, co se vyvíjeli odděleně, např. *Pinus ponderosa* (Latta & Mitton, 1999). Bohužel je velmi obtížné tyto dvě situace spolehlivě rozlišit. Nicméně se předpokládá, že většina rostlinných hybridních zón je druhotného typu. Největší roli pravděpodobně hrála poslední doba ledová nebo v současné době sílící vliv člověka a rozšiřování nepůvodních druhů (Barton & Hewitt, 1985). Extrémní formou hybridních zón jsou hybridní roje. Vznikají zpětným křížením a po několika generacích může dojít ke smazání rozdílů mezi genotypy jednotlivých druhů. Introgrese ve většině případů probíhá ve zpětném směru pouze jednoho z rodičů, např. *Sonnertia*, *Bruguiera*, *Ligularia* (Zhou *et al.*, 2008); *Milicia* (Dainou *et al.*, 2017).

Rostliny si vyvinuly reprodukční bariéry, aby předešly negativním vlivům hybridizace. Tradičně je rozdělujeme na prezygotické a postzygotické podle toho, v jaké fázi vývoje se nachází. Prezygotické bariéry se mohou dále dělit na ty, které pozorujeme již před opylením, tzv. „pre-mating“ či po opylení neboli „post-mating“. Mezi první jmenované můžeme zařadit například geograficky oddělená místa výskytu, rozdíly ve fenologii nebo specializaci opylovačů. Pokud již dojde k přenosu pylu, mohou klíčení pylové láčky zabránit negativní interakce mezi pylem a pestíkem. Postzygotické bariéry zahrnují sníženou životnost a plodnost hybridů a jejich celkovou nižší fitness oproti rodičovským druhům (Pickup *et al.*, 2019). Studie ukazují, že prezygotické bariéry mají mnohem větší vliv na redukci genetického toku mezi populacemi, např. (Ramsey *et al.*, 2003; Kay, 2006). Naproti tomu se objevují výzkumy, které ukazují důležitost postzygotických bariér (Liao *et al.*, 2019), a proto je nutné dále věnovat pozornost mechanismům reprodukční izolace.

Hybridizace je velmi rozšířený fenomén, ale její role při vzniku nových druhů není zcela jednoznačná. Na jedné straně ji lze považovat za lokální jev s pouhým dočasným efektem, tzv. „evoluční šum“ (Wagner, 1970) nebo na straně druhé za zdroj genetické variability a nových adaptací vedoucích ke speciaci (Anderson & Stebbins, 1954). Nové druhy mohou vzniknout zachováním ploidní úrovně (Abbott *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2021) či její změnou (Soltis & Soltis, 1993; Brochmann *et al.*, 2004). Homoploidní speciace se považuje za vzácnější (Rieseberg, 1997). Zároveň je obtížnější ji spolehlivě prokázat, jelikož se musí dokázat hybridní původ a reprodukční izolace vůči rodičovským

druhům (Schumer *et al.*, 2014). Vzniká u blízce příbuzných druhů (Chapman & Burke, 2007). Velmi důležitým kritériem pro stabilizaci nových homoploidních hybridních druhů je vznik prezygotických bariér v podobě například geograficky a ekologicky odlišného habitatu či rozdílů ve fenologii (Abbott *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2021). Navzdory předpokladu, že homoploidní speciace probíhá pomalým tempem, Ungerer *et al.* (1998) prokázali, že *Helianthus anomalus* mohl vzniknout již za zhruba 60 generací. Nicméně později se ukázalo, že stabilizace genomu může probíhat až několik stovek generací (Buerkle & Rieseberg, 2008). Předpokládá se, že díky současným molekulárně-genetickým metodám dojde k odhalení dalších homoploidních hybridů (Abbott *et al.*, 2010).

Polyploidizace neboli duplikace počtu chromozomů, je běžnější a rychlejší mechanismus vzniku nových druhů. Zhruba 15 % krytosemenných rostlin prošlo při speciaci změnou ploidní úrovně (Wood *et al.*, 2009). Tradičně se dělí na autopolyploidii (duplikace genomu v rámci druhu) a alopolyploidii (duplikace hybridního genomu vzniklého ze dvou sad chromozomů). Nicméně není vždy snadné jednoznačně rozlišit, o který typ ploidie se jedná (Mallet, 2007). Alopolyploidie vytváří silnou postzygotickou bariéru, protože při zpětném křížení s rodiči vzniknou většinou málo životaschopní a sterilní jedinci. Nejčastěji k alopolyploidii dochází duplikací genomu, která následuje po hybridizaci (Stebbins, 1947), spojením neredukovaných gamet (Karpechenko, 1927) nebo tzv. triploidním mostem (Ramsey & Schemske, 1998). Nejčastěji alopolyploidie osidluje prostředí narušená lidskou činností či klimatickou změnou (Brochmann *et al.*, 2004).

3 Nebezpečí mezidruhov^é hybridizace pro vzácné druhy

Mezidruhov^á hybridizace je v rámci rostlinné říše velmi rozšířená. Většinou se na ni nahlíží jako na mechanismus vzniku nových adaptací a případně i druhů (Andreson & Stebbins, 1954). Problém může nastat, pokud se jedním z hybridizujících druhů stane vzácný či ohrožený taxon. Vzácné druhy jsou pod tlakem celé řady vlivů, a pokud se k nim přidá navíc i mezidruhov^á hybridizace, může se velmi snadno stát, že vymizí úplně (Levin *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 2001; Levin, 2002).

Vzácné druhy mohou být významně ohrožené hybridizací, pokud se setkají s běžnějším a odolnějším příbuzným taxonem. Ke kontaktu velmi často dochází prostřednictvím lidské činnosti (Ellstrand & Elam, 1993; Field *et al.*, 2011). Nejsnáze odhalitelným a následně i napravitelným případem je, pokud druhy vytvářejí sterilní hybridy. Jedním z takto ohrožených druhů je český hadcový endemit *Cerastium alsinifolium*, kterého ohrožuje široce rozšířený *C. arvense* (Vít *et al.*, 2014). Mezidruhov^í kříženci tvořili 38,7 % ze studovaných vzorků. Analýza velikosti genomu *C. alsinifolium* navíc odhalila, že se druh oproti očekávání běžněji vyskytuje ve stinných a vlhčích mikrohabitatech. Takovým plochám, ale nebyla věnována dostatečná pozornost při plánování záchranných programů.

To dokazuje, jak důležité jsou biosystematické studie pro určení správného ochranářského managementu (Vít *et al.*, 2014). Dalším českým endemitem potenciálně ohroženým mezidruhovým křížením je *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus*. Na lokalitě u obce Kleneč hybridizuje s početnějším *D. carthusianorum* (Vítová *et al.*, 2015). Nicméně průtoková cytometrie odhalila hybridní původ pouze u 11 z domnělých 39 hybridů. Ti navíc měli jen nízkou fertilitu. To znamená, že český endemit není hybridizací příliš ohrožen. Nicméně špatný management by mohl umožnit další křížení a upřednostnění odolnějšího *D. carthusianorum* (Vítová *et al.*, 2015). Riziko hybridizace bylo hodnoceno i v případě původního australského druhu *Senecio pinnatifolius*, který sice není vzácný, ale přesto významně ohrožený mezidruhovým křížením (Prentis *et al.*, 2007). Prokázala se velmi vysoká frekvence hybridů (až 75,6 %) s invazivním druhem *S. madagascariensis*. Mezi druhy zřejmě existují silné postzygotické bariéry, jelikož jsou hybridy většinou neplodní. Na některých lokalitách však byla vysoká koncentrace hybridů, a to by mohlo způsobit lokální extinkci *S. pinnatifolius*. Proto je nutné se do budoucna snažit zabránit kontaktu těchto dvou druhů, aby počet hybridů dále nestoupal (Prentis *et al.*, 2007).

Hybridy však mohou být schopni zpětného křížení se vzácným druhem, a tím nastává mnohem vážnější problém. Prostřednictvím introgrese může být významně ohrožena integrita původního genofondu vzácného druhu. Takovým příkladem by mohl být hybridní roj mezi *Viola lutea* subsp. *sudetica* a *Viola tricolor* (Krahulcová *et al.*, 1996). Kontakt těchto dvou druhů způsobila výhradně lidská činnost, jelikož vysypávání cest zásaditým vápencovým štěrkem, v jinak kyselém prostředí krkonošských hor, umožnilo šíření *V. tricolor*. I když se produkce pylu pohybovala jen mezi 20-45 %, musí být hybridy úspěšné, jelikož od roku 1970 stále narůstá počet hybridních populací. Navíc osidlují i místa, na kterých *Viola lutea* subsp. *sudetica* předtím nerostla, což může představovat riziko pro další původní druhy (Krahulcová *et al.*, 1996). Dalším vzácným druhem ohroženým genetickým „swampingem“ je australský druh *Eucalyptus tetrapleura* (Rutherford *et al.*, 2019). V posledních letech se začal šířit i do míst, kde se předtím nevyskytoval. Proto vznikla obava, že se bude křížit s ostatními běžnějšími druhy. Avšak výsledky studie ukázaly, že již ke křížení běžně dochází a nové habitaty osidlují právě hybridy. Skutečný areál výskytu je tak ještě mnohem menší než původně předpokládaných a již tak velmi omezených 4000 km². Musí se proto zvážit další postup ochrany a určit skutečný počet jedinců s „čistým“ genofondem *E. tetrapleura* (Rutherford *et al.*, 2019).

Velmi specifickým příkladem ohrožení vzácného druhu je introgrese genů z užitkových rostlin do divoce rostoucích populací. Například zahradní okrasné kultivary mohou představovat hrozbu pro původní druhy. Mezi takto potenciálně ohrožené rostliny lze zařadit například *Nymphaea alba* a *N. candida*. Problémem je navíc nespolehlivé rozlišení původních druhů, hybridů a kultivarů (Borsch *et al.*, 2007; Ejankowski & Małysz, 2011). Ne vždy lze spolehlivě využít morfometrické znaky, ale rozdílná velikost genomu umožnila použití průtokové cytometrie (Kabátová *et al.*, 2014). Původní druhy mají

zřejmě vyvinuté silné reprodukční bariéry vůči kultivarům, protože z celkového počtu studovaných vzorků tvořily hybridy pouze 1,8 %. Nicméně využívají stejný omezený habitat, a proto se může stát, že kultivary přerostou či vytlačí divoké druhy (Kabátová *et al.*, 2014). Potenciálně ohrožené jsou i původní druhy rodu *Tulipa* v Číně (Xing *et al.*, 2020). Pět studovaných kultivarů zahrnovalo 'Judith Leyster,' 'World's Favorite,' 'Heart of Poland,' 'Crispa Fabio' and 'Jumbo Pink,' a pět původních druhů *Tulipa thianschanica*, *T. sinkiangensis*, *T. altaica*, *T. buhseana* a *T. schrenkii*. Počítání chromozomů a karyotypy odhalily nejbližší příbuznost *T. altaica* se všemi kultivary. Potvrdil to i fakt, že nejvíce životaschopných hybridů vytvořil právě druh *T. altaica*. Naopak křížení s druhy *T. sinkiangensis* a *T. buhseana* nebylo úspěšné ani s jedním kultivarem. I zde se tak odhalily silné pre – i postzygotické bariéry mezi pěstovanými a původními druhy (Xing *et al.*, 2020).

Divoce rostoucí příbuzné druhy se již velmi dlouho využívají k získání nových výhodných genů a vlastností u domestikovaných rostlin (Hajjar & Hodgkin, 2007). Až v poslední době se začala věnovat pozornost i opačnému procesu, tedy introgresi genů z kultivarů do divoce rostoucích populací (Ellstrand *et al.*, 1999). Užitkové druhy mají kvůli dlouhodobému šlechtění velmi málo rozmanitý genom (Warschewsky *et al.*, 2014). Příkladem by mohly být kultivary *Coffea arabica*, ve kterých byla zjištěna nízká genetická diverzita (Anthony *et al.*, 2002). V původním areálu *Coffea arabica*, tj. v Etiopii, proto také existují důvodné obavy, že křížení přírodních populací s pěstovanými kultivary může způsobit ztrátu jejich genetické rozmanitosti (Aerts *et al.*, 2013). Mikrosatelity ani AFLP markery pokles genetické diverzity neprokázaly, pravděpodobně díky častému střídání kultivarů. Na druhou stranu byl u populací rostoucích v okolí plantáží s pololesním hospodařením nalezen gen rezistence vůči houbovému patogenu *Colletotrichum kahawae*, který pravděpodobně unikl z pěstovaných kultivarů prostřednictvím introgresivní hybridizace. S přibývajícím fragmentací pralesů by tak mohlo dojít k rozsáhlému ohrožení původního genofondu *Coffea arabica* (Aerts *et al.*, 2013). U rodu *Aegilops* se introgrese prokázala velmi spolehlivě, a to u 25 % testovaných vzorků ze Španělska, Francie, Itálie, Chorvatka a Turecka (Arrigo *et al.*, 2011). Byly zkoumány tři druhy (*Aegilops triuncialis*, *Ae. neglecta*, *Ae. geniculata*) rostoucí sympatricky s pšenicí (*Triticum aestivum*). Byly vybrány populace v blízkém okolí polí (20-30 m) i vzdálené (50 m-15 km), aby se zároveň prověřila domněnka, že ke křížení dochází pouze lokálně. Podle předpokladu se nejvíce introgresí přenesených genů vyskytovalo v populacích blízkých. Na druhou stranu byly geny z pšenice nalezeny i v jedincích vzdálených i 15 km (Arrigo *et al.*, 2011). Možné vysvětlení by mohlo být přenos semen pomocí skotu či lidskou činností. Další eventualitou by mohla být dlouhá perzistence genů, jelikož Weissmann *et al.* (2005) našli alely z pšenice u *Ae. peregrina* v lokalitě, kde už nebyla pěstována téměř 30 let. I přesto, že se tyto alely spolehlivě prokázaly pouze u jedné rostliny, tak dlouhodobá přítomnost cizích genů by mohla představovat zásadní problém, a proto by jí měla být věnována pozornost i u jiných druhů.

V případě, že se druh kříží s více druhy může být ohrožen jak demograficky, tak geneticky. Konkrétně byl zkoumán stepní keřovitý druh *Prunus fruticosa* spolu s dalšími dvěma kultivovanými a užitkovými druhy *P. cerasus* a *P. avium* a jejich hybridy (Macková *et al.*, 2018). Rozdíly ve velikosti genomu umožnily využít průtokovou cytometrii. Výsledky odhalily velmi znepokojivé 39 % zastoupení hybridních populací. *Prunus fruticosa* je tak významně ohrožena demograficky, kompeticí o prostor a zdroje vytvářením triploidních hybridů s *P. avium*. Navíc zároveň geneticky, kvůli homoploidní hybridizaci s *P. cerasus* a potencionální introgresi (Macková *et al.*, 2018). Ztráta původního genofondu *P. fruticosa* by se mohla projevit i v zemědělství. Jedná se o stepní druh, a proto již byla využita ve šlechtění kulturních třešní a má v tomto ohledu rozhodně potenciál do budoucna, zejména při zvyšování odolnosti vůči suchu (Pruski, 2007; Barac *et al.*, 2017).

Další potencionální problém nastává v posledních desetiletích s transgenními rostlinami (Ellstrand *et al.*, 2013). Některé kultivary mohou mít například vložený gen pro rezistenci k herbicidům či nemocem. V případě křížení s původním příbuzným druhem, který již má potenciál stát se plevelem nebo invazní rostlinou, mohou nové geny zvýšit schopnost kompetice (Stewart *et al.*, 2003; Chapman & Burke, 2006). Jedním z nejvíce studovaných příkladů je křížení mezi užitkovou a volně rostoucí rýží, která je obecně považována za plevel (Oard *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2016). Blízká genetická příbuznost, shodná fenologie a vysoká schopnost vzájemného opylení předpokládá velkou pravděpodobnost mezidruhového křížení. V posledních letech se navíc divoká rýže začala objevovat častěji a ve větších populacích v okolí polí a způsobuje škody 5-90 % (Rao *et al.*, 2007; Ratnasekera, 2015). Nicméně studie ukazují, že genetický tok mezi druhy je velmi nízký, pouze v rozmezí 0,002-2,3 % (Chen, 2004; Sanchez Olguin *et al.*, 2009; Pu *et al.*, 2014). Zpravidla se stejné kultivary sází na stejná pole několik sezón za sebou, takže i při nízké úrovni mezidruhového křížení může dojít k postupnému zvyšování počtu hybridů. Další studie se zabývají například plevelnými druhy řepy (*Beta* spp.) (Bartsch, 2010) a ředkviček (*Raphanus* spp.) (Snow & Campbell, 2005).

4 Techniky zkoumání mezidruhové hybridizace

Studium hybridizace probíhá ve větší míře již od poloviny 19. století. Jednou z prvních metod zkoumání hybridizace bylo experimentální křížení, které přineslo spoustu nových objevů, a i dodnes se hojně využívá, např. Jones, 1917; Jonsson *et al.*, 1991; Liebst & Schneller, 2005; Mötler *et al.*, 2021). Odhalit probíhající mezidruhové křížení v přírodě může být leckdy problém. Nejčastěji bývají hybridy určeny podle přechodné morfologie rodičovských druhů. Nicméně většina hybridů vykazuje spíše směsici rodičovských a přechodných znaků (Rieseberg, 1995). Proto je někdy velmi obtížné spolehlivě

odlišit hybridy a rodičovské druhy a je nutné využít genetických metod. Spolehlivou, hojně používanou, ale náročnou metodou je karyologie, která se v rámci studia hybridizace nejčastěji používá ke stanovení aneuploidie, např. (Koo *et al.*, 2018) a chromozomálních přestaveb, např. (Nicolas *et al.*, 2012). Soubor vysoce citlivých metod pro zjišťování hybridních procesů představují molekulární markery. Umožnily objev do té doby přehlížených jevů jako například dávné hybridizace např. (Grimm & Denk, 2008; Fehrer *et al.*, 2009) nebo kryptických druhů, např. (Nicolè *et al.*, 2007; Paule *et al.*, 2012).

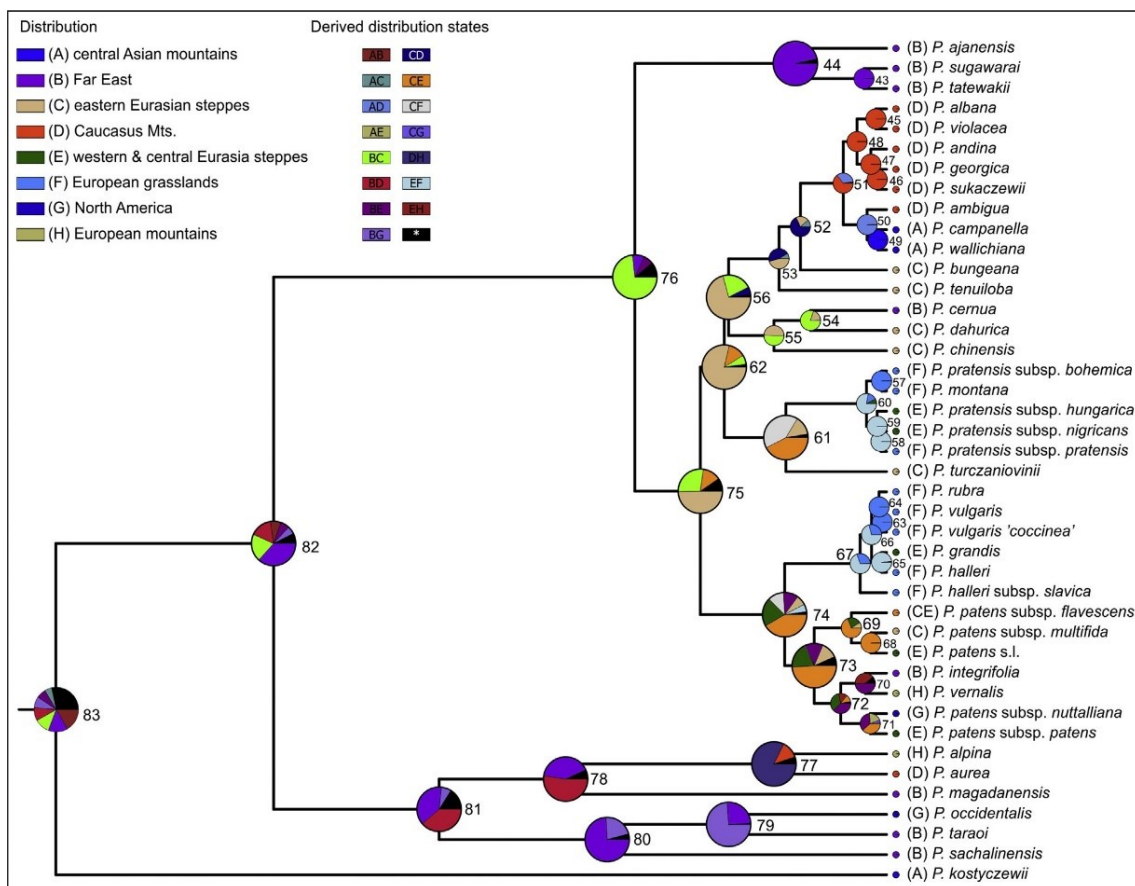
Velmi oblíbenou metodou pro studium cévnatých rostlin se v posledních desetiletích stala průtoková cytometrie. Má velký rozptyl možných použití od biosystematiky, přes ekologii až po populační biologii rostlin (Loureiro *et al.*, 2010). Mezi její největší výhody patří rychlost a přesnost měření (Doležel *et al.*, 2007), čímž je zároveň umožněno efektivně analyzovat velké množství vzorků za relativně krátký čas (Loureiro *et al.*, 2010). Průtoková cytometrie nevyžaduje buňky, které procházejí dělením, což usnadňuje zjišťování ploidní úrovně (Doležel *et al.*, 2007). Nejčastěji se využívají vzorky z listů, ale je možné použít celou řadu pletiv od kořenů, přes stonky, až po květy, či dokonce semena (Suda, 2005). Velkou předností průtokové cytometrie je možnost využití jen velmi malé části pletiva pro spolehlivou analýzu. Může být použita například pro zjišťování ploidie i u malých semenáčků, a tím umožnit vyřazení nepotřebných jedinců a snížit finanční náklady některých experimentů (Suda, 2005). Zároveň umožňuje analýzu vzácných a mizejících taxonů, aniž by to populace či jedince nějakým způsobem ohrožovalo (Loureiro *et al.*, 2010). Velký potenciál průtokové cytometrie může být ve studiu homoploidní hybridizace (Kron *et al.*, 2007). Pokud se dva druhy stejné ploidní úrovně dostatečně liší ve velikosti genomu, je možné odhalit i hybridní jedince, kteří mívají intermediární velikost (Loureiro *et al.*, 2010). Průtoková cytometrie byla použita například ke studiu ohrožených druhů z rodu *Pulsatilla* (koniklec), které se vyskytují na našem území a vytvářejí hybridní jedince (Krejčová, 2011; Krejčová, 2014).

5 Vybrané druhy České republiky ohrožené mezidruhovou hybridizací z rodu *Pulsatilla*

5.1 Systematické zařazení rodu *Pulsatilla*

Rod *Pulsatilla* se řadí do čeledi *Ranunculaceae*, podčeledi *Ranunculoideae*, tribu *Anemoneae* (Tamura, 1993). Nejblížejším sesterským rodem je *Anemone s.s.* (Hoot *et al.*, 2012; Sramkó *et al.*, 2019). Liší se od rodu *Pulsatilla* zejména v počtu okvětních lístků (může jich být až 20), chybějícími nektarií, nepravidelně rozvětveným stonkem u některých druhů a také listeny, které bývají podobné přizemním listům (Tamura, 1993; Skalický, 1988). V rámci rodu *Pulsatilla* je rozeznáváno zhruba 40 druhů, které se vyskytují pouze na severní polokouli v temperátních nížinách i horských pásmech (Aichele &

Schwegler, 1957). Původně bylo rozeznáváno pět sekcí (*Pulsatilla*, *Semicampanaria*, *Iostemon*, *Preonanthus*, *Preonanthopsis*). Do sekce *Iostemon* patřil pouze nejbazálnější *P. kostyczewii*, naopak sekce *Pulsatilla* obsahovala několik podsekcí, druhů a variet, včetně *P. patens*, *P. pratensis* a *P. vernalis* (Aichele & Schwegler, 1957). Nicméně toto rozdělení bylo vytvořeno na základě morfologie a nebylo nikdy úplně potvrzeno genetickými metodami. Až nedávná studie zkoumala evoluční historii rodu *Pulsatilla* na základě jaderné a plastidové DNA (Sramkó et al., 2019). Na základě komplexního molekulárně fylogenetického přístupu byl vytvořen recentní příbuzenský systém (viz. Obrázek č. 2) pro 31 druhů, 9 poddruhů (včetně českého *P. pratensis* subsp. *bohemica*) a dva kultivary. Druhy se přerozdělily do tří podrodů (*Kostyczewianae*, *Preonanthus*, *Pulsatilla*), v rámci



Obrázek č. 2: Fylogenetický strom rodu *Pulsatilla*, který zároveň zahrnuje současné a pravděpodobné rozšíření v minulosti (převzato ze Sramkó et al., 2019).

kterých existují další sekce a série (viz. Tabulka č. 1). Potvrdil se bazální původ *P. kostyczewii*, jelikož se ukázalo, že se jedná o sesterskou linii všech ostatních druhů. Do podrodu *Preonanthus* se řadí sedm druhů, které jsou také fylogeneticky původnější. Patří sem některé velmi záhadné druhy jako například *P. sachalinensis* (známý pouze z jedné lokality na Sachalinu), *P. taraoi* (endemit Kurilských ostrovů) či severoamerický *P. occidentalis*. Potvrzuje se tak rozšíření přes Beringovu úžinu do severní Ameriky a následná speciace. Podrod *Pulsatilla* zahrnuje všechny zbývající druhy a je zároveň

nejdiverzifikovanější. Největším překvapením je odhalení sesterského charakteru druhů *P. integrifolia* a *P. vernalis* zařazených do společné série *Patentes* (viz. Tabulka č. 1). Zajímavý je rozdíl v chromozomové stavbě mezi *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*, jelikož u *P. patens* došlo ke ztrátě 5S lokusu, naopak u *P. pratensis* subsp. *bohemica* k jeho duplikaci a translokaci na akrocentrický chromozom. Na základě výsledků autoři navrhli přepracovanou taxonomickou tabulku pro rod *Pulsatilla* (viz. Tabulka 1; Sramkó *et al.*, 2019). Li *et al.* (2020) na základě studia chloroplastového genomu určili osm vysoce variabilních regionů, které by se daly využít k získání jaderných mikrosatelitů (SSRs), rozsáhlých repetitivních sekvencí a jednonukletidového polymorfismu, což by mohlo to být velmi prospěšné pro budoucí studie genetické diverzity konikleců.

Tabulka č. 1: Taxonomická tabulka rodu *Pulsatilla* vytvořená na základě navrhovaného taxonomického rozdělení, který představují ve své studii Sramkó *et al.*, (2019) (podtržené druhy se nacházejí v České republice).

Podrod	Sekce	Série	Druhy
<i>Kostyczewianae</i>			<i>P. kostyczewii</i>
<i>Preonanthus</i>	<i>Preonanthus</i>		<i>P. alpina</i> (subsp. <i>alba</i>), <i>P. alba</i> , <i>P. aurea</i> , <i>P. magadanensis</i> ,
	<i>Preonanthopsis</i>		<i>P. taraoi</i> , <i>P. nipponica</i> , <i>P. occidentalis</i> , <i>P. sachalinensis</i>
<i>Pulsatilla</i>	<i>Tatewakianae</i>		<i>P. tatewakii</i> , <i>P. sugawarai</i> , <i>P. ajanensis</i>
	<i>Pulsatilla</i>	<i>Patentes</i>	<i>P. integrifolia</i> , <i>P. patens</i> (subsp. <i>flavescens</i> , subsp. <i>multifida</i> , subsp. <i>nuttalliana</i>), <i>P. vernalis</i>
		<i>Pulsatilla</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>P. grandis</i> (subsp. <i>slavica</i> , subsp. <i>styriaca</i>) <i>P. rubra</i>
	<i>Semicampanaria</i>	<i>Pratenses</i>	<i>P. pratensis</i> (subsp. <i>bohemica</i> , subsp. <i>hungarica</i> , subsp. <i>nigricans</i>), <i>P. montana</i> , <i>P. turczaninovii</i>
		<i>Semicampanaria</i>	<i>P. cernua</i> , <i>P. chinensis</i> , <i>P. dahurica</i> , <i>P. tongkangensis</i>
		<i>Albae</i>	<i>P. albana</i> , <i>P. andina</i> , <i>P. georgica</i> , <i>P. violacea</i> , <i>P. ambigua</i> , <i>P. campanella</i> , <i>P. wallichiana</i> , <i>P. tenuiloba</i> , <i>P. sukaczewii</i> , <i>P. bungeana</i> , <i>P. armena</i> , <i>P. millefolium</i>

U rodu *Pulsatilla* je základní chromozomové číslo $x = 8$ (Tamura, 1993). Většina druhů konikleců (včetně *P. patens*, *P. vernalis*, *P. pratensis* subsp. *bohemica*) vyskytujících se na území České republiky

jsou diploidi, což znamená, že počet chromozomů je 16 (Skalický, 1988; Kaplan *et al.*, 2019). Výjimku tvoří pouze původní druh *P. grandis* subsp. *grandis* (k. velkokvětý pravý) a zavlečený *P. vulgaris* (k. německý), kteří mají chromozomové číslo $2n = 32$ odpovídající tetraploidní úrovni (Skalický, 1988; Kaplan *et al.*, 2019).

5.2 Morfologie

Koniklece jsou vytrvalé trsnaté rostliny, které jsou celé pokryté chlupy (Tamura, 1993). Mají vícečetný, kolmý, šupinatý oddenek (Aichele a Schwegler, 1957). Přízemní složené listy bývají v růžici až po dvanácti. Stonek nese vždy jen jeden květ a zároveň listenový útvar, který se nachází pod květem (Skalický, 1988). Okvětních lístků je ve většině případů šest a tvoří zvonkovitý tvar, někdy široce otevřený (Tamura, 1993). V květu se nachází velký počet pestíků a tyčinek, přičemž vnější tyčinky jsou přeměněné ve staminodiální nektaria (Aichele a Schwegler, 1957). Po opylení se vytvářejí nažky s chlupatým přívěskem (Skalický, 1988). Stejně jako většina ostatních rostlin z čeledi *Ranunculaceae* obsahují i koniklece glykosid ranunkulin, který se štěpí na jedovatý protoanemonin. Nicméně sušením se mění na neaktivní anemonin, který již není nebezpečný (Skalický, 1988).

5.3 *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica*

5.3.1 Morfologie

Pulsatilla pratensis subsp. *bohemica* Skalický (koniklec luční český) je vytrvalá bělavě chlupatá rostlina vysoká zhruba 8-15 cm (viz. Obrázek č. 3; Skalický, 1988). Má černý oddenek, který je téměř vertikální (Aichele a Schwegler, 1957). Listy jsou v přízemní růžici většinou po třech až pěti. Nepřezimují, ale v době květu jsou již zpravidla vyvinuty. Vejčitá čepel je obvykle jednou až dvakrát lichožpeřená s 3-5 jařmy s 1-2 x peřenosečnými lístky. Úkrojků může být až dvě stě (Skalický, 1988). Květy jsou nicí, malé, válcovité a zpravidla tmavě fialové. Eliptické okvětní lístky bývají na vrcholu alespoň mírně ohnuté směrem ven (Aichele a Schwegler, 1957). Při odkvětu se mohou otevírat do zvonkovitého tvaru (Skalický, 1988). Začíná kvést zhruba o dva týdny dříve než *P. patens*, a to již na konci března (Kaplan *et al.*, 2019). Během května se vytvářejí asi 4 cm velké nažky s přívěskem (Skalický, 1988).



Obrázek č. 3: *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohémica* (foto Tomáš Urfus)

5.3.2 Ekologie

Nejčastěji roste na travnatých stráních, skalách a lesních okrajích (Skalický, 1988), případně i na písčínách a v rozvolněných světlých lesích (Pilt & Kukk, 2002). Vyskytuje se na suchých, minerálních, vápnatých či silikátových půdách (Skalický, 1988). Často roste i v okolí cest (Pilt & Kukk, 2002).

U *Pulsatilla pratensis* (a zároveň u všech druhů konikleců) se vyskytuje protogynie, proto převažuje cizosprašnost (Torvik *et al.*, 1998). Může docházet i k samoopylení, ale takto vzniklí jedinci pak produkují mnohem méně semen. Nejčastěji jako opylovači figurují čmeláci (*Bombus* sp. div.), ojediněle včely (*Apis* sp. div.) (Torvik *et al.*, 1998).

V přírodních podmínkách mají semena *P. pratensis* velmi nízkou klíčivost, pouze zhruba 3 % (Bochenková *et al.*, 2012). Nepotvrdil se negativní vliv na klíčivost při zvýšené koncentraci dusíku, zvýšené hustotě houbového mycelia ani jakýkoliv dopad při odstranění přívěsku z nažky. Zdá se, že se jedná o velmi kompetičně slabý druh a nejvíce mu škodí přerůstání konkurenceschopnějšími druhy a hromadění stařiny (Bochenková *et al.*, 2015). Proto se vysazování semen na lokality nejvíce jako efektivní postup při případné reintrodukcii (Bochenková *et al.*, 2012). Co by naopak mohlo pomoci při plánování managementu ochrany *P. pratensis*, je objev lehce pozitivního vlivu požárů tvorbou vyšší biomasy na simulovaných vypálených plochách (Kalamees *et al.*, 2012). Na kořenech se také prokázala arbuskulární mykorrhiza, a zároveň se potvrdil její stimulační efekt na růst semenáčků (Moora *et al.*, 2004).

5.3.3 Rozšíření a výskyt v ČR

Pulsatilla pratensis subsp. *bohemica* se vyskytuje pouze ve střední Evropě. V rámci České republiky je jeho výskyt oddělen do dvou areálů. První oblast výskytu je v severních, středních a východních Čechách, druhá pak na jižní Moravě (Skalický, 1988; www.pladias.cz) Těžiště výskytu se tak nachází v českém termofytiku a nejbližším mezofytiku. Nejvýše se nachází v suprakolinním výškovém stupni zhruba do 700 m (Skalický, 1988). Na jižní Moravě se vyskytuje v okolí Mohelna a Třebíče (www.prirodavysociny.cz). V severních Čechách roste především na Ústecku (Bultas & Kroufek, 2011), v Doupovských horách, kde se nachází i nejvýše položená lokalita na Humnickém vrchu, ve středním Poohří a v podhůří Krušných hor (www.kvmuz.cz). Ve středních Čechách se vyskytuje hned několik bohatých populací. Jedna z největších lokalit se nachází v Přírodní památce Na horách u Křešína v regionu Podbrsko (Hlaváček & Karlík, 2010). Další hojně populace se vyskytují v Českém krasu například v NPR Koda nad Kodsou stěnou a na stěnách Císařské rokle (Horáčková & Tichý, 2014), v NPP Zlatý kůň a NPP Kotýz v okolí Velkolomu Čertovy schody či jižně od PR Kobyla (vlastní pozorování).

5.4 *Pulsatilla patens*

5.4.1 Morfologie

Pulsatilla patens (L.) Mill. je jednodomá hemikryptofytní rostlina. Dorůstá průměrně 10 cm, za plodu až 45 cm (Skalický, 1988). Patří mezi vytrvalé druhy, někteří jedinci mohou být až několik desítek let staří. Má rozvětvený, ale vertikální kořen, a proto se vegetativní rozmnožování nevyskytuje, případně jen ve velmi malém množství (Wildeman & Steeves, 1982). Listy rostou v přízemní růžici nejčastěji po 2-5 a jsou trojsečné případně trojčetné s dlanitodílnými až dlanitosečnými úkrojky. Vytvářejí se ke konci kvetení, ale plně se rozvinou až po odkvětu (Wildeman & Steeves, 1982; Skalický, 1988). Každý rok jsou vytvářeny dva druhy pupenů, jeden převezme terminální funkci a později vykvete, zatímco druhý zůstane dormantní. Je to velmi efektivní přizpůsobení proměnlivým stepním podmínkám. V případě poškození vrcholového pupenu může neaktivní převzít funkci terminálního a vykvést (Wildeman & Steeves 1982). Chlupatý stonek nese jediný světle fialový, nálevkovitý květ většinou s 6 okvětními lístky (viz. Obrázek č. 4; Skalický, 1988). Rostliny zpravidla vytvářejí tři jednokvěté lodyhy. Avšak někteří jedinci jich vytvářejí až dvanáct (Juśkiewicz-Swaczyna, 2010). Kvete většinou od dubna do poloviny května. Poté se vytvářejí ochmýřené nažky (Skalický, 1988), která se sice šíří větrem, ale pouze na krátkou vzdálenost (u příbuzné *P. vulgaris* se zjistilo šíření pouze na zhruba 20 cm; Wells & Barling, 1971). Pokud je dostatek srážek a příznivá teplota, semena klíčí již během srpna. V případě nepříznivých podmínek klíčí až následující rok na jaře (Pilt & Kukuk, 2002). Vytváří pouze krátkodobou semennou banku (Pilt & Kukuk, 2002).



Obrázek č. 4: *Pulsatilla patens* (foto Tomáš Urfus)

5.4.2 Ekologie

Pulsatilla patens se vyskytuje v širokém spektru habitatů. Ve střední Evropě roste nejčastěji na sušších mírně svažitéch loukách orientovaných nejčastěji na severozápad (Kubát 1997). Ve Finsku nejčastěji v rozvolněných suchých borovicových lesích (Uotila, 1969; Kalliovirta *et al.*, 2006) či v Estonsku v teplých boreálních lesích s převahou *Vaccinium vitis-idaea* (Pilt & Kukk, 2002). Ojediněle může osidlovat i písčité půdy (Kubát, 1997; Pilt & Kukk, 2002). Velmi často se v současné době vyskytuje na okrajích lesů, mýtinách, v okolí cest a jiných člověkem pozmeněných místech (Uotila, 1969; Pilt & Kukk, 2002). Z četných pokusů vyplývá, že nejlepší místo pro růst *P. patens* jsou polozastíněné lokality s přerušovanou vrstvou mechu a opadu (Uotila, 1969; Pilt & Kukk, 2002; Kalamees *et al.*, 2005). Je to důležité zřejmě především pro semena, která v silnější vrstvě mechu nevyklíčí (Uotila, 1969). V nedávné studii se potvrdil výskyt ektomykorhizy na kořenech *P. patens* a byly identifikovány druhy hub, které jsou známé vytvářením mykorhizy s *Pinus sylvestris* (Hoeksema *et al.*, 2018).

5.4.3 Rozšíření a výskyt v ČR

V severní, střední a východní Evropě se vyskytuje *Pulsatilla patens* subsp. *patens* (Skalický, 1988). V České republice je v současné době zhruba 20 lokalit (Turoňová *et al.*, 2012). Je rozšířen v severních a západních Čechách s centrem výskytu v Doupovských horách (Kubát, 1997). V současné době jsou nejpočetnější dvě populace, první mezi Humnickým vrchem a vrchem Havran a druhá mezi vrchem Hůrka a Malešským kopcem. Dále jsou početné populace v Českém středohoří, menší se nacházejí

v Bělé pod Bezdězem či například na Hradčanských stěnách (Turoňová *et al.*, 2012). Izolovaná populace se vyskytuje jižně od Prahy u Líšnice (Skalický 1988; Kubát 1997; Turoňová *et al.*, 2012).

5.5 *Pulsatilla vernalis*

5.5.1 Morfologie

Pulsatilla vernalis (L.) Mill. (koniklec jarní) je asi 2-24 cm vysoká, vytrvalá bylina. Rostlina je celá bělavě či rezavě chlupatá (Skalický, 1988). Oddenek je vícečetný a hnědý, případně zelený. Listy jsou přezimující, což ho odlišuje od ostatních druhů (Aichele a Schwegler, 1957). Rostou v přízemní růžici po 3-10 a bývají kožovitého charakteru. Čepel je jednoduše lichozpeřená s jedním až dvěma, případně třemi jařmy. Lístky bývají trojlaločné někdy až trojsečné (Skalický, 1988). Vzpřímený stonek nese vždy jeden nálevkovitý květ. Šest okvětních lístků je zvnějšku růžových, načervenalých, případně nafialovělých. Vnitřní strana bývá bílá, lehce nažloutlá, méně často s nádechem do červena či fialova (viz. Obrázek č. 5; Aichele a Schwegler, 1957). Chlupaté čnělky mohou být růžové, karmínové i fialové. Okvětní lístky bývají přítomny až do úplné zralosti nažek (Skalický, 1988). Kvete od dubna do června (Kaplan *et al.*, 2019)

Na území České republiky bývají odlišovány dvě variety (Skalický, 1988), a to horská *Pulsatilla vernalis* var. *alpestris* a nížinná *Pulsatilla vernalis* var. *vernalis* (Aichele a Schwegler, 1957). Nejsou morfologicky plně oddělené, vytváří spíše kontinuum přechodných typů. Obecně má *P. v.* var. *vernalis* vyšší stonek (asi 5-24 cm), delší řapík (až 15 cm), větší vzdálenost jařem (více než 12,5 mm) a celkově větší listy než *P. v.* var. *alpestris* (Skalický, 1988)



Obrázek č. 5: *Pulsatilla vernalis* (převzato z Grzyl & Ronikier, 2011)

5.5.2 Ekologie

Pulsatilla vernalis var. *vernalis* nalezneme v suprakolinním stupni (Skalický, 1988). Vyskytuje se v řídkých borových či březových lesích, vřesovištích, ale nejčastěji na pastvinách s nejrůznějšími malými keři (Aichele a Schwegler, 1957). Roste na chudých, suchých a písčitých půdách. Toleruje velmi nízké pH, běžně i hodnoty pod pH 5 (Grzyl *et al.*, 2013). Vyhledává světlá místa v rámci teplého střeoevropského klimatu (Skalický, 1988). Naopak *P. v.* var. *alpestris* je vázána na chladné klima a půdy bohatší na živiny. Vyskytuje se v rámci travinných subalpínských společenstev v karových údolích (Skalický, 1988).

V nížinách jsou jedním z posledních útočišť *P. vernalis* okraje lesních cest. Tyto mikrohabitaty se vyznačují vyšší mírou osvětlenosti, vyšší disturbancí, nižší kompeticí a slabší vrstvou mechu (Zielińska *et al.*, 2016). Dlouhodobá pozorování ukazují, že se jedná o kompetičně velmi slabou rostlinu, vyžadující specifické podmínky. Jako nejdůležitější faktory pro růst a kvetení se ukázaly deštivé jarní dny, naopak slunný a suchý duben a květen a stálé teploty. Pro klíčení semen se jako nejdůležitější podmínka ukázaly dostatečné srážky během srpna (Grzyl *et al.*, 2014).

5.5.3 Rozšíření a výskyt v ČR

Pulsatilla vernalis se vyskytuje pouze v Evropě. Areál rozšíření je od Pyrenejí, přes Alpy, Karpaty až po část skandinávských pohoří (Aichele a Schwegler, 1957). Nížinné populace se vyskytují ve střední Evropě, Dánsku, Švédsku, Norsku a Finsku (Ronikier *et al.*, 2008). Na základě výsledků genetických studií se předpokládá, že nížinné populace přečkaly poslední glaciál ve střední Evropě, a poté se rozšířily dále na sever. Rozdílné haplotypy v západní a východní Skandinávii ukazují na dvě odlišná centra kolonizace (Ronikier *et al.*, 2008).

Téměř všechny populace postupně mizí. Například v Polsku bylo v roce 2011 nalezeno pouze 29 z původních 189 lokalit. Z toho pouze na dvou z nich rostlo více než sto jedinců (Grzyl & Ronikier, 2011). V Německu zůstalo pouze devět posledních lokalit. Na všech se zpětně vysazují semenáčky, které byly vypěstované v laboratoři. Zdá se, že v místních podmínkách je to efektivní metoda, jelikož počet jedinců stoupl z 290 na 1368 během třinácti let (Betz *et al.*, 2013). V České republice se *P. v.* var. *vernalis* vyskytovala na Plzeňsku, Mladoboleslavsku, Českobudějovicku a Třeboňsku. Nicméně všude tento druh vyhynul a dnes je známa pouze poslední lokalita v Bělé pod Bezdězem. Další populace sterilních jedinců se nachází na Kozím vršku u Vlkova, ale ta je výsledkem pokusu o reintrodukcii. Další plánovaná obnova původní populace se zde uskuteční v nejbližších letech (Prach *et al.*, 2020).

Pulsatilla vernalis var. *alpestris* se v současné době vyskytuje pouze v Čertově zahrádce v Obřím dole v Krkonoších. I zde několikrát proběhly nepříliš úspěšné pokusy o reintrodukcii a posílení původních populací (Zahradníková & Harčariková, 2012). Lokalita ve Velké kotlině v Hrubém Jeseníku recentně zanikla, zřejmě kvůli nadměrnému sběru (Bureš, 2018).

6 Ohrožení a ochrana vybraných druhů konikleců

Podle IUCN jsou *Pulsatilla patens* a obě variety *P. vernalis* zařazeny do kategorie kriticky ohrožených druhů. *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* patří mezi zranitelné druhy (Grulich, 2017). V Červeném seznamu ohrožených druhů České republiky je *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* vedena jako silně ohrožená, *P. patens* a *P. vernalis* se řadí již mezi kriticky ohrožené (Grulich, 2017). Všechny druhy jsou také chráněné vyhláškou Ministerstva životního prostředí 395/1992 Sb. Největší míra ochrany se dostává *P. patens*, jelikož se řadí do soustavy Natura 2000 v České republice (Rybka *et al.*, 2004) a zároveň je na mezinárodní úrovni chráněna Přílohou I. Bernské úmluvy a směrnicí o stanovištích 92/43/EHS, v příloze II. Navíc Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky vypracovala pro *Pulsatilla patens* speciální záchranný program (Ondráček & Blažejová, 2020).

Pulsatilla pratensis subsp. *bohemica* patří mezi relativně hojné zástupce rodu *Pulsatilla* na našem území. I když některé lokality zcela zmizely a na jiných se počty jedinců výrazně snižují, nehrozí jí pravděpodobně akutní ohrožení. Například jen na Ústecku bylo nalezeno 60 lokalit (Bultas & Kroufek, 2011). Nejčastějším problémem je zarůstání lokalit, kvůli přerušené pastvě a sečení. Proto byla v Českém krasu od roku 2005 obnovena pastva pomocí stáda ovcí a koz. Potvrdil se pozitivní vliv na růst rostlin, jelikož na pasených plochách vzrostla druhová diverzita a zároveň se populace stabilizovaly (Mayerová *et al.*, 2014). Také se prokázal kladný vliv pastvy při napadení konikleců houbou *Puccinia pulsatillae*. Na pasených územích se vykytovalo méně napadených jedinců a houba se mezi konikleci tolik nešířila (Wennström & Ericson, 1991).

Jako nejčastější důvody úbytku *P. patens* bývají uváděny změny v managementu krajiny, přerušení pastvy a pravidelného sečení, a tím způsobené zarůstání lokalit. Dalším problémem je okus zvířaty, i přesto, že se jedná o jedovatou rostlinu (Kubát, 1997; Juśkiewicz-Swaczyna, 2010). Také zákaz vypalování má pravděpodobně negativní dopad na populace, jelikož v minulosti byly pravidelné požáry běžnou disturbancí (Kalamees *et al.*, 2005). Při pokusech byl potvrzen pozitivní vliv požárů na růst *P. patens* (Kalamees *et al.*, 2005) a i v přírodě se nejvíce kvetoucích jedinců vyskytovalo na místech po nedávných požárech (Wildeman a Steeves, 1982). Jedná se o velmi dekorativní a poměrně oblíbenou rostlinu, takže i vyrývání a přesazování lidmi do zahrad může způsobit problémy hlavně méně

početným populacím (Kubát, 1997; Pilt & Kukk 2002). Ve stále se zmenšujících populacích může být velkým nebezpečím genetický drift vedoucí k „inbreedingu“ a vyššímu podílu homozygotů (Reed & Frankham, 2003). U 29 populací *P. patens* z celého evropského areálu se skutečně potvrdila nízká diverzita genomu a vysoké zastoupení homozygotů. Může to být jedna z příčin pozorované nízké fitness a malého počtu kvetoucích jedinců (Szczecińska *et al.*, 2016).

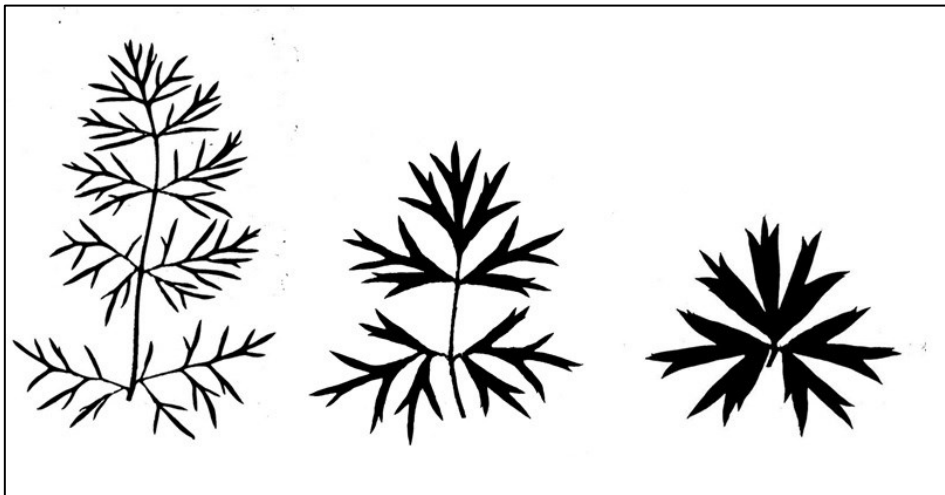
Zatímco horské populace *P. vernalis* se zdají být relativně hojné a stabilní (Grzyl & Ronikier 2011), nížinné v posledních desetiletích velmi rychle mizí (Grzyl & Ronikier, 2011; Betz *et al.*, 2013; Prach *et al.*, 2020). Mezi největší hrozby patří eutrofizace prostředí, a díky tomu šíření konkurenceschopnějších druhů. Dalším problémem je neefektivní disperze semen, díky čemuž se populace vyskytují pouze na malých a omezených lokalitách. Jelikož se zdá, že je *P. vernalis* závislá na velmi specifických klimatických podmínkách, postupující globální oteplování bude zřejmě velkou hrozbou (Grzyl *et al.*, 2014). I zarůstání a celková degradace na místech původního výskytu způsobuje zánik populací (Grzyl & Ronikier, 2011). Proto se v posledních letech zkouší nejrůznější typy managementu jako například odstraňování náletových dřevin a keřů, pasení ovcí a koz či kontrolované požáry (Sandström *et al.*, 2017). Případně se původní populace přímo posilují semenáčky vypěstovanými v laboratoři a vysazenými zpět na lokality (Betz *et al.*, 2013).

7 Mezidruhová hybridizace v rámci rodu *Pulsatilla*

Hybridizace je v rámci rodu *Pulsatilla* velmi běžná. Reprodukční bariéry jsou slabé, případně neexistují vůbec (Lindell, 1998). Díky tomu lze očekávat hybridy v téměř každé sympatrické populaci dvou druhů konikleců (Aichele & Schwegler, 1957). Častěji se objevuje mezi diploidními druhy. U tetraploidních druhů ke křížení dochází jen vzácně, nicméně v laboratorních podmínkách byla pozorována celkem běžně (Lindel, 1998). Velká míra křížení je popisována ze Slovenska, kde probíhá introgresivní hybridizace mezi druhy *P. grandis*, *P. subslavica* a *P. slavica*, a zároveň mezi *P. hungarica* a *P. zimmermannii* v oblasti Východoslovenské nížiny (Futák, 1982).

V rámci České republiky jsou popisovány tři hybridní kombinace, a to *Pulsatilla* × *mixta* Halácsy, *P. × celakovskyana* Domin a nejběžnější *P. × hackelii* Pohl (Skalický, 1988; Danihelka *et al.*, 2012); Kaplan *et al.*, 2019). U *Pulsatilla* × *mixta* jsou jako rodičovské druhy uváděny *P. grandis* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Zřejmě se jedná o sterilního triploidního hybridu, který je udáván pouze z několika málo lokalit v okolí Brna a Vyškova (Skalický, 1988). *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* vytváří s *P. vernalis* var. *vernalis* hybridu pojmenovaného *Pulastilla* × *celakovskyana*. Měl se vyskytovat pouze na jedné lokalitě u Bělé pod Bezdězem, ale již roku 1979 tam nebyl nalezen (Skalický, 1988). Posledním

a nejhojnějším hybridem je *P. × hackelii*, který vznikl křížením *P. pratensis* subsp. *bohemica* a *P. patens*. Vyznačuje se intermediárním fenotypem obou rodičovských druhů, nicméně se udává velká variabilita znaků (Čelakovský, 1865). Jako odlišovací znaky bývají uvedeny zkrácené větveno mezi jařmy na listech (viz. Obrázek č. 6; Skalický, 1988; Krejčová, 2014) a červenofialová barva květů, které jsou jen mírně skloněné (Čelakovský, 1865). Předpokládá se, že jsou hybridy sterilní (Skalický, 1988), ale zároveň se objevuje domněnka, že mohou být plodní a schopní se zpětně křížit s rodiči (Uotila, 1969). Historicky je udáván ze zhruba 15 lokalit v České republice (Skalický, 1988). Uvádí se i na Slovensku (Futák, 1982) a byl potvrzen i v Polsku (Szczećińska *et al.*, 2017).



Obrázek č. 6: Porovnání listů *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* (vlevo), *P. patens* (vpravo) a jejich hybridu *P. × hackelii* (uprostřed) (převzato z Krejčová, 2014).

Pro spolehlivé určení hybridů je nutné využít genetické metody. Rodičovské druhy se liší ve velikosti genomu. Pro *P. pratensis* subsp. *bohemica* byla velikost genomu stanovena na $2C = 13.80$ pg, pro *P. patens* na $2C = 11.78$ pg a pro hybridní jedince $2C = 12.63$ pg (Krejčová, 2014; Szczećińska *et al.*, 2017). To je dostatečný rozdíl pro využití průtokové cytometrie. Hybridy tvořili pouze zhruba 3 % z celkového počtu analyzovaných vzorků. Navíc analýza životaschopnosti semen prokázala pouze průměrnou hodnotu 29 % (Krejčová, 2014). V nedávné studii byla osekvenována chloroplastová DNA *P. × hackelii*. Prokázala se bližší shoda s *P. pratensis*, z čehož vyplývá, že figuruje jako mateřská rostlina, zatímco *P. patens* jako poskytovatel pylu (Szczećińska *et al.*, 2017).

Pulsatilla × hackelii byla recentně potvrzena pouze ze čtyř lokalit v České republice. Všechny se nachází v sympatrickém areálu rodičovských druhů. Největší počet hybridních jedinců byl určen na Humnickém vrchu v Doupovských horách, dále na Křížové hoře a vrchu Hradiště v Českém středohoří a jeden exemplář v Bělé pod Bezdězem (Krejčová, 2014). Vzhledem k malému procentuálnímu zastoupení primárních hybridů a nízké životaschopnosti semen zřejmě mezidruhovému křížení nepředstavuje bezprostřední nebezpečí pro rodičovské druhy.

8 Závěr

Mezidruhová hybridizace je v rostlinné říši velmi rozšířený jev. Je považována za mechanismus, díky kterému vznikají nové adaptace a urychluje tak vznik nových druhů (Anderson & Stebbins, 1954). Nicméně většina hybridů bývá slabých a má nízkou životaschopnost. Proto si rostliny vytvořily reprodukční bariéry, aby hybridizaci co nejvíce eliminovaly. Ty mohou být prezygotické a postzygotické podle toho, v jaké fázi vývoje se nacházejí. Zdá se, že prezygotické bariéry, mezi které řadíme např. odlišný habitat či rozdíly ve fenologii, hrají větší roli ve snížení pravděpodobnosti vzájemné hybridizace (Pickup *et al.*, 2019). Pokud bariéry vytvořené nejsou, může docházet ke křížení. V případě, že jsou hybridy navíc fertily, mohou se zpětně křížit s rodiči. To může být velký problém pro vzácné a ohrožené druhy, pokud se kříží s konkurenceschopnějším příbuzným druhem, jelikož se v přírodě ztrácí jejich unikátní genofond. I sterilní hybridy představují riziko, protože s rodiči soutěží o zdroje. Vzácný druh se tak vyčerpá tvorbou hybridních jedinců a může zcela vymizet (Todesco *et al.*, 2016). Nicméně ze současných studií vyplývá, že většina druhů, i těch vzácných, má nějakou formu bariér vytvořenou a jsou tak relativně odolní proti mezidruhové hybridizaci.

Z české flóry mohou být potenciálně ohrožené mezidruhovou hybridizací například druhy z rodu *Pulsatilla*. V České republice se nachází pět druhů konikleců, z čehož se mezidruhového křížení účastní druhy *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica*, *P. patens*, *P. vernalis* a *P. grandis*. První jmenovaný je z této čtveřice nejrozšířenější a zároveň figuruje jako jeden z rodičů ve všech třech popsanych hybridních kombinacích. Nejběžnějším hybridem je *P. × hackelii*, který vzniká křížením *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* a *P. patens* (Skalický, 1988). V současné době byl zaznamenán jen na čtyřech lokalitách. Největší procentuální zastoupení *P. × hackelii* tvořilo 30 %, nicméně absolutní počet hybridních jedinců na dané lokalitě byl pouze čtyři (Krejčová, 2014). To značí celkovou malou velikost sympatrické populace. Existují domněnky, že je *P. × hackelii* fertily a je schopen zpětného křížení s rodičovskými druhy, ale dosud nebyly provedené žádné konkrétní studie. Riziko zpětné hybridizace se tak stále spolehlivě nevyvrátilo. Naskýtá se tak prostor pro nové výzkumy a experimenty.

Populace konikleců prudce klesají na našem území i po celé Evropě. Jako největší rizika se uvádí změna managementu, a s tím spojené zarůstání lokalit (Kubát, 1997; Pilt & Kukk, 2002; Grzyl & Ronikier, 2011). Velmi znepokojivý je fakt, že i když jsou koniklece chráněné v podstatě po celé Evropě a bylo vynaloženo značné úsilí na jejich záchranu, populace přesto mizí. Zároveň některé formy obhospodařování na některých místech fungují, ale na jiných nikoliv. Příkladem by mohla být úspěšná reintrodukce konikleců v Německu (Betz *et al.*, 2013), zatímco na českých lokalitách se dosud nikdy nepodařila (Prach *et al.*, 2020). Jedná se tak o značně choulostivé druhy, u kterých zřejmě neznáme všechny aspekty jejich úbytku, ale ani úspěšného přežití. Pokud by navíc v současných izolovaných

populacích docházelo ve větší míře k mezidruhovému křížení, mohlo by to znamenat další riziko pro jejich ochranu. Proto by se měla hybridizaci konikleců dále věnovat pozornost, aby se případně mohly podniknout kroky pro eliminaci.

Ve své navazující magisterské práci, bych ráda pomocí průtokové cytometrie zjistila současné zastoupení *P. × hackelii* v sympatrických rodičovských populacích. Dále bych ráda pomocí experimentálního křížení potvrdila či případně vyvrátila fertilitu hybridů a jejich schopnost zpětného křížení. Také bych se chtěla zaměřit na dva zbývající popsané hybridní druhy a ověřit, zda na našem území stále rostou či nikoliv, jelikož se mi nepodařilo dohledat žádnou současnou studii o jejich výskytu.

9 Literatura

- ABBOTT, J., IRWIN, J.A. & COMES, H.P. (2000) Hybrid origin of the Oxford Ragwort, *Senecio squalidus* L. *Watsonia* **23**, 123–138.
- ABBOTT, R.J., HEGARTY, M.J., HISCOCK, S.J. & BRENNAN, A.C. (2010) Homoploid hybrid speciation in action. *Taxon* **59**, 1375–1386.
- AERTS, R., BERECHA, G., GIJBELS, P., HUNDERA, K., GLABEKE, S.V., VANDEPITTE, K., MUYS, B., ROLDÁN-RUIZ, I. & HONNAY, O. (2013) Genetic variation and risks of introgression in the wild *Coffea arabica* gene pool in south-western Ethiopian montane rainforests. *Evolutionary Applications* **6**, 243–252.
- AICHELE, D. & SCHWEGLER, H.-W. (1957) Die Taxonomie der Gattung *Pulsatilla*. *Repertorium novarum specierum regni vegetabilis* **60**, 1–230.
- ANDERSON, E. & HUBRICHT, L. (1938) Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *American Journal of Botany* **25**, 396–402.
- ANDERSON, E. & STEBBINS, G.L. (1954) Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* **8**, 378–388.
- ANTHONY, F., COMBES, M., ASTORGA, C., BERTRAND, B., GRAZIOSI, G. & LASHERMES, P. (2002) The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 894–900.
- ARRIGO, N., GUADAGNUOLO, R., LAPPE, S., PASCHE, S., PARISOD, C. & FELBER, F. (2011) Gene flow between wheat and wild relatives: empirical evidence from *Aegilops geniculata*, *Ae. neglecta* and *Ae. triuncialis*. *Evolutionary Applications* **4**, 685–695.
- BARAĆ, G., OGNJANOV, V., VIDAKOVIĆ, D.O., DORIĆ, D., LJUBOJEVIĆ, M., DULIĆ, J., MIOBRAGOVIĆ, M. & GAŠIĆ, K. (2017) Genetic diversity and population structure of European ground cherry (*Prunus fruticosa* Pall.) using SSR markers. *Scientia Horticulturae* **224**, 374–383.
- BARTON, N.H. & HEWITT, G.M. (1985) Analysis of Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**, 113–148.
- BARTSCH, D. (2010) Gene Flow in Sugar Beet. *Sugar Tech* **12**, 201–206.
- BETZ, C., SCHEUERER, M. & REISCH, C. (2013) Population reinforcement – A glimmer of hope for the conservation of the highly endangered Spring Pasque flower (*Pulsatilla vernalis*). *Biological Conservation* **168**, 161–167.
- BOCHENKOVÁ, M., HEJCMAN, M. & KARLÍK, P. (2012) Effect of plant community on recruitment of *Pulsatilla pratensis* in dry grassland. *Scientia Agriculturae Bohemica* **43**, 127–133.
- BOCHENKOVÁ, M., HEJCMAN, M. & KARLÍK, P. (2015) Effect of nitrogen, appendage removal, locality, and year on seed germination of the endangered dry grassland species *Pulsatilla pratensis* (L.) Mill. *Propagation of Ornamental Plants* **15**, 154–162.
- BORSCH, T., HILU, K.W., WIERSEMA, J.H., LÖHNE, C., BARTHLOTT, W. & WILDE, V. (2007) Phylogeny of *Nymphaea* (*Nymphaeaceae*): Evidence from substitutions and microstructural changes in the chloroplast *trnT* - *trnF* region. *International Journal of Plant Sciences* **168**, 639–671.
- BROCHMANN, C., BRYSTING, A. & ALSOS, I. (2004) Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**, 521–536.

- BUERKLE, C.A. & RIESEBERG, L.H. (2008) The rate of genome stabilization in homoploid hybrid species. *Evolution* **62**, 266–275.
- BULTAS, P. & KROUFEK, R. (2011) Aktuální rozšíření koniklece lučního českého (*Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* Skalický) na Ústecku. *Severočeskou Přírodou* **42**, 1-5
- BUREŠ, L. (2018) Fenomén Velká kotlina 5. Cévnaté rostliny. *Živa* **6**, 302–306.
- ČECH, L., EKRT, L., EKRTOVÁ, E., JELÍNKOVÁ, J. & JUŘIČKA J. [ed.] (2017) *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* Skalický-koniklece luční český v Kraji Vysočina. [online] *Pobočka ČSO na Vysočině* [Cit. 13. dubna 2021]
Dostupné z: <http://www.prirodavysociny.cz/cs/druhy/957/koniklece-lucni-cesky>
- ČELAKOVSKÝ, L.J. (1865) Ist *Pulsatilla hackelii* Pohl ein bastard? *Lotos* **15**, 8–11.
- CHAPMAN, M.A. & BURKE, J.M. (2006) Letting the gene out of the bottle: the population genetics of genetically modified crops. *New Phytologist* **170**, 429–443.
- CHAPMAN, M.A. & BURKE, J.M. (2007) Genetic divergence and hybrid speciation. *Evolution* **61**, 1773–1780.
- CHEN, L.J. (2004) Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. *Annals of Botany* **93**, 67–73.
- CRUTZEN, P.J. (2006) The “Anthropocene”. In *Earth System Science in the Anthropocene* (ed E. EHLERS & T. KRAFFT), str. 13–18. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- DAÏNOU, K., FLOT, J.-F., DEGEN, B., BLANC-JOLIVET, C., DOUCET, J.-L., LASSOIS, L. & HARDY, O.J. (2017) DNA taxonomy in the timber genus *Milicia*: evidence of unidirectional introgression in the West African contact zone. *Tree Genetics & Genomes* **13**, 90-101.
- DANIHELKA, J., CHRTEK JR., J. & KAPLAN, Z. (2012) Checklist of vascular plants of the Czech Republic. *Preslia* **84**, 647–811.
- DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J. & SUDA, J. (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* **2**, 2233–2244.
- EJANKOWSKI, W. & MAŁYSZ, B. (2011) Morphological variability of the water lily (*Nymphaea*) in the Polesie Zachodnie region, Eastern Poland. *Biologia* **66**, 604-609.
- ELLSTRAND, N.C. & ELAM, D.R. (1993) Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**, 217–242.
- ELLSTRAND, N.C., MEIRMANS, P., RONG, J., BARTSCH, D., GHOSH, A., DE JONG, T.J., HACCOU, P., LU, B.-R., SNOW, A.A., NEAL STEWART, C., STRASBURG, J.L., VAN TIENDEREN, P.H., VRIELING, K. & HOOFTMAN, D. (2013) Introgression of crop alleles into wild or weedy populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **44**, 325–345.
- ELLSTRAND, N.C., PRENTICE, H.C. & HANCOCK, J.F. (1999) Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics* **30**, 539–563.
- ELLSTRAND, N.C., WHITKUS, R. & RIESEBERG, L.H. (1996) Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 5090–5093.

- EVROPSKÉ SPOLEČENSTVÍ (2004) Směrnice Rady 92/43/EHS ze dne 21. května 1992 o ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (Příloha II) [online]. [Cit. 25. dubna 2021] Dostupné z: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1992:206:0007:0050:EN:PDF>
- FEHRER, J., KRAK, K. & CHRTEK, J. (2009) Intra-individual polymorphism in diploid and apomictic polyploid hawkweeds (*Hieracium*, *Lactuceae*, *Asteraceae*): disentangling phylogenetic signal, reticulation, and noise. *BMC Evolutionary Biology* **9**, 239-262.
- FIELD, D.L., AYRE, D.J., WHELAN, R.J. & YOUNG, A.G. (2011) Patterns of hybridization and asymmetrical gene flow in hybrid zones of the rare *Eucalyptus aggregata* and common *E. rubida*. *Heredity* **106**, 841–853.
- FUTÁK, J. (1982) *Pulsatilla* Mill – poniklec – In: BERTOVÁ, L., FUTÁK, J., HLAVAČEK, A., HOSTIČKA, M., CHRTEK, J., JASIČOVÁ, M., KMEŤOVÁ, E., KŘÍSA, B., OSVAČILOVÁ, V., ZAHRADNÍKOVÁ, K., ZELENÝ, V. *Flóra Slovenska III*. [online] s. 110-138, Veda, Bratislava ISBN 71-060-82 Dostupné z: <https://bibdigital.rjb.csic.es/viewer/15087/?offset=#page=2&viewer=picture&o=bookmark&n=0&q=>
- GRIMM, G.W. & DENK, T. (2008) ITS Evolution in *Platanus* (*Platanaceae*): homoeologues, pseudogenes and ancient hybridization. *Annals of Botany* **101**, 403–419.
- GRULICH, V. (2017) Červený seznam cévnatých rostlin ČR. *Příroda* **35**, 75-132.
- GRZYL, A., KIEDRZYŃSKI, M., ZIELIŃSKA, K.M. & REWICZ, A. (2014) The relationship between climatic conditions and generative reproduction of a lowland population of *Pulsatilla vernalis*: the last breath of a relict plant or a fluctuating cycle of regeneration? *Plant Ecology* **215**, 457–466.
- GRZYL, A., NIEWIADOMSKI, A. & WOZIWODA, B. (2013) Soil environment of *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. at selected sites in the Polish lowland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **82**, 267–273.
- GRZYL, A. & RONIĘK, M. (2011) *Pulsatilla vernalis* (*Ranunculaceae*) in the polish lowlands: current population resources of a declining species. *Polish Botanical Journal*, **56**, 185-194.
- HAJJAR, R. & HODGKIN, T. (2007) The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica* **156**, 1–13.
- HANZL, M., KOLÁŘ, F., NOVÁKOVÁ, D., & SUDA, J. (2014). Nonadaptive processes governing early stages of polyploid evolution: Insights from a primary contact zone of relict serpentine *Knautia arvensis* (*Caprifoliaceae*). *American Journal of Botany*, **101**, 935–945.
- HARDY, O.J., VANDERHOEVEN, S., LOOSE, M.D. & MEERTS, P. (2000) Ecological, morphological and allozymic differentiation between diploid and tetraploid knapweeds (*Centaurea jacea*) from a contact zone in the Belgian Ardennes. *New Phytologist* **146**, 281–290.
- HARRISON, R.G. & LARSON, E.L. (2016) Heterogeneous genome divergence, differential introgression, and the origin and structure of hybrid zones. *Molecular ecology* **25**, 2454–2466.
- HLAVAČEK, R. & KARLÍK, P. (2010) Příspěvek k poznání flóry a vegetace PP Na horách a poznámky k teplomilné květeně Podbrdská. *Bohemia centralis* **30**, 193–250.
- HOEKSEMA, J., ROY, M., ŁASKA, G., SIENKIEWICZ, A., HORNING, A., ABBOTT, M.J., TRAN, C. & MATTOX, J. (2018) *Pulsatilla patens* (*Ranunculaceae*), a perennial herb, is ectomycorrhizal in northeastern

- Poland and likely shares ectomycorrhizal fungi with *Pinus sylvestris*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **87**, 3572–3585.
- HOOT, S.B., MEYER, K.M. & MANNING, J.C. (2012) Phylogeny and reclassification of *Anemone* (*Ranunculaceae*), with an emphasis on austral species. *Systematic Botany* **37**, 139–152.
- HORÁČKOVÁ, J. & TICHÝ, T. (2014) Květena a vegetace národní přírodní rezervace Koda v Českém krasu. *Bohemia centralis* **32**, 51–154.
- JONES, D.F. (1917) Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis. *Genetics* **2**, 466–479.
- JONSSON, O., ROSQUIST, G. & WIDEN, B. (1991) Operation of dichogamy and herkogamy in five taxa of *Pulsatilla*. *Ecography* **14**, 260–271.
- JUŚKIEWICZ-SWACZYNA, B. (2010) Distribution and abundance of *Pulsatilla Patens* populations in nature reserves in north-eastern Poland. *Polish Journal of Natural Science* **25**, 376–386.
- KABÁTOVÁ, K., VÍT, P. & SUDA, J. (2014) Species boundaries and hybridization in central-European *Nymphaea* species inferred from genome size and morphometric data. *Preslia* **86**, 131–154.
- KALAMEES, R., PÜSSA, K., TAMM, S. & ZOBEL, K. (2012) Adaptation to boreal forest wildfire in herbs: Responses to post-fire environmental cues in two *Pulsatilla* species. *Acta Oecologica* **38**, 1–7.
- KALAMEES, R., PÜSSA, K., VANHA-MAJAMAA, I. & ZOBEL, K. (2005) The effects of fire and stand age on seedling establishment of *Pulsatilla patens* in a pine-dominated boreal forest. *Canadian Journal of Botany* **83**, 688–693.
- KALLIOVIRTA, M., RYTTÄRI, T. & HEIKKINEN, R.K. (2006) Population structure of a threatened plant, *Pulsatilla patens*, in boreal forests: modelling relationships to overgrowth and site closure. *Biodiversity and Conservation* **15**, 3095–3108.
- KAPLAN, Z., DANIHELKA J., CHRTEK J. jun., KIRSCHNER J., KUBÁT K., ŠTECH M. & ŠTĚPÁNEK J. (ed) (2019): *Klíč ke květeně České republiky [Key to the flora of the Czech Republic]*. Ed. 2 – s. 1168, Academia, Praha. ISBN 978-80-200-2660-6
- KARPECHENKO, G.D. (1927) The production of polyploid gametes in hybrids. *Hereditas* **9**, 349–368.
- KAY, K.M. (2006) Reproductive isolation between two closely related hummingbird pollinated neotropical gingers. *Evolution* **60**, 538–552.
- KNOBLOCH, I.W. (1972) Intergeneric hybridization in flowering plants. *Taxon* **21**, 97–103.
- KOO, D.-H., JUGULAM, M., PUTTA, K., CUVACA, I.B., PETERSON, D.E., CURRIE, R.S., FRIEBE, B. & GILL, B.S. (2018) Gene duplication and aneuploidy trigger rapid evolution of herbicide resistance in common waterhemp. *Plant Physiology* **176**, 1932–1938.
- KRAHULCOVÁ, A., KRAHULEC, F. & KIRSCHNER, J. (1996) Introgressive hybridization between a native and an introduced species: *Viola lutea* subsp. *sudetica* versus *V. tricolor*. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* **31**, 219–244.
- KREJČOVÁ, N. (2011) Mezidruhová hybridizace mezi *Pulsatilla patens* a *P. pratensis* – význam pro druhovou ochranu: bakalářská práce. Praha: UK 38 s., vedoucí práce Jan Suda

- KREJČOVÁ, N. (2014) Hybridizace mezi *Pulsatilla pratensis* a *P. patens*? Skutečnost nebo mýtus?: diplomová práce. Praha: UK 106 s., vedoucí práce Jan Suda
- KRON, P., SUDA, J. & HUSBAND, B.C. (2007) Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **38**, 847–876.
- KUBÁT, K. (1997) *Pulsatilla patens* (L.) Mill. v České republice. *Severočeskou Přírodou* **30**, 5-10
- LATTA, R.G. & MITTON, J.B. (1999) Historical separation and present gene flow through a zone of secondary contact in ponderosa pine. *Evolution* **53**, 769-776.
- LEVIN, D.A. (2002) Hybridization and extinction: in protecting rare species, conservationists should consider the dangers of interbreeding, which compound the more well-known threats to wildlife. *American Scientist* **90**, 254–261.
- LEVIN, D.A., FRANCISCO-ORTEGA, J. & JANSEN, R.K. (1996) Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology* **10**, 10–16.
- LI, Q., SU, N., ZHANG, L., TONG, R., ZHANG, X., WANG, J., CHANG, Z., ZHAO, L. & POTTER, D. (2020) Elucidate diversity, phylogeny, and taxonomy of *Pulsatilla* (*Ranunculaceae*). *Scientific Reports* **10**, 1–12.
- LIAO, W.-J., ZHU, B.-R., LI, Y.-F., LI, X.-M., ZENG, Y.-F. & ZHANG, D.-Y. (2019) A comparison of reproductive isolation between two closely related oak species in zones of recent and ancient secondary contact. *BMC Evolutionary Biology* **19**, 70-80.
- LIEBST, B. & SCHNELLER, J. (2005) How selfing and intra- and interspecific crossing influence seed set, morphology and ploidy level in *Euphrasia*: An experimental study of species occurring in the Alps of Switzerland. *Plant Systematics and Evolution* **255**, 193–214.
- LINDELL, T. (1998) Breeding systems and crossing experiments in *Anemone patens* and in the *Anemome pulsatilla* group (*Ranunculaceae*). *Nordic Journal of Botany* **18**, 549–561.
- LOUREIRO, J., TRÁVNÍČEK, P., RAUCHOVÁ, J., URFUS, T., VÍT, P., ŠTECH, M., CASTRO, S. & SUDA, J. (2010) The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia* **82**, 3–21.
- LU, B., YANG, X. & ELLSTRAND, N.C. (2016) Fitness correlates of crop transgene flow into weedy populations: a case study of weedy rice in China and other examples. *Evolutionary Applications* **9**, 857–870.
- MACKOVÁ, L., VÍT, P. & URFUS, T. (2018) Crop-to-wild hybridization in cherries-Empirical evidence from *Prunus fruticosa*. *Evolutionary Applications* **11**, 1748–1759.
- MALLET, J. (2007) Hybrid speciation. *Nature* **446**, 279–283.
- MARTINSEN, G.D., WHITHAM, T.G., TUREK, R.J. & KEIM, P. (2001) Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution* **55**, 1325–1335.
- MATĚJŮ, K. Naše koniklece [online] *Muzeum Karlovy Vary* [cit. 14. dubna 2021]
Dostupné z: <http://kvmuz.cz/typ/priroda-karlovarska/nase-koniklece>

- MAYEROVÁ, H., TICHÝ, T., HEŘMAN, P. & MÜNZBERGOVÁ, Z. (2014) Pastevní management suchých trávníků v CHKO Český kras – zachování a obnova druhově bohatých společenstev. *Bohemia centralis* **32**, 395–406.
- MOORA, M., OPIK, M., SEN, R. & ZOBEL, M. (2004) Native arbuscular mycorrhizal fungal communities differentially influence the seedling performance of rare and common *Pulsatilla* species. *Functional Ecology* **18**, 554–562.
- MÖTLEP, M., ILVES, A., TALI, K., SILD, E. & KULL, T. (2021) Artificial crossing and pollen tracking reveal new evidence of hybridization between sympatric *Platanthera* species. *Plant Systematics and Evolution* **307**, 25–40.
- NICOLAS, S.D., MONOD, H., EBER, F., CHÈVRE, A.-M. & JENCZEWSKI, E. (2012) Non-random distribution of extensive chromosome rearrangements in *Brassica napus* depends on genome organization: Meiosis drives non random rearrangements. *The Plant Journal* **70**, 691–703.
- NICOLÈ, F., TELLIER, F., VIVAT, A. & TILL-BOTTRAUD, I. (2007) Conservation unit status inferred for plants by combining interspecific crosses and AFLP. *Conservation Genetics* **8**, 1273–1285.
- OARD, J., COHN, M.A., LINSCOMBE, S., GEALY, D. & GRAVOIS, K. (2000) Field evaluation of seed production, shattering, and dormancy in hybrid populations of transgenic rice (*Oryza sativa*) and the weed, red rice (*Oryza sativa*). *Plant Science* **157**, 13–22.
- OLŠAVSKÁ, K. & LÖSER, C.J. (2013) Mating system and hybridization of the *Cyanus triumfetti* and *C. montanus* Groups (Asteraceae). *Folia Geobotanica* **48**, 537–554.
- Ondráček, Č. & Blažejová, E. (2020) Záchraný program pro koniklec otevřený (*Pulsatilla patens*) v České republice [online]. *Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky* 1–51, [cit. 15. dubna 2021]. Dostupné z: <https://www.zachranneprogramy.cz/koniklec-otevreny/>
- PAULE, J., SCHERBANTIN, A. & DOBEŠ, C. (2012) Implications of hybridisation and cytotypic differentiation in speciation assessed by AFLP and plastid haplotypes - a case study of *Potentilla alpicola* La Soie. *BMC Evolutionary Biology* **12**, 132–144.
- PICKUP, M., BRANDVAIN, Y., FRAÏSSE, C., YAKIMOWSKI, S., BARTON, N.H., DIXIT, T., LEXER, C., CEREGHETTI, E. & FIELD, D.L. (2019) Mating system variation in hybrid zones: facilitation, barriers and asymmetries to gene flow. *New Phytologist* **224**, 1035–1047.
- PILT, I. & KUKK, Ü. (2002) *Pulsatilla patens* and *Pulsatilla pratensis* (Ranunculaceae) in Estonia: distribution and ecology. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Biology, Ecology* **51**, 242–256.
- PLADIAS – databáze české flóry a vegetace [online]. © 2014–2021 Pladias [cit. 13. dubna 2021] Dostupné z: <https://pladias.cz/taxon/distribution/Pulsatilla%20pratensis%20subsp.%20bohematica>
- PRACH, K., BLAHOVEC, J., IBERL, K., PRACH, J. & ŠLECHTOVÁ, A. (2020) Podaří se zachránit koniklec jarní (*Pulsatilla vernalis*) na Třeboňsku? *Botanika*, 29–31.
- PRENTIS, P.J., WHITE, E.M., RADFORD, I.J., LOWE, A.J. & CLARKE, A.R. (2007) Can hybridization cause local extinction: a case for demographic swamping of the Australian native *Senecio pinnatifolius* by the invasive *Senecio madagascariensis*? *New Phytologist* **176**, 902–912.

- PRUSKI, K. (2007) Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa* L.) and Nanking cherry (*Prunus Tomentosa* L.). In *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits* (ed S.M. JAIN & H. HÄGGMAN), s. 391–407. Springer Netherlands, Dordrecht.
- PU, D., SHI, M., WU, Q., GAO, M., LIU, J.-F., REN, S., YANG, F., TANG, P., YE, G., SHEN, Z., HE, J., YANG, D., BU, W.-J., ZHANG, C., SONG, Q., ET AL. (2014) Flower-visiting insects and their potential impact on transgene flow in rice. *Journal of Applied Ecology* **51**, 1357–1365.
- RADA EVROPY (1979) Úmluva o ochraně evropských planě rostoucích rostlin, volně žijících živočichů a přírodních stanovišť (Příloha I) [online]. Bern: Rada Evropy [Cit. 25. dubna 2021]
Dostupné z: <https://www.coe.int/en/web/conventions/full-list/-/conventions/treaty/104>
- RAMSEY, J., BRADSHAW, H.D. & SCHEMSKE, D.W. (2003) Components of reproductive isolation between the Monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution* **57**, 1520–1534.
- RAMSEY, J. & SCHEMSKE, D.W. (1998) Pathways, mechanism, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 467–501.
- RAO, A.N., JOHNSON, D.E., SIVAPRASAD, B., LADHA, J.K. & MORTIMER, A.M. (2007) Weed Management in Direct-Seeded Rice. *Advances in Agronomy* **93**, 153–255.
- RATNASEKERA, D. (2015) Weedy rice: A threat to rice production in Sri Lanka. *Journal of the University of Ruhuna* **1**, 2–13.
- REED, D.H. & FRANKHAM, R. (2003) Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* **17**, 230–237.
- RHYMER, J.M. & SIMBERLOFF, D. (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 83–109.
- RIESEBERG, L.H. (1995) The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* **82**, 944–953.
- RIESEBERG, L.H. (1997) Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **28**, 359–389.
- RONIKIER, M., COSTA, A., AGUILAR, J.F., FELINER, G.N., KÜPFER, P. & MIREK, Z. (2008) Phylogeography of *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. (*Ranunculaceae*): chloroplast DNA reveals two evolutionary lineages across central Europe and Scandinavia. *Journal of Biogeography* **35**, 1650–1664.
- RUTHERFORD, S., VAN DER MERWE, M., WILSON, P.G., KOOYMAN, R.M. & ROSSETTO, M. (2019) Managing the risk of genetic swamping of a rare and restricted tree. *Conservation Genetics* **20**, 1113–1131.
- RYBKA V., RYBKOVÁ R. & POHLOVÁ R. (2004) *Rostliny ve svitu evropských hvězd (Rostliny soustavy Natura 2000 v České republice)*. Ed. 1. s. 74–76 Sagittaria, Praha. ISBN 80-239-4177-1
- SANCHEZ OLGUIN, E.R., ARRIETA-ESPINOZA, G., LOBO, J.A. & ESPINOZA-ESQUIVEL, A.M. (2009) Assessment of gene flow from a herbicide-resistant indica rice (*Oryza sativa* L.) to the Costa Rican weedy rice (*Oryza sativa*) in Tropical America: factors affecting hybridization rates and characterization of F1 hybrids. *Transgenic Research* **18**, 633–647.

- SANDSTRÖM, A., SVENSSON, B.M. & MILBERG, P. (2017) An example of how to build conservation evidence from case studies: Fire and raking to enhance *Pulsatilla vernalis* populations. *Journal for Nature Conservation* **36**, 58–64.
- SCHUMER, M., ROSENTHAL, G.G. & ANDOLFATTO, P. (2014) How common is homoploid hybrid speciation? *Evolution* **68**, 1553–1560.
- SHANG, L., WANG, Y., CAI, S., WANG, X., LI, Y., ABDUWELI, A. & HUA, J. (2016) Partial dominance, overdominance, epistasis and QTL by environment interactions contribute to heterosis in two upland cotton hybrids. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **6**, 499–507.
- SKALICKÝ V. (1988): *Pulsatilla* Mill. – koniklec. – In: HEJNÝ S., SLAVÍK B., CHRTEK J., TOMŠOVIC P. & KOVANDA M. (eds), *Květena České socialistické republiky* 1, s. 414–422, Academia, Praha.
Dostupné z: <https://pladias.cz/taxon/flora/>
- SNOW, A.A. & CAMPBELL, L.G. (2005) Can feral radishes become weeds. In *Crop Fertility and Volunteerism* s. 193–208. CRC Press, Boca raton, FL.
- SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S. (1993) Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* **12**, 243–273.
- SRAMKÓ, G., LACZKÓ, L., VOLKOVA, P.A., BATEMAN, R.M. & MLINAREC, J. (2019) Evolutionary history of the Pasque-flowers (*Pulsatilla*, *Ranunculaceae*): Molecular phylogenetics, systematics and rDNA evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **135**, 45–61.
- STEBBINS, G.L. (1947) Types of polyploids: their classification and significance. *Advances in Genetics* **1**, 403–429.
- STEWART, C.N., HALFHILL, M.D. & WARWICK, S.I. (2003) Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews Genetics* **4**, 806–817.
- SUDA, J. (2005) Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa* **1**, 46–48.
- SZCZECIŃSKA, M., ŁAZARSKI, G., BILSKA, K. & SAWICKI, J. (2017) The complete plastid genome and nuclear genome markers provide molecular evidence for the hybrid origin of *Pulsatilla* × *hackelii* Pohl. *Turkish Journal of Botany* **41**, 329–337.
- SZCZECIŃSKA, M., SRAMKO, G., WOŁOSZ, K. & SAWICKI, J. (2016) Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe. *Plos one* **11**, e0151730.
- TAMURA, M. (1993) *Ranunculaceae*. In *Flowering Plants · Dicotyledons* (ed. K. KUBITZKI, J.G. ROHWER & V. BITTRICH), s. 563–583. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- TODESCO, M., PASCUAL, M.A., OWENS, G.L., OSTEVIK, K.L., MOYERS, B.T., HÜBNER, S., HEREDIA, S.M., HAHN, M.A., CASEYS, C., BOCK, D.G. & RIESEBERG, L.H. (2016) Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications* **9**, 892–908.
- TORVIK, S.E., BORGÉN, L. & BERG, R.Y. (1998) Aspects of reproduction in *Pulsatilla pratensis* in Norway. *Nordic Journal of Botany* **18**, 385–391.
- TUROŇOVÁ, D., HAMERSKÝ, R. & ONDRÁČEK, Č. (2012) Koniklec otevřený – mírně optimistická zpráva o stavu druhu [online]. *Ochrana přírody*. [Cit. 8. dubna 2021].

Dostupné z: <https://www.casopis.ochranaprirody.cz/vyzkum-a-dokumentace/koniklec-otevreny-mirne-optimisticka-zprava-o-stavu-druhu/>

- UNGERER, M.C., BAIRD, S.J.E., PAN, J. & RIESEBERG, L.H. (1998) Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 11757–11762.
- UOTILA, P. (1969) Ecology and area of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. in Finland. *Annales Botanici Fennici* **6**, 105–111.
- VEGA, U. & FREY, K.J. (1980) Transgressive segregation in inter and intraspecific crosses of barley. *Euphytica* **29**, 585–594.
- VÍT, P., WOLFOVÁ, K., URFUS, T., TÁJEK, P. & SUDA, J. (2014) Interspecific hybridization between rare and common plant congeners inferred from genome size data: assessing the threat to the Czech serpentine endemic *Cerastium alsinifolium*. *Preslia* **86**, 95–117.
- VÍTOVÁ, J., VÍT, P. & SUDA, J. (2015) Rare occurrence of reciprocal hybridization in a sympatric population of the Czech stenoendemic *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus* and widespread *D. carthusianorum*. *Preslia* **87**, 329–345.
- VYHLÁŠKA č. 395/1992 Sb. Vyhláška ministerstva životního prostředí České republiky ze dne 11. června 1992, kterou se provádějí některá ustanovení zákona České národní rady č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny [online]. [Cit. 25. dubna 2021]
Dostupné z: https://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/7698185C778DA46FC125654B0044DDBC/%24file/V%20395_1992.pdf
- WAGNER, W.H. (1970) Biosystematics and evolutionary noise. *Taxon* **19**, 146–151.
- WANG, X.-R., SZMIDT, A.E. & SAVOLAINEN, O. (2001) Genetic composition and diploid hybrid speciation of a high mountain pine, *Pinus densata*, native to the Tibetan Plateau. *Genetics* **159**, 337–346.
- WANG, Z., JIANG, Y., BI, H., LU, Z., MA, Y., YANG, X., CHEN, N., TIAN, B., LIU, B., MAO, X., MA, T., DIFAZIO, S.P., HU, Q., ABBOTT, R.J. & LIU, J. (2021) Hybrid speciation via inheritance of alternate alleles of parental isolating genes. *Molecular Plant* **14**, 208–222.
- WARSCHEFSKY, E., PENMETSA, R.V., COOK, D.R. & VON WETTBERG, E.J.B. (2014) Back to the wilds: Tapping evolutionary adaptations for resilient crops through systematic hybridization with crop wild relatives. *American Journal of Botany* **101**, 1791–1800.
- WEISSMANN, S., FELDMAN, M. & GRESSEL, J. (2005) Sequence evidence for sporadic intergeneric DNA introgression from wheat into a wild *Aegilops* species. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 2055–2062.
- WELLS, T.C.E. & BARLING, D.M. (1971) *Pulsatilla vulgaris* Mill. (*Anemone Pulsatilla* L.). *The Journal of Ecology* **59**, 275–292.
- WENNSTRÖM, A. & ERICSON, L. (1991) Variation in disease incidence in grazed and ungrazed sites for the system *Pulsatilla pratensis* - *Puccinia pulsatillae*. *Oikos* **60**, 35–39.
- WILDEMAN, A.G. & STEEVES, T.A. (1982) The morphology and growth cycle of *Anemone patens*. *Canadian Journal of Botany* **60**, 1126–1137.

- WINGĚ, Ö. (1917) The chromosomes: their number and general importance. *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlesberg* **13**, 131–275.
- WOLF, D.E., TAKEBAYASHI, N. & RIESEBERG, L.H. (2001) Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology* **15**, 1039–1053.
- WOOD, T.E., TAKEBAYASHI, N., BARKER, M.S., MAYROSE, I., GREENSPOON, P.B. & RIESEBERG, L.H. (2009) The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13875–13879.
- XIA, H.-B., WANG, W., XIA, H., ZHAO, W. & LU, B.-R. (2011) Conspecific crop-weed introgression influences evolution of weedy rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) across a geographical range. *Plos one* **6**, 1-11.
- XING, G., QU, L., ZHANG, W., ZHANG, Y., YUAN, X. & LEI, J. (2020) Study on interspecific hybridization between tulip cultivars and wild species native to China. *Euphytica* **216**, 1-17.
- YAKIMOWSKI, S.B. & RIESEBERG, L.H. (2014) The role of homoploid hybridization in evolution: A century of studies synthesizing genetics and ecology. *American Journal of Botany* **101**, 1247–1258.
- ZAHRADNÍKOVÁ, J. & HARČARIKOVÁ, L. (2012) Výsadby a výsevy vzácných a ohrožených druhů rostlin in-situ v Krkonošském národním parku. *Opera Corcontica* **49**, 121–134.
- ZHOU, G., CHEN, Y., YAO, W., ZHANG, C., XIE, W., HUA, J., XING, Y., XIAO, J. & ZHANG, Q. (2012) Genetic composition of yield heterosis in an elite rice hybrid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 15847–15852.
- ZHOU, R., GONG, X., BOUFFORD, D., WU, C.-I. & SHI, S. (2008) Testing a hypothesis of unidirectional hybridization in plants: Observations on *Sonneratia*, *Bruguiera* and *Ligularia*. *BMC Evolutionary Biology* **8**, 149.
- ZIELIŃSKA, K.M., KIEDRZYŃSKI, M., GRZYL, A. & REWICZ, A. (2016) Forest roadsides harbour less competitive habitats for a relict mountain plant (*Pulsatilla vernalis*) in lowlands. *Scientific Reports* **6**, 1-11.
- ZIRKLE, C. (1935) *The beginnings of plant hybridization* [online]. University of Pennsylvania Press, Philadelphia. Dostupné z: www.jstor.org/stable/j.ctv4s7krg