

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Romana Bartošová

**Variabilita a mezidruhová hybridizace mezi druhy *Elymus repens*
a *E. hispidus***

Variation and interspecific hybridization of *Elymus repens* and *E. hispidus*

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. František Krahulec, CSc.

Praha 2017

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 dne 25. 4. 2017

.....
Romana Bartošová



Poděkování:

Děkuji všem, kteří vydrželi 3 roky neustálé hlavy v „pejru“, oddělování zrna od plev a jiných graminoidních těžkostí, a nezanevřeli na mne. A také těm, kteří se na mé tříleté cestě zdrželi kratší dobu, ale alespoň její část šli se mnou.

Děkuji kamarádům botanikům za rady, trpělivost se mnou a pohodové chvíle, a kamarádům nebotanikům za to, že mne vytahovali ze světa rostlin do světa psychologů, doktorů, veterinářů, ekonomů, právníků a hlavně lidí, kteří si umí užívat života a jsou taky tak trochu blázni.

Děkuji svým rodičům a velké sestřičce, že tu jsou, že mne mají rádi a měla jsem a mám v nich velkou podporu, ať už nadšenou a hlasitou, nebo jen nesmělou a tichou.

Děkuji svému školiteli Tomáši Urfusovi za to, že i když jsem propadala kamenným depresím s hlavou v „pejru“, tak mne dokopal zpět do normálu a k opětovnému rozhodnutí, že studium pýrů má cenu a je mou jedinou cestou.

Děkuji svému konzultantovi prof. RNDr. Františku Krahulcovi, CSc. za to, že mi vymyslel graminoidní téma a popostrčil mne k mé botanické životní lásce.

Děkuji RNDr. Ivaně Jongepierové a Mgr. Karlu Fajmonovi, že mne zasvětili do krás Čertoryjí a nechali mne zde studovat pýry.

Děkuji Prom. biol. Vlastě Jarolímové za trpělivost, když jsem jí vozila kořenové špičky, dělaly jsme preparáty a nebyly tam žádné dělicí se buňky. A za to, že i přesto mi několik rostlin spočítala.

Děkuji RNDr. Davidu Kopeckému, Ph.D. za to, že mne zasvětil do tajů genomové hybridizace *in situ* v plně vybavené laboratoři a měl trpělivost odpovídat na mé laické otázky. A že to vydržel celé 2 týdny.

Děkuji Ing. Václavu Mahelkovi, Ph.D. za pýrové konzultace, informace a kytky.

A nakonec děkuji za to, že na světě je ještě stále dobrá hudba, bez které by to nešlo. „Vždyť je to všechno jen taková Znouzectnost.“

Děkuji!

Abstrakt

Čeleď *Poaceae* představuje jednu z nejodvozenějších skupin jednoděložných rostlin, ve které dochází ve zvýšené míře k polyploidizaci a hybridizaci. Tribus *Triticeae*, a samotný rod *Elymus*, je modelovým příkladem enormní úrovně retikulární evoluce.

Předložená diplomová práce stanovila frekvenci a směr hybridizace mezi druhy *Elymus hispidus* a *E. repens* na území střední Evropy a zhodnotila evoluční význam hybridního roje na lokalitě NPR Čertoryje (Bílé Karpaty), kde dochází ve výrazně větší míře k hybridizaci a polyploidizaci.

Potenciál pro hybridizaci mělo 14,4 % populací, protože se v nich buď přímo vyskytoval hybrid (7,9 %), nebo oba rodičovské druhy (8,4 %). Aneuploidní rostliny a cytotypy s vyšší ploidii byly potvrzeny jen z čertoryjské populace (s výjimkou jediného DNA nonaploida).

Pomocí genomové hybridizace *in situ* byly potvrzeny a zpřesněny počty chromozomů u jednotlivých ploidních úrovní druhů a jejich subgenomová složení. Nově byla popsána genomová konstituce mezidruhových hybridů a vyšších alopolyploidů a byl odhalen jejich heterogenní původ.

Průtoková cytometrie odhalila kontinuum absolutních genomových velikostí, které ukazuje na plynulý přechod hybrida mezi rodičovskými druhy (asymetricky - především směrem k *E. hispidus*).

V modelové populaci čertoryjského hybridního roje vznikají hybridy (29,6 %) a vyšší ploidní úrovně (8,9 %) ve zvýšené míře. Vysoká variabilita zde byla podchycena i na úrovni subgenomového složení a morfologie.

Mezidruhová hybridizace je tedy v rámci studovaných druhů značně frekventovaným fenoménem a má výrazně asymetrický charakter (tj. dochází k introgresi směrem k *E. hispidus*). Nezanedbatelný evoluční potenciál má i opakovaný vznik nových polyploidních cytotypů a to zejména v rámci hybridních rojů.

Klíčová slova: *Elymus*, hybridizace, alopolyploidie, absolutní velikost genomu, GISH, karyologie

Abstract

Family *Poaceae* is one of the most derived groups of monocots. Major mechanisms of grasses evolution and particularly of tribe *Triticeae* and genus *Elymus* are polyploidisation and hybridisation.

Presented diploma thesis assessed frequency and direction of hybridisation between *Elymus hispidus* and *E. repens* in Central Europe. Thesis also evaluated evolutionary importance (significantly higher ratio of hybridisation and polyploidisation) of hybrid swarm in Nature Reserve Čertoryje (Bílé Karpaty Mountains/the White Carpathians, the Czech Republic).

Putative hybridizing populations were 14,4 % of sampled localities, i.e. direct presence hybrids (7,9 %) or both parental species (8,4 %). Aneuploids and higher polyploids were found exclusively in Čertoryje hybrid swarm, except one putative DNA nonaploid plant.

The genome *in situ* hybridisation confirmed and improved knowledge of particular species/cytotypes chromosome counts and further specified their genome composition. GISH newly characterized genome composition of interspecific hybrids and higher allopolyploids and revealed their heterogeneous origin.

Flow cytometry revealed continuum of absolute genome sizes among parental species and their hybrid. The continuum was rather asymmetric in direction towards *E. hispidus*.

Model hybrid swarm Čertoryje produce significantly higher amount of hybrids (29,6 %) and allopolyploids (8,9 %) than in other populations. An enormous variation was found at the level of genome constitution followed by morphology.

Thus interspecific hybridisation of studied species is widely spread phenomenon and its character is asymmetric which implies introgressive hybridisation towards *E. hispidus*. Repeated origin of new polyploid cytotypes (mainly within hybrid swarms) was also confirmed to play an essential evolutionary role.

Key words: *Elymus*, hybridisation, allopolyploidy, absolute genome size, GISH, karyology

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	4
2.1. Rod <i>Elymus</i> L.	4
2.1.1. Druhy rodu <i>Elymus</i> v ČR a okolních zemích	5
2.1.2. Studované druhy	6
2.2. Hybridizace.....	8
2.2.1. Hybridizace u rodu <i>Elymus</i>	9
2.2.2. Hybridní roje	9
2.2.3. Hybridní roj Čertoryje	9
2.3. Polyploidizace	10
2.3.1. Polyploidizace rodu <i>Elymus</i>	11
3. Metodika.....	12
3.1. Sběr rostlin.....	12
3.2. Průtoková cytometrie.....	14
3.3. Distanční morfometrika.....	15
3.4. Klasická karyologie	17
3.5. Genomová hybridizace <i>in situ</i>	18
3.5.1. Příprava chromozomových preparátů pro GISH	19
3.5.2. Příprava celogenomové sondy.....	20
3.5.3. Příprava mixu	21
3.5.4. Denaturace a hybridizace sond na preparáty	21
3.6. Barvení pylu	21
4. Výsledky.....	23
4.1. Distribuční charakteristiky	23
4.2. Průtoková cytometrie.....	25
4.2.1. „Dataset extenzivního samplingu“	26

4.2.2. „Detailní studie Čertoryje“	29
4.3. Distanční morfometrika	32
4.3.1. „Dataset extenzivního samplingu“	32
4.3.2. „Detailní studie Čertoryje“	40
4.4. Genomová hybridizace <i>in situ</i>	43
4.5. Barvení pylu	48
5. Diskuze.....	50
5.1. Klasická karyologie.....	50
5.2. Průtoková cytometrie	53
5.2.1. „Dataset extenzivního samplingu“	54
5.2.2. „Detailní studie Čertoryje“	55
5.3. Distanční morfometrika	57
5.4. Genomová hybridizace <i>in situ</i>	58
5.5. Historický kontext.....	64
5.6. Výskyt druhů.....	65
5.7. Ochrannářské souvislosti - výjimečné aspekty lokality Čertoryje.....	66
5.8. Taxonomické souvislosti.....	67
5.9. Barvení pylu	70
6. Závěr	71
8. Literatura	73
9. Přílohy.....	78

1. Úvod

Diplomová práce se zabývá hybridizací mezi dvěma druhy rodu *Elymus* L. [*E. repens* (L.) Gould a *E. hispidus* (Opiz) Melderis] a jejich vnitrodruhovou variabilitou. Jako „outgroup” byl do studie přidán *E. caninus* (L.) L. Rod *Elymus* je součástí tribu *Triticeae* Dumort., do nějž patří, mimo jiné, významné obiloviny jako je *Triticum* L. (pšenice), *Hordeum* L. (ječmen) a *Secale* L. (žito).

V rámci tribu, ale i v samotném rodu *Elymus*, probíhá retikulátní evoluce a vztahy mezi jednotlivými druhy rodu nejsou ještě zdaleka plně objasněny (Kellogg 1989; Mason-Gamer et al. 2010). Samotné druhy (potažmo sesterské rody) jsou definovány na základě genomového složení, v rámci kterého je alespoň jeden subgenom od rodu *Pseudoroegneria* (Nevski) Á. Löve (obrázek 1). Oba studované druhy jsou alohexaploidní (*E. repens* a *E. hispidus*) a třetí druh je alotetraploidní (*E. caninus*). Druhy rodu vznikly hybridizací a polyploidizací, což jsou v rostlinné říši významné a časté jevy (Mallet 2005; Wendel 2000).

E. repens a *E. hispidus* spolu hybridizují za vzniku hybridu popsaného jako *Elymus* × *mucronatus* (např. Kubát et al. 2002; Melderis 1980), který vykazuje intermediární fenotyp, je životaschopný a alespoň částečně fertillní (Mahelka et al. 2007). Hybrid je často morfologicky špatně odlišitelný od rodičovských druhů. Tato podobnost hybridu a rodičovských druhů může být důsledkem zpětné hybridizace s rodiči, tj. introgrese, nebo fenotypové plasticity druhů. Proto je nutné hybridy rozlišovat pomocí kombinace přístupů: průtokové cytometrie (jeho absolutní genomová velikost se pohybuje mezi velikostmi rodičovských druhů; Mahelka et al. 2005), morfometriky a karyologie.

Druhy *E. repens* a *E. hispidus* byly na našem území studované pomocí průtokové cytometrie (Mahelka et al. 2005), *in situ* hybridizací (GISH, FISH; Mahelka & Kopecký 2010; Mahelka et al. 2011), molekulárních analýz (ITS, GBSSI; Mahelka & Kopecký 2010; Mahelka et al. 2011), ale dosud chybí jasná představa, s jakou frekvencí se lze s hybridizací setkat v přírodě (extenzivní typ studie) a jaké jsou její morfologické projevy. U hybridů a vyšších ploidních úrovní (heptaploid, nonaploid) byla dosud zkoumána jen fertilita obilek (Mahelka et al. 2007).

„Sampling” diplomové práce byl od počátku koncipován stratifikovaně, tj. extenzivní ve střední Evropě a intenzivní v rámci modelové populace na lokalitě NPR Čertoryje (Bílé Karpaty). Čertoryjský hybridní roj má zcela výjimečné postavení zejména z důvodu enormně vysoké míry hybridizace a polyploidizace (Krahulec pers comm.).



Obrázek 1: „Chloroplast DNA gene tree” ukazující vztahy diploidních druhů příbuzných rodu *Elymus* (černě) a polyploidních druhů rodu *Elymus* (barevně). Subgenomy na grafu označené jsou **St** od *Pseudoroegneria*, **H** od *Hordeum*, **Y** a **X** od neznámého donora značí. Převzato ze studie Mason-Gamer (2013).

Diplomová práce propojuje data z cytometrických analýz, morfometriky, karyologie, genomové hybridizace *in situ* a analýz barvitelnosti pylu za účelem splnění následujících cílů:

- 1) Jaká je frekvence hybridizace a introgrese *E. repens* a *E. hispidus* na území střední Evropy?
- 2) Jaký mikroevoluční význam mají hybridní roje?
 - příklad modelové populace Čertoryje
- 3) Mají studované mikroevoluční mechanismy nějaké morfologické důsledky?
- 4) Jaké je subgenomové složení studovaných druhů?
 - potvrzení dřívějších studií

2. Literární přehled

V diplomové práci je pracováno s pojetím rodu *Elymus* z Checklist of vascular plants of the Czech Republic (Danhelka et al. 2012).

Rod *Elymus* patří do tribu *Triticeae* Dumort., čeledi *Poaceae* Barnhart. V rámci celého tribu probíhá intenzivní retikulátní evoluce. Základní, diploidní, druhy s rozdílnými genomy, které spolu v minulosti hybridizovaly, daly vzniknout zcela novým alopolyploidním liniím (odlišeny na úrovni samostatných rodů; Mahelka et al. 2011). V takto nově ustanovených rodech se jednotlivé genomy původních základních druhů označují jako subgenomy.

Rodové pojetí je však dosud diskutabilní, jelikož v rámci celého tribu dochází standardně k mezirodové hybridizaci a na úrovni výzkumu subgenomového složení dochází k dalším zpřesněním a převratným objevům. Rodová koncepce postavená na subgenomovém složení přináší ještě další komplikace na úrovni nestejného evolučního významu jednotlivých subgenomů. Kupříkladu z morfologického hlediska (tj. vlivu na morfologii) se určité subgenomy chovají dominantně a v rámci kompozitního genomu mají důležitější pozici. Toto se děje například u některých druhů rodu *Triticum*, které mají část svého genomu od rodu *Aegilops* L., jehož morfologický projev je potlačen (Stebbins & Pun 1953). Alopolyploidní druhy rodu *Triticum* (např. alohexaploidní *T. macha* Dekapr. & Menabde, *T. spelta* L. a *T. aestivum* L.), které obsahují 2 subgenomy od rodu *Aegilops* a 1 subgenom od rodu *Triticum*, jsou stále řazeny do rodu *Triticum* (Goncharov et al. 2009).

2.1. Rod *Elymus* L.

Rod *Elymus* je rozšířen v temperátních oblastech obou polokoulí, s centrem rozšíření v Asii. Ve střední Evropě, v porovnání s centrem rozšíření, roste jen zlomek druhů (např. Charkevicz 1985; Shouliang & Guanghua 2006; Melderis 1980). Původní výskyt druhů *E. repens*, *E. hispidus* a *E. caninus* je v Evropě a Asii, sekundárně se rozšířily do Severní Ameriky (Melderis 1980). Na základě různých pojetí bylo do rodu v historii zařazeno od 43 do 170 druhů (např. Barkworth 1992; Shouliang & Guanghua 2006). Ani vnitrorodové členění (zejména na úrovni sekcí) nebylo stabilní.

Převažují dvě pojetí rodu s výrazně odlišnými taxonomickými definicemi. *Elymus* s. str. je definován subgenomovým složením (kombinace subgenomů *Pseudoroegneria* a *Hordeum*; Dewey 1984; Löve 1984), zatímco *Elymus* s. l. je striktně definován morfologií a částečně subgenomovým složením (subgenom *Pseudoroegneria* v kombinaci s jakýmkoli jiným subgenomem; např. Mason-Gamer 2004). V rámci *Elymus* s. l. jsou do rodu zařazeny

rody *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn. a *Thinopyrum* Á. Löve, popřípadě jsou ponechány v podobě sekcí rodu.

Většina soudobých flór pojímá rod *Elymus* širěji, tj. na základě morfologie a přítomnosti subgenomu od rodu *Pseudoroegneria* (Nevski) Á. Löve (např. Melderis 1980; Shouliang & Guanghua 2006). Definici rodů v tribu *Triticeae* (tj. včetně *Elymus*) podle genomového složení začali prosazovat H. Kihara (1930), Á. Löve (1982; 1984) a D. R. Dewey (1984). Löve (1984) zařadil studované druhy do rodů *Elymus* [*E. caninus* (L.) L.] a *Elytrigia* [*E. repens* (L.) Desv. ex Nevski a *E. intermedia* (Host) Nevski]. Naproti tomu Dewey (1984) pojímal trojici studovaných druhů na úrovni rodů *Elymus* (*E. caninus*), *Elytrigia* [*E. repens* (L.) Desv. ex Nevski] a *Thinopyrum* [*Th. intermedium* (Host) Barkworth & D. R. Dewey].

Mezi druhy rodu *Elymus* často probíhá hybridizace a hybridy obvykle mají intermediární vzhled mezi rodiči. Oboupohlavné květy kříženců vykazují samčí sterilitu (Melderis 1980). Četná pozorování hybridizace ukazují na omezenou funkci reprodukčních bariér.

Ne všichni středoevropští autoři přijímají pojetí rodu *Elymus* s. l. a druhy řadí do více rodů (např. Dostál & Červenka 1992; Kubát et al. 2002; Marhold & Hindák 1998).

Dalším příkladem pojetí rodu *Elymus* je ruská flóra (Tzvelev 1976), kde je rod rozdělen do 2 - *Elymus* a *Elytrigia*, kdežto Komarov (1934) rod rozděluje na rody *Roegneria* K. Koch, *Agropyrum*, *Clinelymus* (Griseb.) Nevski a *Elymus*.

Nicméně recentně je širší pojetí rodu (*Elymus* s. l.) přijímáno i ve středoevropských flórách a „check listech“ (Mirek et al. 2002; Fischer et al. 2008; Jäger et al. 2011; Danihelka et al. 2012)¹.

2.1.1. Druhy rodu *Elymus* v ČR a okolních zemích

Z území České republiky je popisováno 5 druhů rodu *Elymus*: *E. caninus*, *E. canadensis*, *E. trachycaulus* a *E. repens* a *E. hispidus* s jejich varietami a subspeciemi (Danihelka et al. 2012; Kubát et al. 2002). Alochtonní *E. canadensis* a *E. trachycaulus* byly na našem území zaznamenány jen ojediněle (Kubát et al. 2002).

¹ Recentní Danihelkovo širší pojetí rodu *Elymus* (Danihelka et al. 2012) je vítězstvím pragmatického pojetí nad přirozenou subgenomovou definicí rodu v rámci tribu *Triticeae*. Na základě subgenomové konstituce by totiž do rodu *Elymus* byly řazeny druhy s kombinací subgenomů St a H, což by v praxi znamenalo příslušnost *E. hispidus* k rodu *Thinopyrum*. Z praktického hlediska by dva obtížně rozeznatelné druhy neměly být v rámci samostatných rodů (Danihelka pers. comm.).

Ve floristické databázi byl zaznamenán pouze 1 nález druhu *E. canadensis* a žádný nález druhu *E. trachycaulus* (<http://florabase.cz/databanka/index.php?page=search-by-name>; 14. 3. 2017).

V Německu roste invazivní druh *Elymus obtusiflorus* (DC.) Conert (Conert 2000). Roste podél řek a cest, proto jeho výskyt lze očekávat i v České republice.

Jižně od České republiky roste 5 druhů rodu *Elymus*: *E. caninus*, *E. repens*, *E. athericus* (Link) Kerguélen a *E. hispidus* (Rakousko; Fisher et al. 2008).

Na sever od našeho území se vyskytuje *E. caninus*, *E. obtusiflorus*, *E. athericus*, *E. pycnanthus*, *E. campestris* (Godr. et Gren.) Kerguélen, *E. repens*, *E. junceiformis* (Á. Löve et D. Löve) Hand et Buttler, *E. arenosus* (Spenn.) Conert, *E. hispidus*, *E. strictus* (Dethard.) Conert a *E. bergrothii* (H. Lindb.) Conert (Německo; Jäger et al. 2011). V Polsku se navíc ještě vyskytuje *E. canadensis* a *E. farctus* (Viv.) Runemark ex Melderis (Mirek et al. 2002).

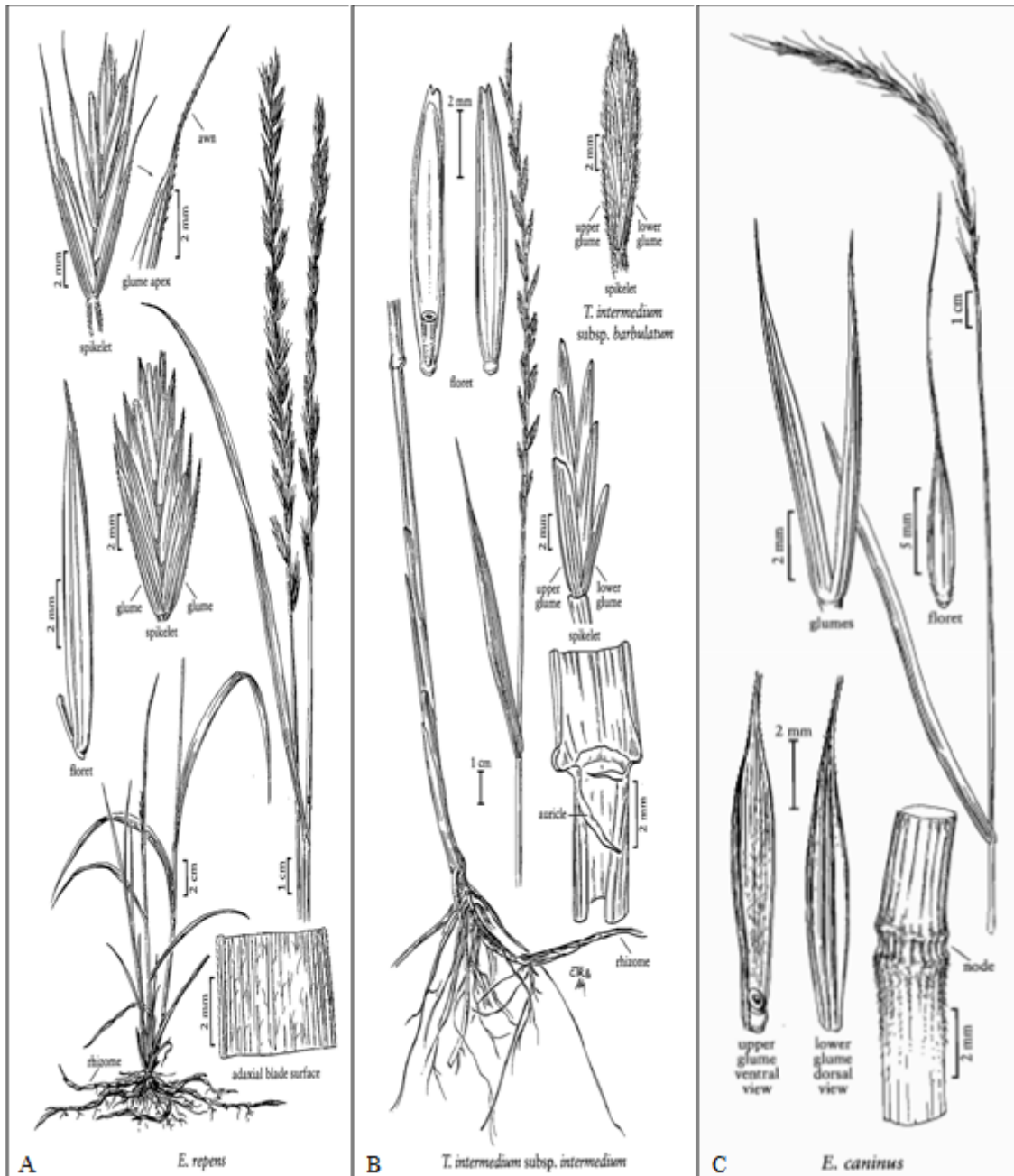
2.1.2. Studované druhy

Elymus repens (obrázek 2A) je vytrvalá rostlina, s původním rozšířením v Evropě a Asii, druhotně se vyskytující v Severní Americe (Barkworth et al. 2007). Roste na polích, zahradách a rumištích, od nížin do hor. Je to rostlina oddenkatá, na volném okraji listových pochev bez brv, s přímým klasem, s klásky s 3-8 květy a plevou špičatou nebo s rovnou osinou do 2 cm (Kubát et al. 2002). *E. repens* je hexaploid ($2n=6x=42$ chromozomů) a obsahuje subgenomy označované St, St a H. St je zkratka základního subgenomu *Pseudoroegneria* [shodný s diploidním druhem *Pseudoroegneria spicata* (Pursh) Á. Löve] a genom H pochází od společného předka se současnými druhem *Hordeum bogdanii* Wilensky (Mason-Gamer 2004; Mahelka & Kopecký 2010).

Elymus hispidus (obrázek 2B) je vytrvalá rostlina, s areálem primárního výskytu v Evropě a západní Asii, sekundárně rozšířená na západě Severní Ameriky (Barkworth et al. 2007). Roste na výslunných až polostepních stráních, okrajích vinic, v křovinách, písčitých borech i na mírně ruderalizovaných místech od nížin po pahorkatiny. Rostlina je oddenkatá s brvami na volném okraji listových pochev, klas má přímý. Klásky má se 4-7 květy, plevy tupé (Kubát et al. 2002). *E. hispidus* je hexaploid ($2n=6x=42$ chromozomů) a obsahuje subgenomy St od *Pseudoroegneria*, V od *Dasypyrum* a D od *Aegilops* (Mahelka et al. 2011). Geny od *E. hispidus* se vkládají do pěstované pšenice a zvyšují její rezistenci například na napadení rží (Fedak & Han 2005).

Studované druhy *E. repens* a *E. hispidus* nemusí být vždy hexaploidní, ale jsou známy i jiné ploidní úrovně (nonaploid: $2n=9x=63$ chromozomů; (Mahelka et al. 2007). Další, méně

zřetelné, rozlišovací znaky mezi druhy jsou v klasu (Kubát et al. 2002). Mezi druhy probíhá hybridizace kvůli malé reprodukční bariéře (Mahelka et al. 2005). Mezidruhový hybrid kombinuje znaky rodičovských druhů a byl pojmenován *Elymus* × *mucronatus* (např. Danihelka et al. 2012).



Obrázek 2: Ilustrace studovaných druhů: A) *E. repens*, B) *E. hispidus*, C) *E. caninus*. Převzato z Barkworth et al. (2007).

Elymus caninus (obrázek 2C) je vytrvalá rostlina s původním rozšířením v Evropě a Asii, do Severní Ameriky je s největší pravděpodobností párkrát zavlečená, ale záznam spíše nasvědčuje špatnému určení druhu (Barkworth et al. 2007). Vyskytuje se na pasekách, loukách, v lužních lesech, stinných vlhčích lesech a v pobřežních křovinách od nížin

do podhůří. Je to rostlina volně trsnatá s krátkým, ut'atým jazýčkem, s klasem chabým, často ohnutým, klásky s 2-6(-9) květy, a pluchy má až s 2 cm dlouhou křivolakou osinou (Kubát et al. 2002). *Elymus caninus* je tetraploid ($2n=4x=28$ chromozomů) a obsahuje subgenomy St a H, kde genom St je od rodu *Pseudoroegneria* a genom H od rodu *Hordeum* (Mason-Gamer 2004; Orgaard & Anamthawat-Jónsson 2001).

2.2. Hybridizace

Hybridizace je u rostlin relativně častý jev (cca u 25 % rostlinných druhů; Mallet 2005), při kterém vzniká potomstvo splnutím gamet rodičovských rostlin patřících do jiných druhů stejného rodu (mezidruhová hybridizace) nebo jde o potomstvo rodičovských druhů patřících do jiných rodů (mezirodová hybridizace; Ellstrand et al. 1996). Některé práce však naznačují, že je rostlinná hybridizace ještě frekventovanější (Stace et al. 2015). K hybridizaci dochází ve větší míře u dvouděložných rostlin než u jednoděložných (výjimkou jsou čeledi *Orchidaceae*, *Poaceae* a *Cyperaceae*; Ellstrand et al. 1996).

Mezidruhová hybridizace je jednou z nejvýraznějších sil produkujících diverzitu v rámci evoluční historie (Wissemann 2007). Naproti tomu hybridizace (sensu vnitrodruhová hybridizace mezi různými populacemi), narušuje genetickou uniformitu populace a může vyštěpit nevýhodné alely. Avšak současně může dát vzniknout novým, výhodným vlastnostem, které by bez ní nebyly možné, a zvyšovat tak fitness druhů (Walisch et al. 2012).

Mezidruhová hybridizace má samozřejmě i negativní důsledky, a to ve smyslu sterility (až neživotaschopnosti) kříženců, která je dána zejm. chromozomovými přestavbami při křížení druhů s rozdílným genomovým složením (Rieseberg & Carney 1998). Pokud se jedná o hybridizaci mezi populacemi jednoho druhu, která je každá přizpůsobená jiným ekologickým podmínkám, přijde tak o ekologické zvýhodnění oproti rodičovským druhům, ale není to pravidlo (Rieseberg & Carney 1998).

Hybridizace je silně vázaná na disturbance na lokalitě, které umožňují kontakt jinak oddělených rostlin schopných hybridizace (Rieseberg & Carney 1998). V takovémto případě mohou vznikat a ustanovit se hybridní roje, v nichž se vyskytují hybridy a zpětné hybridy spolu s rodičovskými rostlinami, které mohou být po několika generacích kompetičně vyloučeny (Ward et al. 2012).

Hybridizace, a také polyploidizace, je u trav studována například u rodu *Spartina* Schreb., hybridů *Spartina* × *townsendii* H. Groves & J. Groves (Ainouche et al. 2004; Salmon et al. 2005; Ainouche et al. 2008). Dalším studovaným systémem je hybridizace, ať už přirozená nebo manipulovaná, mezi vytrvalými druhy tribu *Triticeae* a zemědělskými

plodinami *Triticum*, *Hordeum* a pícninami, např. *Agropyrum cristatum* (L.) Gaertn. (Franke et al. 1992; Asay 1992; Mujeeb-Kazi et al. 2007). Díky šlechtitelství je hybridizace u některých trav velmi dobře prozkoumána (např. Asay 1992; Kopecký et al. 2005).

2.2.1. Hybridizace u rodu *Elymus*

Tribus *Triticeae* je z mnoha důvodů vhodný pro studium hybridizace, polyploidizace a introgrese. Kromě samotných obilnin, které mají neoddiskutovatelnou hospodářskou hodnotu, je studován rod *Elymus*, jehož zemědělský význam jako plevele a potenciálního zdroje důležitých vlastností pro křížení je rovněž nezanedbatelný. Jako modelový příklad je rod *Elymus* vhodný s ohledem na to, že zahrnuje alopolyloidní druhy a k dispozici jsou i příbuzné diploidní taxony, od nichž mají polyploidní druhy rodu *Elymus* odvozený původ (Liao et al. 2013). Studium chloroplastové DNA byl zjištěn donor mateřského genomu rodu *Elymus*, jímž je *Pseudoroegneria* (Mason-Gamer 2008). Tento subgenom je u rodu *Elymus* dominantní.

Druh *Elymus hispidus* byl křížen s pěstovanou pšenicí *Triticum aestivum*, aby byly vytvořeny vytrvalé kultivary. Výsledné hybridy však nebyly nakonec použité v zemědělství kvůli malému výtěžku (Tzvelev 1976). V další studii byl křížen druh *Triticum aestivum* s volně rostoucími druhy z tribu *Triticeae*, mimo jiné i s druhy *E. hispidus* a *E. repens*. Mezirodové hybridy posléze vykazovaly různý stupeň životaschopnosti a fertility (Franke et al. 1992). *E. hispidus* se používá pro vnášení genů pro rezistenci například vůči rzi a virům do pěstované pšenice *Triticum aestivum* (Fedak & Han 2005; Salina et al. 2015).

2.2.2. Hybridní roje

Hybridní roje se obvykle objevují na místě společného výskytu 2 druhů, které spolu hybridizují a vytváří jak primární hybridy, tak zpětné hybridy s rodičovskými druhy. Tvorba hybridních rojů a introgresivní hybridizace se nevyskytuje jen u rostlin, ale může se vyskytnout i u živočichů, například ryb (Rubidge & Taylor 2004).

Hybridizace v rámci hybridního roje nemusí být symetrická, může se přiklánět víc k jednomu rodičovskému druhu (např. Keim et al. 1989). Hybridní roje byly dokumentovány např. u *Diphysastrum* Holub (Hanušová et al. 2014), *Oryza* L. (Bolaji et al. 2012), *Populus* L. (Keim et al. 1989) nebo *Viola* L. (Krahulcová et al. 1996).

2.2.3. Hybridní roj Čertoryje

Specifické půdní a vlhkostní poměry na lokalitě Čertoryje (Bílé Karpaty) patrně způsobily, že *E. hispidus* zde roste ve zcela netypickém prostředí specifických mezofilních,

subxerofilních i xerofilních bělokarpatských luk (Jongepierová 2008). Kvůli odlišným a neobvyklým stanovištním podmínkám se zde *E. hispidus* „chová“ jinak než na svých obvyklých lokalitách. Příčina tohoto odlišného chování není prozatím známa, v genomovém složení nebyla nalezena odlišnost ve srovnání s rostlinami z jiných lokalit (Krahulec pers. comm.). Rozsahem a mírou hybridizace, výskytem dalších ploidních úrovní a aneuploidů není čertoryjský hybridní roj, byť jen částečně, srovnatelný s jakoukoliv jinou populací obou studovaných druhů ve střední Evropě (Mahelka et al. 2005).

Výlučnost čertoryjské populace může patrně souviset se samotným fenoménem bělokarpatských luk. Ty totiž představují jedny z druhově nejbohatších společenstev v celé střední Evropě. Jejich druhovou bohatost mohou např. ilustrovat výjimečné počty taxonů zaznamenaných na ploše o velikosti 0,004 m² - 13 druhů a 0,25 m² - dokonce 44 druhů, což jsou zcela rekordní čísla na těchto prostorových škálách (Wilson et al. 2012). Příčiny druhové bohatosti Čertoryjské lokality jsou poměrně komplexní, podílí se na nich pravděpodobně také kontinuální obhospodařování, většinou kosení a pastva, v posledních několika tisících let (Roleček et al. 2014). Díky tomu se na území, které nemá reliktní tvary reliéfu, zachovalo velké množství reliktních taxonů rostlin, např. *Danthonia alpina* Vest, *Veronica spuria* L., *Pedicularis exaltata* Besser (Jongepierová et al. 2008). Proto může být vznik hybridního roje datován již do raného neolitu (Hájková et al. 2011).

Část NPR Čertoryje byla obnovena jednorázovými managementovými zásahy, tj. odstraněním dřevinného náletu (Jongepierová & Devánová 2008). Velká odlesněná plocha mohla posléze představovat ideální prostředí pro uchycení některých hybridů, aneuploidů a dalších vzácných cytotypů, které by za normálních podmínek pravděpodobně podlehly v kompetici s druhově „čistými“ jedinci. A tím pádem se na lokalitě ustanovil hybridní roj (Fajmon, Jongepierová & Krahulec pers. comm.).

2.3. Polyploidizace

Polyploidizace je jev, při kterém dochází ke zmnožení celé chromozomové sady organismu. K polyploidizaci dochází ve zvýšené míře v rámci rostlinné evoluce, zatímco u živočichů se spíše soustředí jen na určité skupiny, jako např. ryby a obojživelníky v rámci obratlovců (Otto & Whitton 2000). Během evoluce proběhlo u rostlin několik základních společných polyploidizačních událostí (celogenomových duplikací; Soltis et al. 2015). U více než 50 % (a může to být až přes 70 %) rostlin došlo během evoluce k polyploidizaci, podle Wendel (2000). Dnes už je známo, že všechny krytosemenné rostliny jsou polyploidní, krom sesterského druhu *Amborella trichopoda* Baill. (Soltis et al. 2009). Zmnožení chromozomové

sady může zabránit sterilitě, například u hybridů, což je pro ně evoluční výhoda. To je jedním z důvodů, proč je hybridizace často následována polyploidizací (např. Ainouche et al. 2004).

Po polyploidizaci dochází pravděpodobně k procesu utlumení aktivity některých kopií genů („gene silencing”) a dalším procesům, které vedou k postupné funkční diploidizaci (detailně dokumentováno např. u *Cardamine cordifolia* A. Gray; Mandáková et al. 2016). Diploidizačním procesem prošla pravděpodobně většina diploidních druhů z *Poaceae*, které jsou v tomto ohledu považovány za paleopolyploidy (Paterson et al. 2004). V rámci strukturálních genomových přestaveb, které následovaly po celogenomové duplikaci trav, byla popsána zejm. řada chromozomových fúzí, které způsobily snížení počtu chromozomů (Murat et al. 2014).

Polyploidizace se nemusí týkat všech buněk organismu, ale může se jednat o tzv. somatickou polyploidizaci, která se týká jen části buněk organismu, například zásobního pletiva, žahavých trichomů *Urtica dioica* L. či elaiosomů u *Scilla bifolia* L. (Suda 2009).

Polyploidy se dělí podle stáří vzniku na paleopolyploidy (vznik před miliony let) a neopolyploidy (recentní vznik; Adams & Wendel 2005). Dále se polyploidy dělí podle toho, jestli došlo ke zmnožení genomové sady od jednoho druhu (autopolyploidy) anebo od více druhů (alopolyploidy; Pikaard 2001; Soltis et al. 2004).

Příkladem autopolyploidie je tetraploidní *Dactylis glomerata* L., která vznikla zdvojením chromozomových sad diploidní *Dactylis polygama* Horv. (Lumaret 1988; Míka et al. 2002).

Nejnámějším příkladem alopolyploidie je hospodářsky významný alohexaploid *Triticum aestivum* (genomy AABBDD), který vznikl mezirodovou hybridizací mezi alotetraploidním druhem *T. turgidum* L. (AABB) a diploidním předchůdcem dnešního druhu *Aegilops tauschii* Coss. (DD; Wendel 2000). Dalšími alopolyploidy jsou například *Oryza sativa* L., *Zea mays* Kuntze a *Glycine max* (L.) Merr. (Adams & Wendel 2005) nebo *Spartina anglica* (Ainouche et al. 2008).

2.3.1. Polyploidizace rodu *Elymus*

Druhy rodu *Elymus* jsou alotetraploidy (např. *E. caninus*), alohexaploidy (např. *E. repens* a *E. hispidus*), popřípadě i alooktoploidy (např. *E. smithii*, *E. pungens*; Mason-Gamer 2013). Díky hybridizaci mezi různými ploidními úrovněmi a následné polyploidizaci mohou vznikat zcela nové cytotypy, například u druhu *Elymus repens* (Mahelka et al. 2005) nebo u hybrida mezi druhy *E. repens* a *E. pycnanthus* (Godr.) Melderis (Refoufi et al. 2001).

3. Metodika

3.1. Sběr rostlin

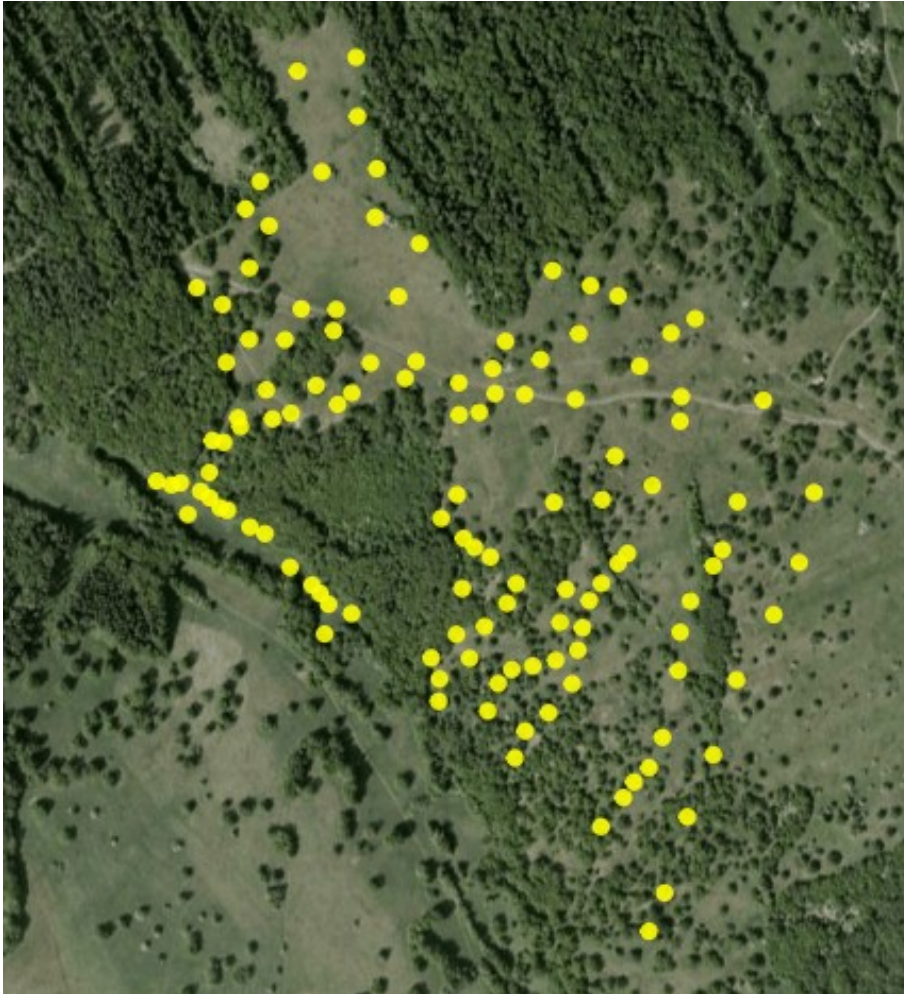
Sběry byly provedeny v letech 2014 - 2016, kdy bylo odebráno celkem 823 rostlin z 224 populací na území České Republiky a okolních států. Jako srovnávací materiál byly zařazeny rostliny z území Chorvatska, Itálie, Slovinska, Srbska, Ukrajiny či Turecka (obrázek 3; příloha 4). Lokality výskytu druhu *Elymus hispidus* byly vytipovány na základě literatury (např. Mahelka et al. 2005; Szczepaniak et al. 2007; Szczepaniak 2009) a databáze (Florabase - <http://florabase.cz/databanka/index.php>, 9. 3. 2015). Výběr záznamů o výskytu druhu *E. hispidus* z databáze byl omezen na nálezy od roku 2000 do současnosti. Druhy *Elymus repens* a *E. caninus* jsou hojné (Florabase - <http://florabase.cz/databanka/index.php>, 9. 3. 2015), a proto lokality jejich výskytu nebyly předem vyhledávány.



Obrázek 3: Mapa lokalit „extenzivního samplingu“.

Na populaci bylo sebráno 5 rostlin ve vzdálenosti 10 m, aby se předešlo sběru klonů. V případě smíšených populací bylo odebráno rostlin 10. Některé z populací byly omezené buď počtem rostlin, nebo svojí rozlohou, tudíž byl sebrán rostlin menší počet. Každá lokalita byla zaměřena pomocí GPS (eTrex 10, Garmin).

Rostliny byly odebrány celé, i s kořeny, a byla z nich vytvořena herbářová položka. U vybraných jedinců byla spodní část stébla s kořeny odstřižena pro kultivaci a následné analýzy (klasická karyologie, GISH, analýza viability pylu). Z rostlin byly dále odebrány 2 - 3 plně vyvinuté klásky na morfometrické analýzy. Klásky byly naloženy do roztoku 70% ethanolu a glycerolu (3:1), kvůli zachování tvaru a velikosti. Dále byly odebrány 2 listy - 1 list na analýzu FCM (dále uchován v mikrotenovém sáčku při teplotě 8°C), a 1 list byl uchován v silikagelu pro případné další molekulární studie.



Obrázek 4: Mapa detailního sběru na lokalitě Čertoryje.

Detailnější studie s odlišnou strategií „samplingu“ byla provedena na lokalitě Čertoryje (NPR Čertoryje, Bílé Karpaty), kde bylo odebráno 124 rostlin ve 14 transektech (transekty 50 m široké, rostliny sbírány po 20 m; obrázek 4). Odebraní jedinci byli zpracováni stejně jako u ostatních lokalit, následně byli však kultivováni všichni na experimentální ploše Botanické zahrady PřF UK (obrázek 5) pro další analýzy.

Dokladové herbářové položky budou uloženy v herbáři Katedry botaniky PřF UK - PRC.



Obrázek 5: Kultivace studovaných druhů na experimentální ploše Botanické zahrady PřF UK.

3.2. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (*Flow cytometry*, FCM) je jedním z relativně rychlých a jednoduchých způsobů jak zjistit velikost genomu (Suda et al. 2006). Propidium jodid se neselektivně vmezuje do dvoušroubovice DNA (tzn. je interkalární). Na rozdíl od toho se barvivo DAPI váže do oblastí DNA bohaté na A-T báze, a proto je relativní velikost genomu z principu menší než absolutní velikost genomu (Suda 2011). U trav je větší podíl A-T bází než C-G bází v DNA, a proto je rozdíl diametrální (Šmarda & Bureš 2012).

Průtoková cytometrie byla použita hlavně k určení absolutní genomové velikosti studovaných rostlin, tudíž jako fluorescenční barvivo byl použit propidium jodid.

Celkem bylo pomocí průtokové cytometrie zanalyzováno 954 rostlin (723 ze střední Evropy a 123 z lokality Čertoryje, 108 rostlin vypěstovaných z obilek pro hybridizace *in situ*).

Z každého odebraného listu byl ustříhnut cca 1 cm² listu a ten byl spolu s cca 0,25 cm² listu standardu rozsekán ostrou žiletkou v 500 µl vychlazeného pufru Otto I (0,1M monohydrát kyseliny citronové, 0,5% Tween 20; Doležel et al. 2007) v Petriho misce. Takto připravený vzorek byl přefiltrován přes technickou tkaninu (Uhelon, velikost oka 42 µm). Ke vzorku byl následně přidán 1 ml barvicího roztoku skládajícího se z pufru Otto II (0,4M

Na₂HPO₄·12H₂O; Doležel et al. 2007), RNázy A (50 µg/ml, Sigma), antioxidantu β-mercaptoethanolu (2 µl/ml, Sigma) a fluorescenčního barviva propidium jodid (50 µg/ml, Sigma). Následně byl vzorek analyzován na průtokovém cytometru Partec CyFlow SL (Partec, Münster, Germany, zelený (532 nm) *solid state* laser jako excitační zdroj) v laboratoři průtokové cytometrie Katedry botaniky PřF UK vždy 2x (2 po sobě jdoucí dny) s propidium jodidem, aby byla ověřena přesnost cytometrické analýzy. Pokud se jednotlivá měření lišila o více než 3 %, byly analyzovány tolikrát, aby se měření lišila do 3 %. CV jednotlivých analýz nepřesahovalo 5 % variance.

Rostliny z NPR Čertoryje byly též podrobeny analýze relativní velikosti genomu (užitím fluorescenčního barviva 4',6-diamidino-2-fenylindol - DAPI) za účelem srovnávání s výsledky analýzy absolutní velikosti genomu. Každá rostlina byla analyzována jednou. Postup pro přípravu vzorků byl stejný jako u předešlého s použitím 1 ml barvicího roztoku složeného z pufru Otto II (0,4M Na₂HPO₄·12H₂O; Doležel et al. 2007), antioxidantu β-mercaptoethanolu (2 µl/ml, Sigma) a fluorescenčního barviva DAPI (4 µg/ml, Sigma). Vlastní analýzy vzorků byly provedeny na průtokovém cytometru CyFlow ML (UV LED 365 nm jako excitační zdroj) v laboratoři průtokové cytometrie Katedry botaniky PřF UK.

Jako interní standard byl použit *Pisum sativum* 'Ctirad' (2C=9.09 pg; Doležel et al. 2007). Mahelka et al. (2005) použili jako interní standard *Triticum aestivum* var. *lutescens* 'Bezostaya 1', jejíž absolutní velikost genomu určili pomocí interního standardu *Vicia faba* (2C=26.9 pg; Doležel et al. 1992) na 34,4 pg. Standard by se však mohl překrývat s vyššími ploidiemi, tudíž se přistoupilo k použití základní „zlatého“ standardu *Pisum sativum* 'Ctirad' (Doležel et al. 2007).

Výsledné histogramy byly vyhodnoceny v programu Partec FloMax 2.4d (Partec GmbH, Münster, Germany).

3.3. Distanční morfometrika

Morfometrika obecně studuje tvar a jeho proměnlivost u organismů. Distanční morfometrika obvykle zkoumá rozměry, nikoli celkový tvar/obrys, tím se zabývá geometrická morfometrika. Díky morfometrice je možno zkoumat rozdíly mezi jednotlivými druhy, poddruhy či varietami (Marhold & Suda 2002).

Pro numerickou morfometriku byly vytvořeny 2 datasety. První dataset, dataset extenzivního „samplingu“, byl tvořen 333 rostlinami z Evropy. Redukce počtu jedinců zde byla provedena kvůli stavu herbářových položek. U části rostlin chyběly některé z měřených znaků (např. spodní pochva listu, část klasu).

Druhý dataset, detailní studie Čertoryje, byl tvořen 124 rostlinami z lokality Čertoryje. Kvůli odlišnému typu „samplingu“ (v souvislosti se zvýšeným výskytem rostlin s vyšší ploidní úrovní a aneuploidů) byly všechny analýzy provedeny samostatně.

Naložené klásky byly vyfoceny pod stereomikroskopem (Olympus SZX12; fotoaparát Olympus E-M 5II, objektiv Olympus DF Plapo 1XPF) nebo v případě větších rozměrů přímo fotoaparátem (Olympus E-M 5II, objektiv Olympus DF Plapo 1XPF) na stativu. Na fotografiích klásků bylo v programu ImageJ (v1.50b; Schneider et al. 2012) změřeno 5 znaků (viz tabulka 1).

Zbylé znaky byly přímo odečteny z herbářových položek (tabulka 1). Pokud u herbářových položek chyběl jen 1 z měřených znaků, byl nahrazen průměrem daného druhu.

Tabulka 1: Soubor znaků měřených na rostlinách a jejich poměrů pro oba datasety. Č=dataset detailní studie Čertoryje, s=dataset extenzivního „samplingu“. Binární znaky: 0=ne, 1=ano; škála tvaru: 1=tupé, 2=hrotité, 3=špičaté.

znak	zkratka	jednotky	dataset
délka 2. horního internodia stébla	L2UI	mm	č, s
délka 2. internodia vřetene klasu	L2IR	mm	č, s
délka 2. spodního internodia stébla	L2LI	mm	s
délka 4. internodia vřetene klasu	L4IR	mm	č, s
délka brv na okrajích listových pochev	LC	mm	č, s
délka klásku bez osiny	LSTwtA	mm	č, s
délka klásku bez osiny:délka 4. internodia vřetene klasu	LSTwtA.L4IR	-	č, s
délka klásku bez osiny:šířka klásku	LSTwtA.WST	-	č, s
délka klásku s osinou	LSTwA	mm	č, s
délka klásku s osinou:délka 4. internodia klásku	LSTwA.L4IR	-	č, s
délka klásku s osinou:šířka klásku	LSTwA.WST	-	č, s
délka klasu s osinou	LSwA	mm	č, s
délka osiny na plevě	LAG	mm	č, s
délka osiny na pluše	LAL	mm	č, s
délka plevy 1	LG1	mm	č, s
délka plevy1:délka 4. internodia klásku	LG1.L4IR	-	č, s
délka plevy1:délka klásku bez osiny	LG1.LSTwtA	-	č, s
délka plevy1:délka klásku s osinou	LG1.LSTwA	-	č, s
chlupatost alespoň jedné listové pochvy	HALS	binární 0/1	č
chlupatost jiné než spodní a horní listové pochvy	HALS	binární 0/1	s
chlupatost listu	HL	binární 0/1	s
chlupatost pochvy spodního listu	HLSL	binární 0/1	s
chlupatost pochvy vrchního listu	HLSU	binární 0/1	s
chlupatost vřetene klasu	HRS	binární 0/1	s
chlupatost líce listu	HUFL	binární 0/1	č

chlupatost okraje listu	HML	binární 0/1	č
chlupatost rub listu	HLFL	binární 0/1	č
počet brv na okrajích listových pochev/1 mm	NoC	počet	č, s
počet klásků	NS	počet	č, s
počet listů na lodyze	NL	počet	č, s
počet pochev s brvami	NoLSwC	počet	č, s
poměr délek plev 1 a 2	DG1.2	-	č, s
poměr délka klásku s osinou:bez osiny	LSTwtA.LSTwA	-	č, s
poměr délka klasu bez osiny: s osinou	LSwtA.LSwA	-	č, s
přítomnost brv na krajích větene klasu	MRS	binární 0/1	s
přítomnost brv na okraji listových pochev	CSM	binární 0/1	č, s
přítomnost osiny na plevě	AG	binární 0/1	č, s
přítomnost osiny na pluše	AL	binární 0/1	č, s
sivost listů	GL	binární 0/1	č, s
šířka 2. horního listu	W2L	mm	č, s
šířka klásku	WST	mm	č, s
trsnatost	Tu	binární 0/1	s
tvár plev	SG	škála 1, 2, 3	č, s
tvár pluch	SL	škála 1, 2, 3	č, s

Všechny takto získané znaky byly zpracovány ve statistickém programu Past (v2.17c; Hammer et al. 2001), R (v. 3.2.3; R Core Team, 2013) s využitím balíčků *ade4*, *class*, *permut*, *scatterplot3d*, *vegan* a *mass*, a pomocí sady funkcí *MorphoTools* (Koutecký 2015). U znaků byla testována normalita, byla vytvořena základní statistika a byly vypočítány korelační koeficienty.

Znaky, které byly těsně a velmi těsně korelované (korelační koeficient větší než 0,95), byly z datasetů vyloučeny. Použité znaky nemají normální rozdělení, proto byly pro statistické analýzy upraveny – zlogaritmovány (Koutecký 2015; Marhold & Suda 2002).

Získaná data byla podrobena následujícím analýzám: analýza hlavních komponent (PCA, *Principal Component Analysis*), kanonická diskriminační analýza (CDA, *Canonical Discriminant Analysis*), klasifikační diskriminační analýza (*Classificatory discriminant analysis*) a na PCA diagram byly naneseny absolutní velikosti genomu pomocí modelu lokální regrese Loess (*locally weighted regression*).

3.4. Klasická karyologie

Karyologie je vědní obor, který se zabývá studiem buněčného jádra, zejména chromozomů, jejich počtu, morfologie a struktury (Krahulcová 1998). Výsledky karyologie (chromozomových počtů) rovněž kalibrují výsledky průtokové cytometrie (absolutní velikosti

genomu), protože některé aneuploidní rostliny mohou mít větší absolutní velikost genomu než rostliny s kompletním počtem chromozomů (Suda et al. 2006).

Příprava chromozomových preparátů byla provedena podle Krahulcové (1998).

Předpůsobení a fixace kořenových špiček bylo provedeno na Katedře botaniky PřF UK v karyologické laboratoři. Uchované vzorky byly přepraveny do karyologické laboratoře v BÚ AVČR Průhonice a s pomocí V. Jarolímové (BÚ AV ČR Průhonice) byly vytvořeny kořenové preparáty a následně spočítány chromozomy.

Z vybraných rostlin pěstovaných na experimentální ploše Botanické zahrady PřF UK byly odebrány cca 1 cm dlouhé kořenové špičky, ve vodě z nich byly opláchnuty nečistoty a poté byly vloženy do eppendorfek s nasyceným roztokem α -bromnaftalenu. Každý preparát byl označen jmenovkou z papírové čtvrtky popsanou obyčejnou tužkou. V takto připraveném předpůsobení byly kořenové preparáty ponechány 3 hodiny při pokojové teplotě.

Poté byly kořenové špičky propláchnuty ve 45% kyselině octové, aby byly odstraněny zbytky α -bromnaftalenu. Následně byly přesunuty do nových eppendorfek s fixační směsí 3:1 96% ethanol a ledová kyselina octová. Ve fixační směsi byly kořenové špičky ponechány přes noc v lednici (8°C), a poté byly přendány do 70% ethanolu a uchovány v lednici pro další zpracování.

Macerace kořenových špiček byla provedena ve směsi 1:1 koncentrované HCl a 96% ethanolu při laboratorní teplotě cca 30 s, poté byl proces macerace zastaven umístěním kořenových špiček do Petriho misky s vodou.

Z Petriho misky byly kořenové špičky po jedné přemístěny na podložní sklo, byla z nich žiletkou oddělena mléčně zakalená část, od té byla odsáta voda. Takto předpřipravený preparát byl obarven zakápnutím barvivem lakto-propiono-orceinem a opatrně pod krycím sklem roztlačen.

Hotové preparáty byly prohlédnuty pod mikroskopem (Olympus BX-61; zvětšení 10x100, imerze) a vhodné metafázní buňky byly vyfoceny.

3.5. Genomová hybridizace *in situ*

Genomová hybridizace *in situ* (Genome *in situ* hybridization, GISH) je hybridizace celkové genomické DNA určitého (obvykle diploidního) druhu na chromozomy jiného druhu (Mandáková 2014). Používá se pro determinaci a popis chromozomového složení jednotlivých rostlin a zjištění rodičovských rostlin s vyšším ploidním stupněm a je zcela průlomovým bodem pro pochopení základních aspektů evoluce rodu *Elymus*. Modelové

GISH studie se zásadními výsledky u rodů *Musa* L. a *Brassica* L. např. potvrdily komplexní hybridní původ (Silva & Souza 2013).

U tetraploidních a hexaploidních kultivarů *Festulolium* Asch. & Graebn. vzniklého hybridizací mezi druhy *Lolium multiflorum* Lam., *Festuca pratensis* Huds. a *Festuca arundinacea* Schreb., byla pomocí GISH zjišťována genomová složení u jednotlivých rostlin a příspěvek zúčastněných rodičovských druhů (Kopecký et al. 2005).

U druhů rodu *Elymus* je studium pomocí GISH ztíženo jejich komplikovaným alopolyploidním původem, protože sondy pro subgenomy musí být získány z většího množství potenciálních diploidních donorů (např. Mahelka & Kopecký 2010). Metoda podstatným způsobem rozšiřuje a doplňuje původní závěry o alopolyploidním původu studovaných zástupců rodu *Elymus* (chloroplastové sekvence *trnL-F*, *GBSSI* či *ITS*) a jednoznačně zpřesňuje zejm. koncepci subgenomů (např. Mahelka & Kopecký 2010; Mahelka et al. 2011). Dalšími příklady studií druhů rodu *Elymus* jsou např. Ellneskog-Staam et al. (2003) nebo Fradkin et al. (2011).

Odběr a fixace části kořenových preparátů byla provedena na Katedře botaniky PřF UK podle instrukcí D. Kopeckého (ÚEB AVČR, Olomouc). Následná příprava preparátů z nafixovaných kořinek a genomové hybridizace *in situ* byly provedeny pod vedením D. Kopeckého v rámci stáže v cytogenetické laboratoři v Centru strukturní a funkční genomiky rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci. Část kořenových preparátů byla celá vytvořena přímo v cytogenetické laboratoři z kořenových špiček vypěstovaných ze zaslaných obilek rostlin pěstovaných v genetické zahradě Botanické zahrady PřF UK.

Genomová hybridizace *in situ*, zkráceně GISH, umožňuje určit morfologii chromozomů a genomové složení. Metodika je založená na předcházejících molekulárních analýzách genomového složení (*ITS*, *GBSSI*; Mahelka et al. 2011; Mahelka & Kopecký 2010; Mason-Gamer 2008), díky kterým byly nalezeny diploidní blízké příbuzné druhy, z jejichž DNA byly vyrobeny sondy pro samotnou GISH: *Pseudoroegneria spicata*, *Hordeum bogdanii*, *Aegilops tauschii* Coss., *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy.

Použité celogenomové sondy byly značeny nepřímo biotinem a digoxigeninem, se stringencí 77 %.

3.5.1 Příprava chromozomových preparátů pro GISH

Z vybraných rostlin pěstovaných na experimentální ploše Botanické zahrady PřF UK byly odebrány cca 1 cm dlouhé kořenové špičky, ve vodě z nich byly opláchnuty nečistoty

a poté byly vloženy do eppendorfek s ledovou vodou umístěných v polystyrenové krabici s drceným ledem. Takto uchované kořínky byly ponechány cca 30 hodin v lednici.

Posléze byly kořenové špičky přeneseny do eppendorfek s fixáží 3:1 - 99,8% bezvodý ethanol a 99,8% ledová kyselina octová. Takto připravené kořenové špičky byly ponechány ve fixáži ve 37°C po 7 dní v inkubátoru (Labnet 311 DS).

Po tomto kroku byly kořenové špičky barveny v 1% acetokarmínu po dobu 2 hodin. Následně byly kořenové špičky vráceny do fixáže a ponechány v mrazáku do dalšího použití.

V olomoucké cytogenetické laboratoři byly kořenové špičky znovu obarveny v 1% acetokarmínu (doba druhého barvení byla 10 min).

Obarvené kořenové špičky byly zmenšeny jen na cca 0,5 mm dlouhý úsek meristematické tkáně, zakápnuty 45% kyselinou octovou, roztláčeny a zahřívány nad lihovým kahanem, aby byla zlikvidována cytoplazma.

Takto připravené preparáty byly po vychladnutí ještě znovu roztláčeny prsty a ponechány cca 4 hodiny na suchém ledu. Poté bylo z preparátu žiletkou odstraněno krycí sklo, a podložní sklo s fixovanými preparáty bylo vloženo do barvicí skleněné nádoby s 45% kyselinou octovou (při laboratorní teplotě, dokud nejsou naskládána všechna skla do nádoby).

Následně byla skla přenesena na 3 minuty do barvicí skleněné nádoby s 45% kyselinou octovou o teplotě 50°C (vodní lázeň, Labnet). Poté byla skla vyndána a ponechána schnout při laboratorní teplotě.

Vhodné hotové preparáty pro GISH byly vybrány užitím mikroskopu (Zeiss Primo Star). Skla byla ponechána při pokojové teplotě do druhého dne.

3.5.2. Příprava celogenomové sondy

Vyizolovaná DNA na celogenomové sondy od diploidních druhů (*Pseudoroegneria spicata*, *Hordeum bogdanii*, *Aegilops tauschii* a *Dasypyrum villosum*) byla laskavě poskytnuta D. Kopeckým z předchozích studií druhů *Elymus*.

V celkovém objemu sondy (20 µl) byly: 4 µl KITu (Biotin-Nick Translation Kit nebo DIG-Nick Translation Kit, Roche, Indianapolis, IN), DNA ve hmotnostním zlomku 1 mg/20 µl sondy a zbytek do 20 µl byl doplněn klávovanou destilovanou vodou. Sondy byly připravovány na ledu, dále byly inkubovány v termocyleru při 15°C 1 hodinu a 30 minut a posléze při 60°C 10 minut (PTC-200 Thermal Cycler, MJ Research).

3.5.3. Příprava mixu

Další etapou přípravy preparátů a navázání sond je příprava stringenčního mixu, který určuje, kolik % DNA sondy se naváže. V tomto případě byla použita 77% stringence.

Poměry chemikálií jsou na 20 μ l mixu - 10 μ l formamidu, 2 μ l 20xSSC, 4 μ l dextransulfátu, 1 μ l sondy I, 1 μ l sondy II a 2 μ l klávované destilované vody.

3.5.4. Denaturace a hybridizace sond na preparáty

Ke každému preparátu bylo přidáno 20 μ l mixu, byl dán do 80°C na 2 minuty a 25 sekund do termocycleru (Eppendorf mastercycler) a poté přesunut do hybridizační komůrky s 37°C (Grant Boekel SM30, Boekel) přes noc.

Dále byla proudem destilované vody smyta krycí skla, preparáty byly ponořeny na 10 minut do 2xSSC, omyty destilovanou vodou a osušeny.

Na skla bylo přidáno 35 μ l 1% blocking reagent a protilátky v poměru 1:200 antidigoxigen C (Anti-DIG-FITC conjugate, Roche) a 1:100 streptoavidin CY3 (streptavidin-Cy3 conjugate, Amersham, Piscataway, NJ) a preparáty byly navraceny zpět do hybridizační komůrky s 37°C (Grant Boekel SM30, Boekel) na 1 hodinu a 30 minut.

Po smytí krycích skel proudem destilované vody a osušení bylo přidáno 12 μ l Vectashield antifade solution s DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Hotové preparáty byly pozorovány a foceny pod mikroskopem (Olympus AX70, zvětšení 10x100, imerze) s kamerou SensiCam (model 370 kl; PCO), barevné fotografie byly zpracovány pomocí software Adobe Photoshop CS5 v12.0 (Adobe Systems) a MicroImage v4.0 (Media Cybernetics, L. P.).

3.6. Barvení pylu

Modifikované Alexandrovo barvení pylu podle Peterson et al. (2010) slouží k určení procentuálního složení abortovaných a viabilních pylových zrn v prašníku rostlin. Toto barvení je vhodné i pro pyl vypreparovaný z herbářových položek a barví fialově cytoplazmu pylových zrn. Není to tedy přesné určení viability, ale „jen“ ověření, zda mají pylová zrna cytoplazmu (Krahulcová 1998). Zeleno-modře obarvená pylová zrna jsou interpretována jako abortovaná, zatímco fialová až červená pylová zrna jsou považována za viabilní. Je pravděpodobné, že hybridní rostliny budou mít větší procento abortovaného pylu než rostliny rodičovské (Krahulcová 1998).

Barvení pylu bylo provedeno modifikovaným Alexandrovým barvením podle Peterson et al. (2010). Složení a příprava barvicího roztoku je shrnuto v tabulce 2. Roztok je skladován v lednici bez přístupu světla.

Prašníky vypreparované z klásků z herbářových položek byly přes noc naloženy do Carnoyovy fixáže (6:3:1 – 96% ethanol, chloroform, ledová kyselina octová) a následně obarveny barvicím roztokem, zahřáty nad lihovým kahanem tak, aby se pylová zrna úplně obarvila a barva prostoupila pletivy prašníků.

Hotové preparáty byly pozorovány a vyfoceny pod mikroskopem (Olympus BX-61; zvětšení 10x10).

Tabulka 2: Složení Alexandrova barvení podle Peterson et al. (2010).

Chemikálie:	Objem:
95% ethanol	10 ml
malachitová zeleň (1% roztok v 95% ethanolu)	1 ml
destilovaná voda	50 ml
glycerol	25 ml
fuchsin bazický (1% roztok v destilované vodě)	5 ml
oranž G (1% roztok v destilované vodě)	0,5 ml
ledová kyselina octová	4 ml
destilovaná voda	4,5 ml

4. Výsledky

4.1. Distribuční charakteristiky

Zahrnuté rostliny byly přiřazeny k taxonům na základě kombinace analýzy absolutní velikosti genomu a vybraných morfologických znaků. Celkem byly sebrány rostliny z 224 populací: 120 populací *E. repens*, 46 *E. hispidus*, 2 samotného hybrida, 6 *E. caninus*, 2 *E. pungens*, 3 *E. pycnanthus* a 45 populací smíšených (pro distribuční „pattern“ viz obrázek 6).

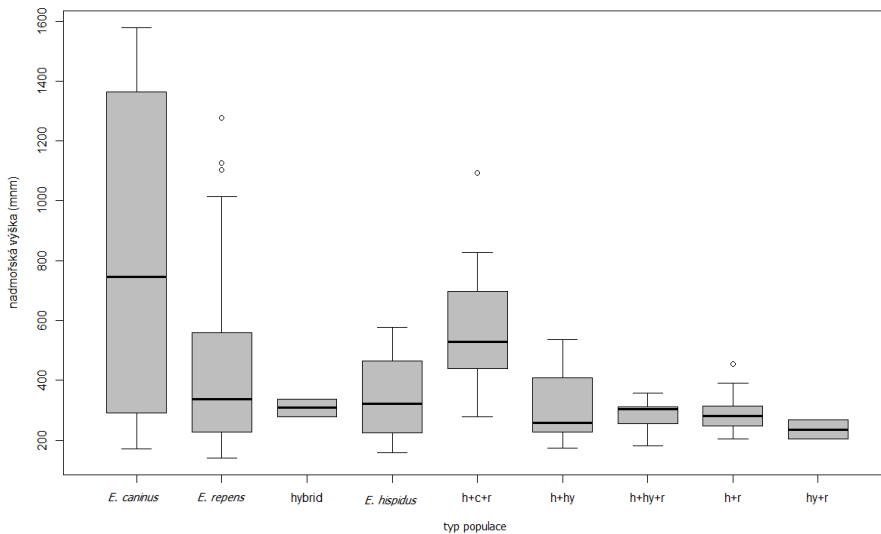


Obrázek 6: Složení populací „dataset extenzivního samplingu“. Žlutě *E. repens*, modře *E. hispidus*, červeně *E. caninus*, zeleně smíšená populace, fialově hybrid, šedě smíšená *E. pungens* a *E. pycnanthus*, černě *E. pungens* a hnědě *E. pycnanthus*.

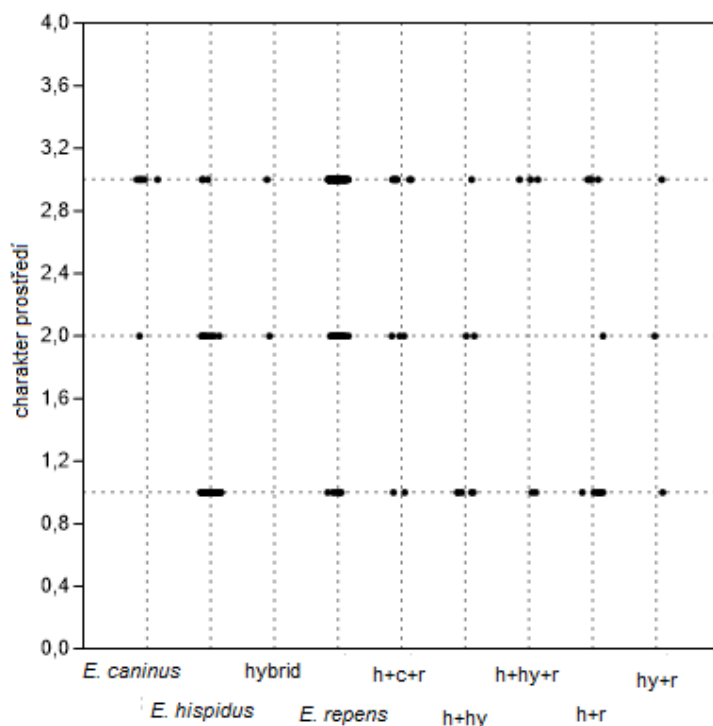
Z údajů o populacích (nadmořská výška, zeměpisná šířka, zeměpisná délka, charakter lokality) byly vytvořeny v programu R a Past popisné statistiky, jejichž výstupy byly boxploty a „jitter plot“ (obrázek 7, 8, 9 a 10). Tyto statistiky byly provedeny na omezeném datasetu 192 populací ze střední Evropy.

Druh *E. caninus* se vyskytuje podél celého výškového gradientu, kde byly rostliny sbírány, druhy *E. hispidus* a *E. repens* se vyskytují častěji v nižších polohách (obrázek 7).

Zahrnuté populace *E. repens* a *E. caninus* se vyskytly ve větší míře na člověkem ovlivněných lokalitách než na původních stanovištích, naopak *E. hispidus* jednoznačně inklinoval ke stanovištím s minimálním (popř. menším) antropickým vlivem (obrázek 8).



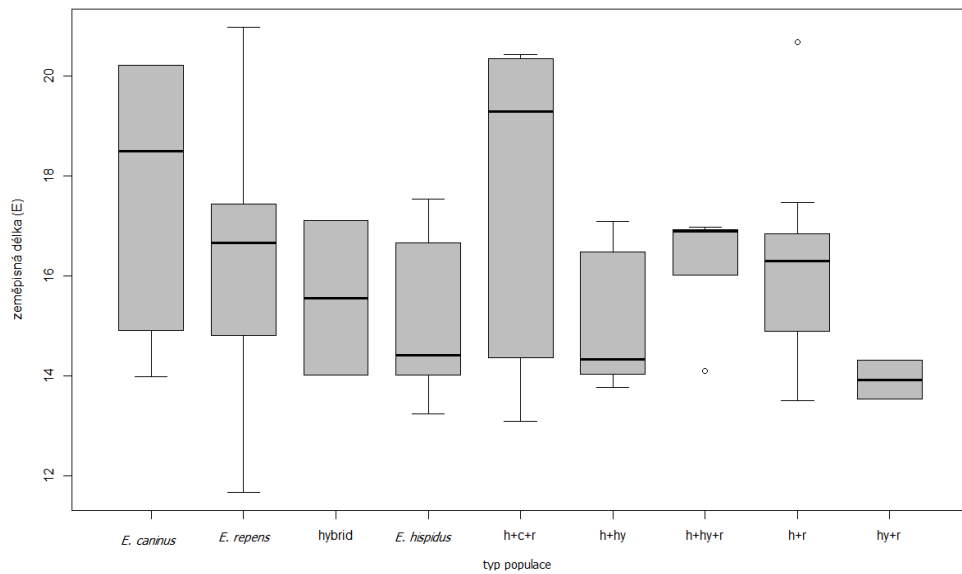
Obrázek 7: Vztah nadmořské výšky a distribuce 192 zahrnutých populací druhů rodu *Elymus* ve střední Evropě.



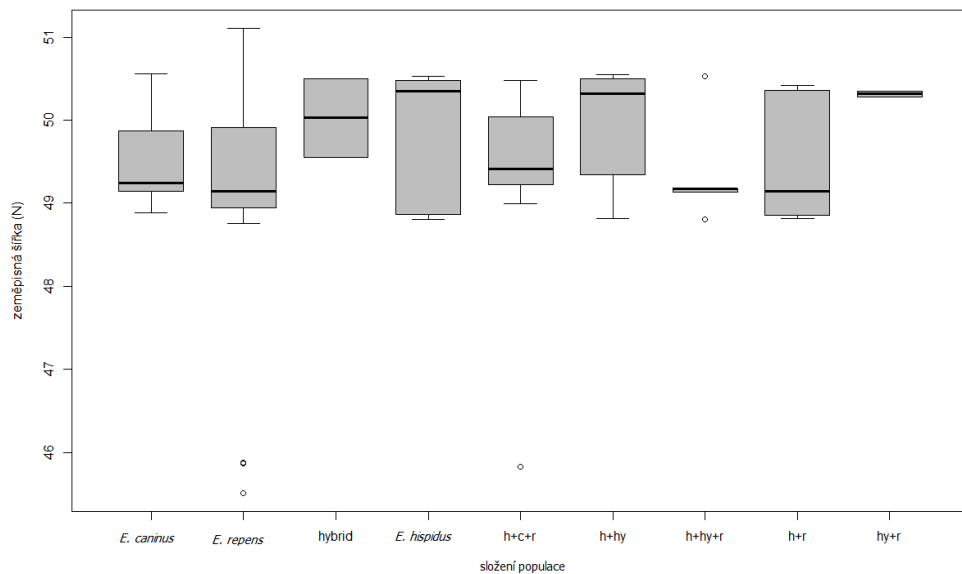
Obrázek 8: Vztah prostředí a distribuce 192 zahrnutých populací druhů rodu *Elymus* ve střední Evropě. 1=minimálně antropicky ovlivněné, 2=menší vliv, 3=synantropní (až ruderální) stanoviště.

Geografický rozdíl v distribuci druhů a populací je vidět na populačních průměrech podél zeměpisné délky (východní; obrázek 9) a zeměpisné šířky (severní; obrázek 10). Smíšené populace jsou přítomné tam, kde se překrývají výskyty rodičovských druhů. Odlehle

hodnoty u zeměpisné šířky u *E. repens* jsou způsobené lokalitami výskytu na jihu Slovinska, které byly ponechány v datasetu (obrázek 10).



Obrázek 9: Vztah zeměpisné délky a distribuce 192 zahrnutých populací druhů rodu *Elymus* ve střední Evropě.



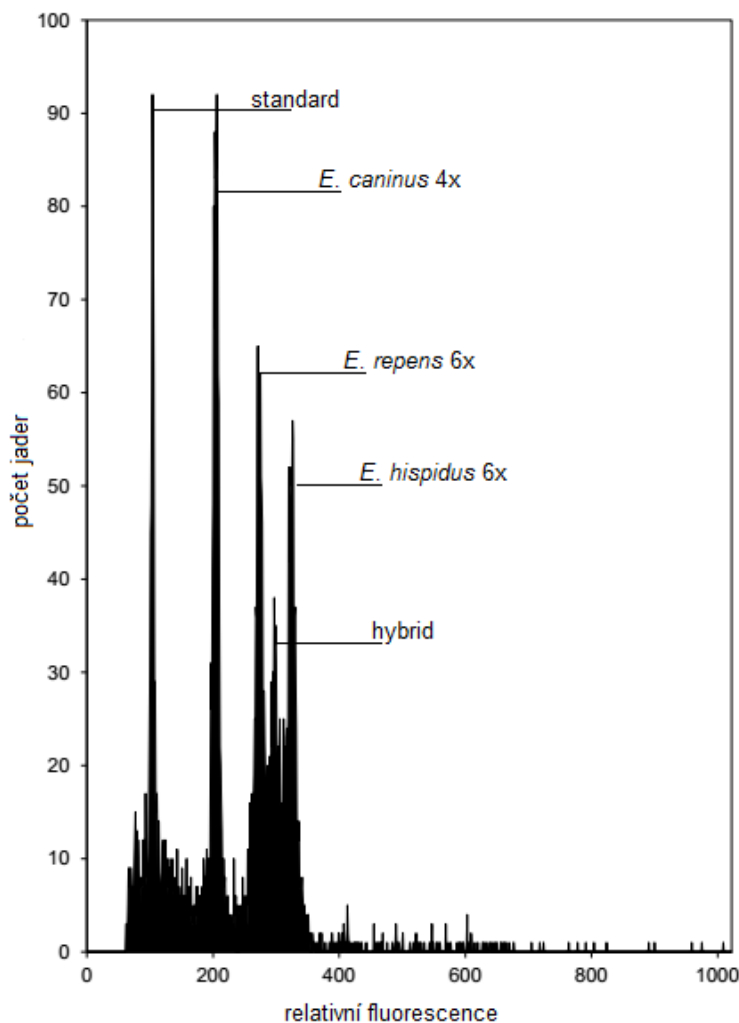
Obrázek 10: Vztah zeměpisné šířky a distribuce 192 zahrnutých populací druhů rodu *Elymus* ve střední Evropě.

4.2. Průtoková cytometrie

Průtokovou cytometrií bylo celkem zanalyzováno 954 rostlin (723 z Evropy, 123 z lokality Čertoryje, 108 rostlin vypěstovaných z obilek) s fluorescenčním barvivem PI a 123 rostlin s fluorescenčním barvivem DAPI (z lokality Čertoryje).

Absolutní genomové velikosti byly vyneseny do boxplotů vytvořených v programu Past (obrázek 13, 14, 15 a 16) a ze simultánní analýzy 4 rostlin studovaných druhů a hybrida byl vytvořen histogram (obrázek 11). Z histogramu smíšeného vzorku je patrná intermediární

absolutní velikost genomu mezidruhového hybridu a rozdíl absolutních genomových velikostí studovaných druhů.



Obrázek 11: Histogram simultánní analýzy absolutních genomových velikostí studovaných druhů a hybridu ve smíšeném vzorku se standardem *Pisum sativum* ‘Ctirad’ (9,09 pg).

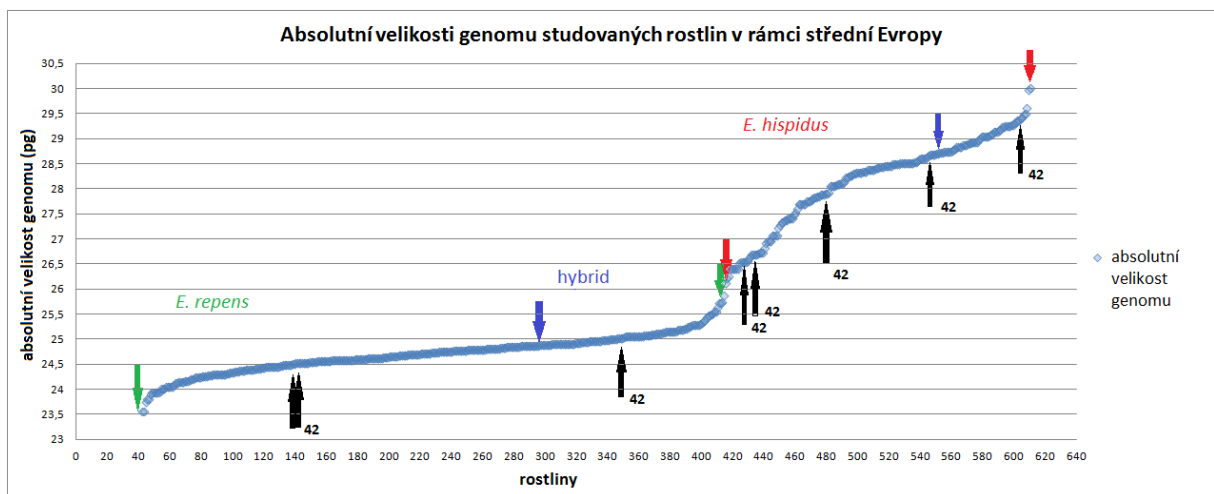
Pro kalibraci absolutních velikostí genomu rostlin měřených s různými standardy byly s interním standardem *Pisum sativum* ‘Ctirad’ (Doležel et al. 2007) změřeny rostliny *E. hispidus* i *E. repens* poskytnuté V. Mahelkou (BÚ AVČR, Průhonice). Tyto rostliny byly měřeny se standardem *Triticum aestivum* var. *lutescens* ‘Bezostaya 1’ (Mahelka et al. 2005), jehož absolutní velikost genomu byla nově kalibrována vůči *Pisum sativum* ‘Ctirad’ (Doležel et al. 2007).

4.2.1. „Dataset extenzivního samplingu“

Průměrné absolutní genomové velikosti \pm směrodatná odchylka studovaných druhů byly určeny z datasetu, který zahrnoval 613 rostlin ze střední Evropy (obrázek 14). Z datasetu byly vyloučeny rostliny s potenciální vyšší nebo nižší DNA ploidní úrovní (odlehle hodnoty

u druhů *E. caninus* a *E. repens*, obrázek 14). Určené absolutní genomové velikosti pro studované druhy jsou: $17,93 \pm 0,33$ pg pro *E. caninus* (4x), $24,71 \pm 0,36$ pg pro *E. repens* (6x) a $28,33 \pm 0,78$ pg pro *E. hispidus* (6x). Z boxplotů je patrné, že jsou odděleny tetraploidní (*E. caninus*) a hexaploidní rostliny (*E. repens*, hybrid, *E. hispidus*) a v přechodu mezi nimi se nenachází žádný pentaploid (např. obrázek 13).

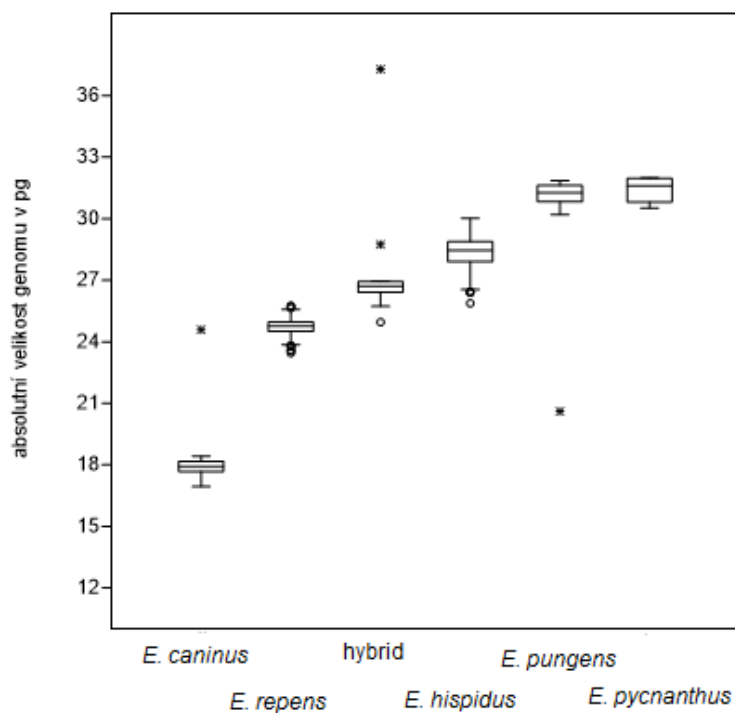
Cytometrická data hexaploidních druhů a hybridu mají spojitý charakter (prokázáno testem one-way ANOVA, Past; obrázek 12). Jako skupina se lehce odděluje druh *E. repens*, hybrid a *E. hispidus* tvoří kompaktní skupinu, což dokazuje i větší hodnota směrodatné odchylky (0,39 pg pro *E. repens* a 0,78 pg pro *E. hispidus*).



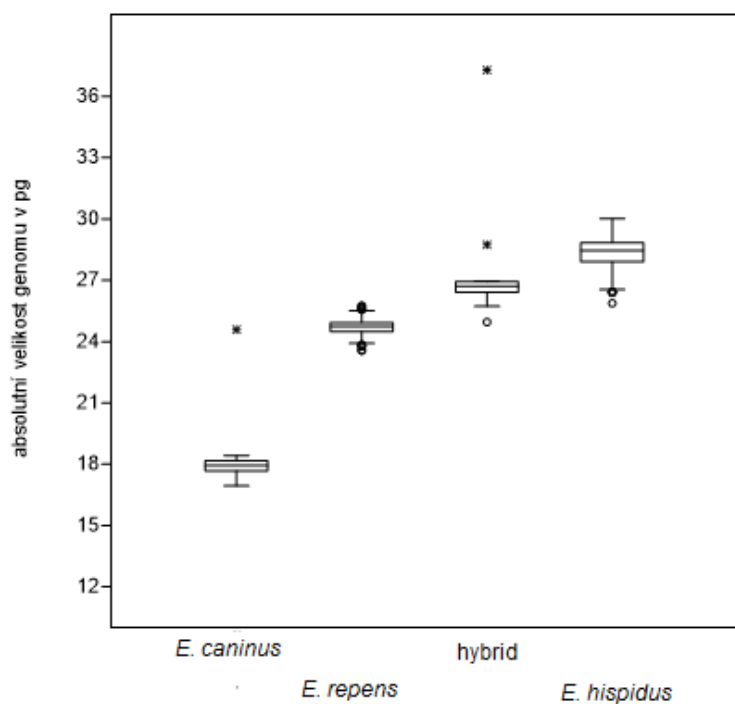
Obrázek 12: Kalibrace absolutní velikosti genomu chromozomovými počty rostlin rodu *Elymus* ze střední Evropy.

Dále byly jako srovnávací materiál do datasetu zařazeny rostliny z Chorvatska, Itálie, Srbska a evropské části Turecka patřící ke studovaným druhům a druhům příbuzným (*E. pungens* a *E. pycnanthus*). Absolutní genomové velikosti rozšířeného datasetu (714 rostlin) byly vyneseny do boxplotu (obrázek 13). Na obrázku 13 je vidět, že byla zachycena jiná DNA ploidní úroveň u druhu *E. pungens* (odlehlá hodnota u *E. pungens*). Druh *E. pungens* je v literatuře uváděn jako oktoploid ($2n=8x=56$ chromozomů; Ellneskog-Staam et al. 2003), tato odlehlá hodnota by mohla odpovídat hexaploidnímu jedinci. Druh *E. pycnanthus* je hexaploid ($2n=6x=42$ chromozomů; Ellneskog-Staam et al. 2003), jak potvrdily i chromozomové počty (strana 44, tabulka 13).

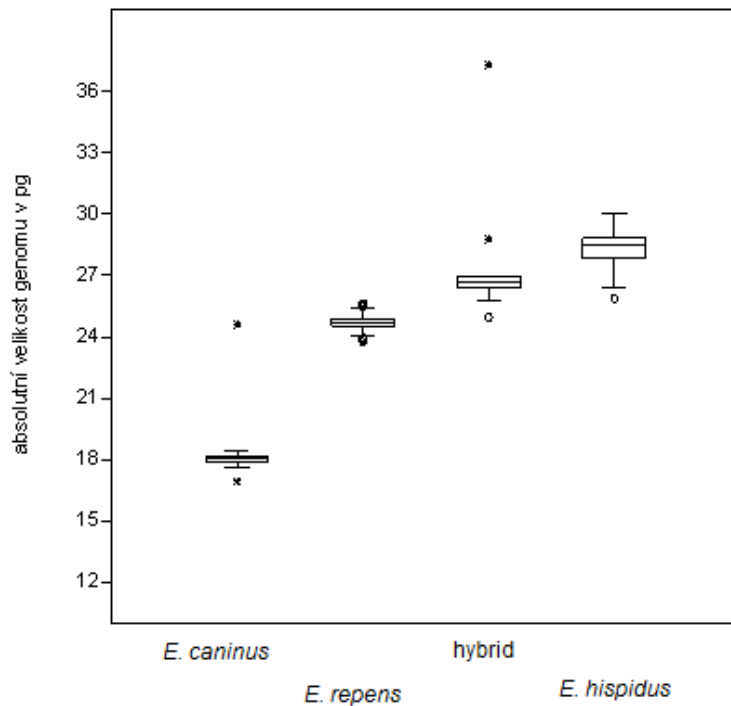
Poslední úpravou datasetu byla jeho redukce na 479 rostlin z České republiky (obrázek 15). Boxploty s vnesenými genomovými velikostmi rostlin z České republiky a střední Evropy se od sebe liší minimálně (obrázek 14 a 15).



Obrázek 13: Srovnání absolutních velikostí genomu (pg) 714 rostlin studovaných druhů rodu *Elymus* z Evropy.



Obrázek 14: Srovnání absolutních velikostí genomu (pg) 613 rostlin studovaných druhů rodu *Elymus* ze střední Evropy.



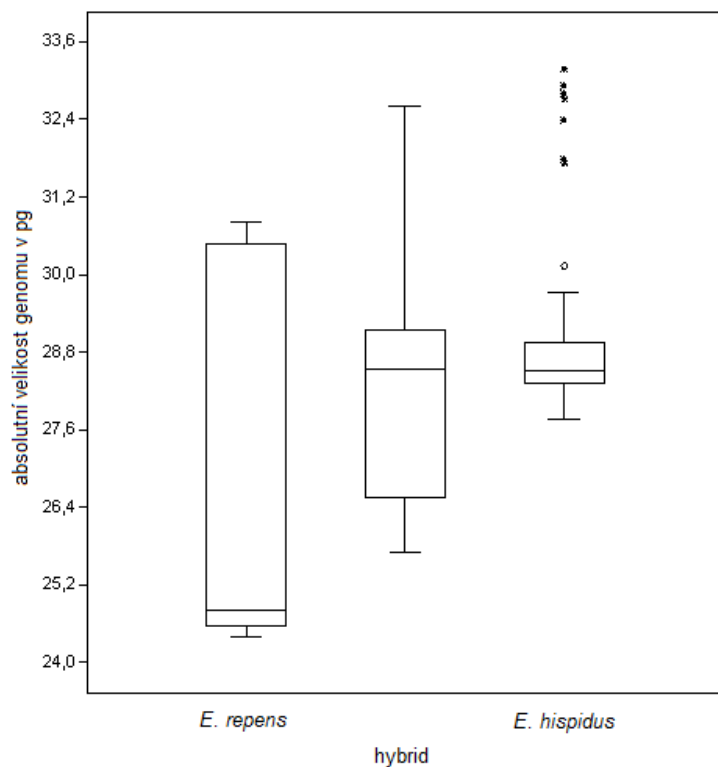
Obrázek 15: Srovnání absolutních velikostí genomu (pg) 479 rostlin studovaných druhů rodu *Elymus* z České republiky.

4.2.2. „Detailní studie Čertoryje“

Průtokovou cytometrií bylo zjištěno rozpětí absolutních genomových velikostí druhů *E. repens*, *E. hispidus* a jejich hybrida od 24,40 pg do 35,44 pg (obrázek 16; 123 rostlin) na lokalitě Čertoryje (modelový hybridní roj). Je tedy pravděpodobné, že velká část rostlin na lokalitě je aneuploidní nebo vyšší ploidní úrovně. Absolutní genomové velikosti byly vyneseny do mapy lokality Čertoryje (obrázek 18).

Počet chromozomů byl spočten u 13 rostlin (tabulka 3). Rostliny T2P1, T2P2, T2P4, T2P6, T2P8 a T2P9 byly spočteny klasickou metodou karyologie ve spolupráci s Vlastou Jarolímovou. U 3 rostlin byla potvrzena vyšší ploidie ($2c=7x=49$ a $2c=8x=56$) a u jedné rostliny je pravděpodobně zachycena aneuploidie ($2c=46$), čemuž odpovídá i odlišná absolutní velikost genomu.

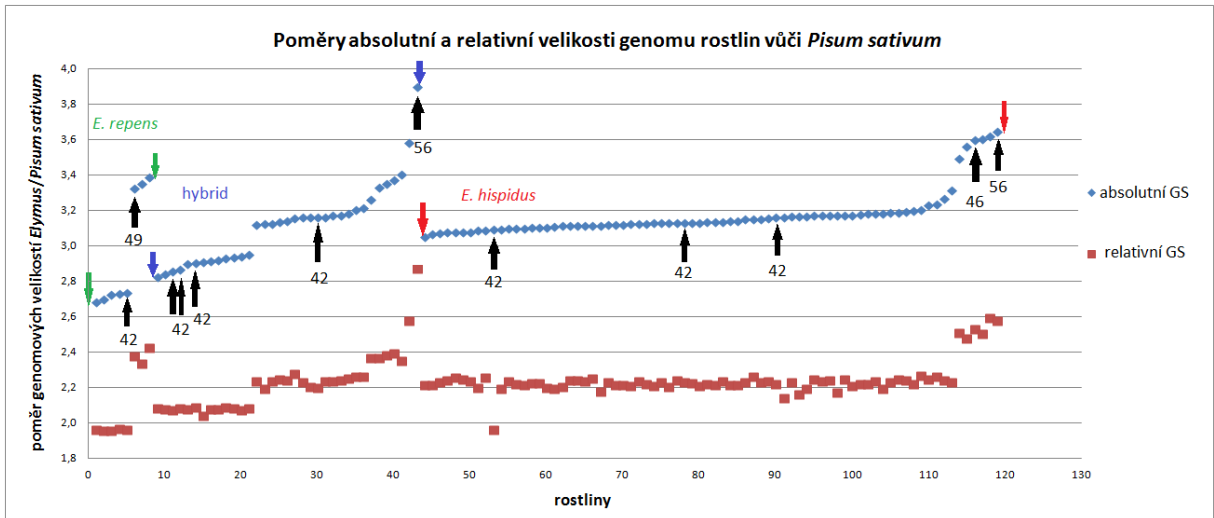
Rostliny z Čertoryjí byly také analyzovány na průtokovém cytometru s použitím fluorescenčního barviva DAPI a výsledné poměry hodnot absolutních a relativních genomových velikostí vůči standardu pro jednotlivé rostliny byly vyneseny do grafu (obrázek 17).



Obrázek 16: Srovnání absolutních velikostí genomu (pg) 123 rostlin studovaných druhů rodu *Elymus* z lokality Čertoryje.

Tabulka 3: Srovnání absolutní genomové velikosti a chromozomových počtů u rostlin *Elymus* z lokality Čertoryje.

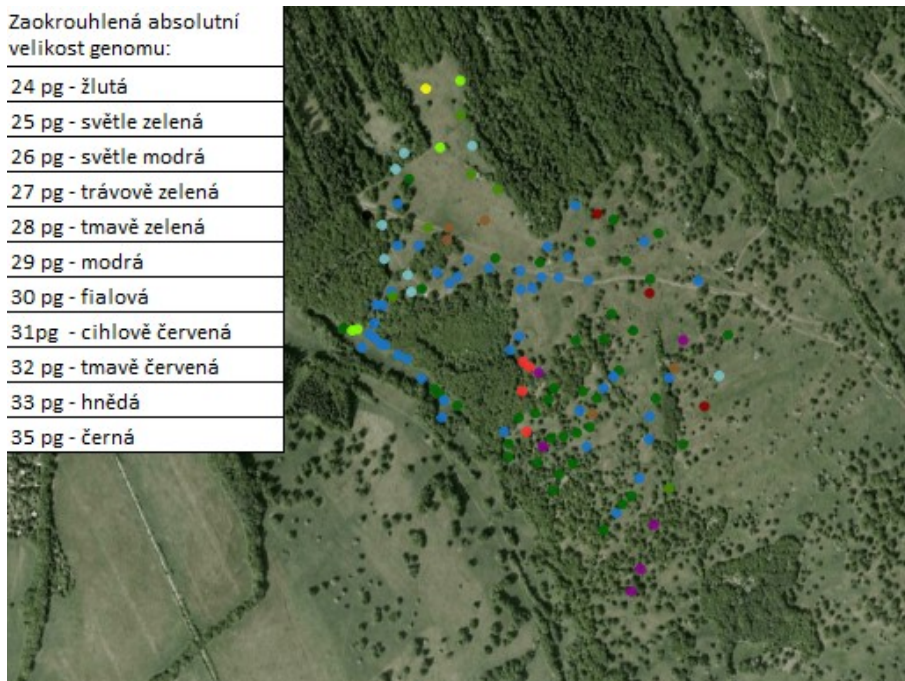
rostlina	druh	GS	počet chromozomů
T2P2	<i>E. repens</i>	24,9 pg	42
T3P10	hybrid	25,9 pg	42
T2P4	hybrid	26,1 pg	42
T2P6	hybrid	26,5 pg	42
T3P9	hybrid	26,7 pg	42
T13P12	hybrid	28,8 pg	42
T2P1	<i>E. hispidus</i>	28,1 pg	42
T2P8	<i>E. hispidus</i>	28,5 pg	42
T2P9	<i>E. hispidus</i>	28,8 pg	42
T14P8	<i>E. repens</i>	30,2 pg	49
T4P5	<i>E. hispidus</i>	32,7 pg	46
T4P4	<i>E. hispidus</i>	33,2 pg	56
T1P1	hybrid	35,4 pg	56



Obrázek 17: Poměry absolutní a relativní genomové velikosti 123 rostlin *Elymus* z Čertoryjí vůči standardu *Pisum sativum*.

Na obrázku 17 je vidět, že u všech rostlin není stejný rozdíl mezi absolutní a relativní velikostí genomu a jsou zde odchylky na jednu i druhou stranu. V rámci druhů a hybridů se liší od mediánu rozdílů mezi absolutní a relativní velikostí genomu o více než 2,5 procenta 25 % rostlin *E. repens*, 11,4 % hybridů a 15,8 % rostlin *E. hispidus*.

Z obrázku 18 je patrné, že rozložení rostlin se stejnou absolutní velikostí genomu nevykazuje žádný výrazný „pattern“.



Obrázek 18: Distribuce absolutních genomových velikostí 123 rostlin na lokalitě Čertoryje.

4.3. Distanční morfometrika

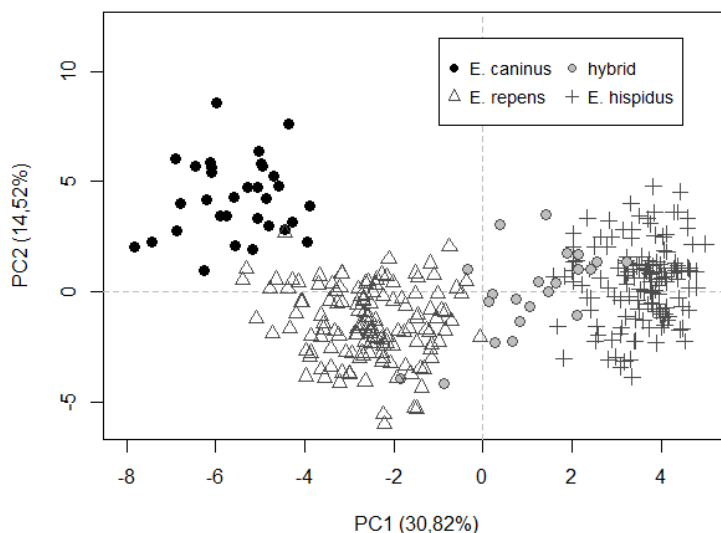
Distanční morfometrice bylo podrobena dohromady 333 rostlin z „datasetu extenzivního samplingu“ a 124 rostlin z „datasetu Čertoryje“. Datasetsy byly analyzovány odděleně kvůli vyšší frekvenci výskytu vyšších ploidních úrovní a aneuploidních jedinců v čertoryjském hybridním roji. Nejprve byla provedena základní statistika v programu R, která posloužila k odstranění chyb v základní matici znaků. Tato statistika ke každému znaku stanovila počet pozorování, průměr, směrodatnou odchylku, percentily znaků: 0 % (minimum), 5 %, 25 % (1. kvartil), 50 % (medián), 75 % (3. kvartil), 95 % a 100 % (maximum). Dalším krokem byl Shapiro-Wilkův test pro určení, zda mají znaky normální rozdělení, a následně byl použit Spearmanův korelační koeficient (pro znaky bez normálního rozdělení). Znaky, které byly těsně a velmi těsně korelované (korelační koeficient větší než 0,95), byly z datasetů vyloučeny. Použité znaky nemají normální rozdělení, proto byly pro statistické analýzy upraveny – zlogaritmovány (Koutecký 2015; Marhold & Suda 2002).

4.3.1. „Dataset extenzivního samplingu“

Žádný znak z datasetu neměl normální rozdělení, proto byla veškerá data upravena pomocí přirozeného logaritmu. V případě, že u některých rostlin dosahoval znak nulových hodnot, byla ke znaku přičtena konstanta (+0,5). Spearmanův korelační koeficient přesáhl hodnotu 0,95 jen v případě znaku AG, který těsně koreloval se znakem LAG, a proto byl z morfometrických analýz vyloučen (zkratky názvů znaků viz volně přiložená tabulka).

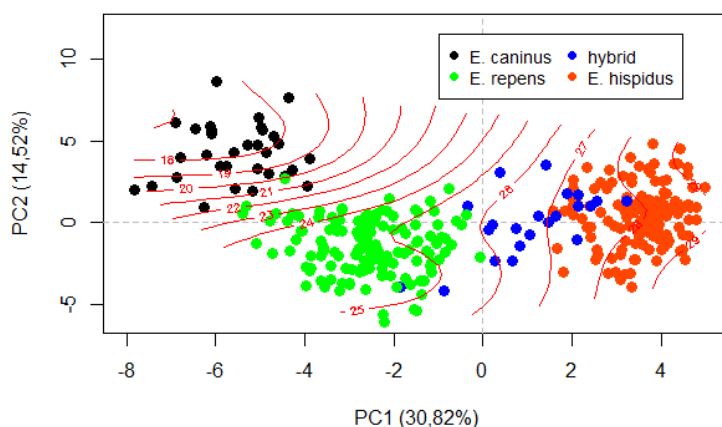
4.3.1.1. Analýza hlavních komponent

Dataset byl podroben analýze hlavních komponent (*Principal component analysis*, PCA). Rostliny byly ke skupinám přiřazeny na základě kombinace vybraných diskriminačních znaků a absolutní velikosti genomu obrázků 19, 20, 21, 22 a 23). V jedné analýze byl ponechán *E. caninus* (obrázek 19) a z druhé byl pro větší přehlednost vyloučen (obrázek 22). Na graf PCA byly pomocí balíčku *vegan* v programu R naneseny souřadnice genomových velikostí (model lokální regrese Loess, obrázek 20).

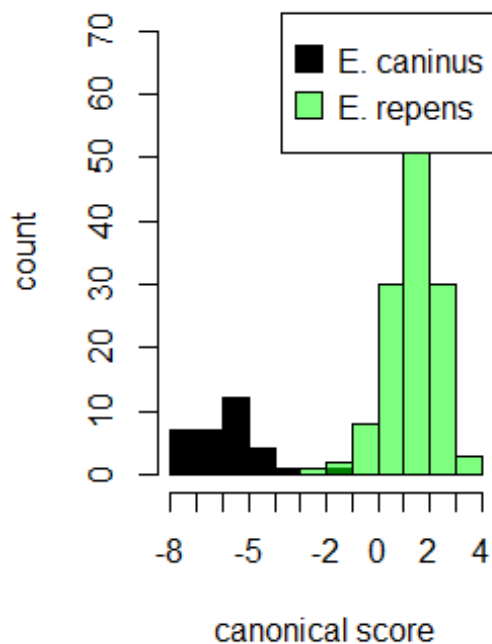


Obrázek 19: Ordinační diagram objektů z analýzy hlavních komponent (PCA) 333 jedinců s 39 znaky (včetně *E. caninus*). První osa vyjadřuje 30,82 % a druhá osa 14,52 % celkové variability.

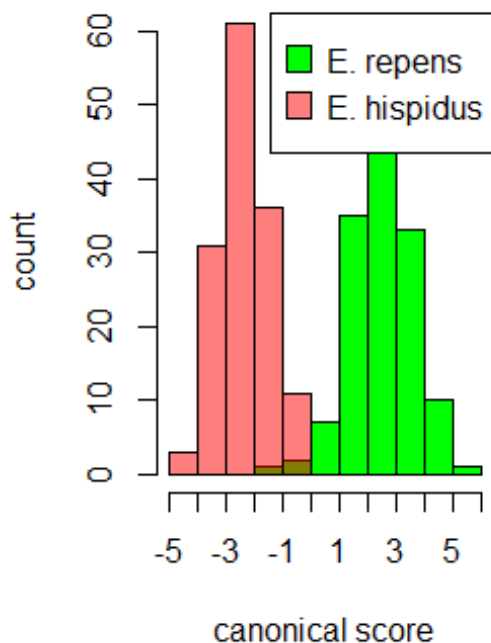
Analýza PCA 333 jedinců poměrně jasně oddělila studované druhy na základě 39 znaků. Část hybridů se překrývá s rodičovskými druhy (zejm. s *E. hispidus*), jinak jsou víceméně kontinuálně rozloženi. První PCA osa vyjadřuje 30,82 %, druhá osa 14,52 % a třetí osa 8,97 % celkové variability. Znaky, které mají vliv na 1. a 2. PCA osu jsou znázorněny na obrázku 21 a „eigenvalues“ jednotlivých znaků jsou vypsány v příloze 1. První PCA osu ovlivňují nejvíce znaky: CSM, NoC, NoLSwC a SG. Druhou PCA osu ovlivňují nejvíce znaky: L4IR, LSTwA, L2IR, LSwA, LG1.LSTwA a LSTwtA (zkratky názvů znaků viz volně přiložená tabulka).



Obrázek 20: Ordinační diagram objektů z analýzy hlavních komponent (PCA) 333 jedinců s 39 znaky (včetně *E. caninus*) s nanesenými vrstevnicemi absolutních genomových velikostí.



Obrázek 27: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy 333 rostlin pro druhy *E. caninus* a *E. repens*.



Obrázek 28: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy 333 rostlin pro druhy *E. repens* a *E. hispidus*.

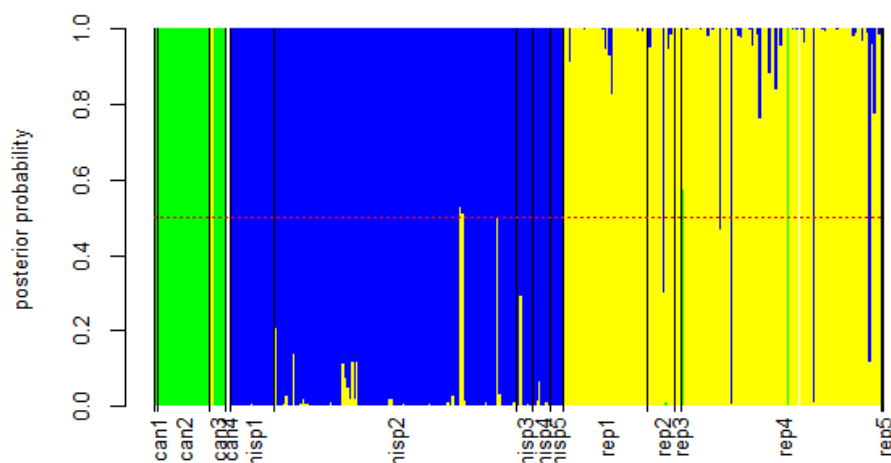
4.3.1.3. Klasifikační diskriminační analýza

Klasifikační diskriminační analýza byla provedena s redukováným počtem znaků stejně jako kanonická diskriminační analýza. Podobně jako u analýzy hlavních komponent, „dataset extenzivního samplingu“ byl rozdělen na 2 datasey – s a bez *E. caninus*. Výsledek „one-leave-out classification“ a křížového ověření („cross-validation“) včetně druhu *E. caninus* (311 rostlin bez hybridů) byl zaznamenán do „classification matrix“ (tabulka 4, 5

a 6) a jako grafy (obrázek 29 a 30). Úspěšnost určení rostlin byla více jak 80 % u všech studovaných druhů a hybridy byly přiřazeny k oběma rodičovským druhům, nikoli k *E. caninus* (tabulka 5 a 6).

Tabulka 4: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy 311 rostlin, „one-leave-out classification“. Hybridy byly vyloučeny.

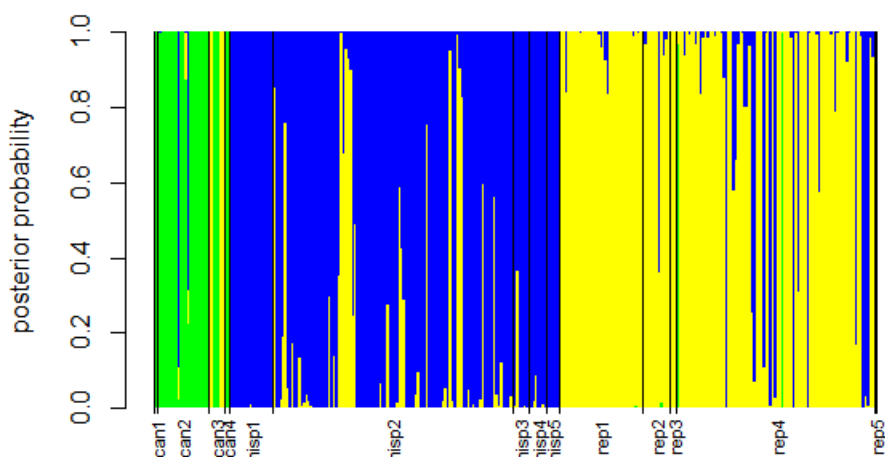
Taxon	<i>E. caninus</i>	<i>E. repens</i>	<i>E. hispidus</i>	celkový počet	% správně
<i>E. caninus</i>	30	2	0	32	93,8
<i>E. hispidus</i>	0	2	140	142	98,6
<i>E. repens</i>	2	129	6	137	94,2



Obrázek 29: Grafický výstup klasifikační diskriminační analýzy 311 rostlin 3 studovaných druhů „one-leave-out classification“.

Tabulka 5: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy 311 rostlin, křížového ověření. Hybridy byly vyloučeny.

Taxon	<i>E. caninus</i>	<i>E. repens</i>	<i>E. hispidus</i>	celkový počet	% správně
<i>E. caninus</i>	27	3	2	32	84,4
<i>E. hispidus</i>	0	15	127	142	89,4
<i>E. repens</i>	2	121	14	137	88,3



Obrázek 30: Grafický výstup klasifikační diskriminační analýzy 311 rostlin 3 studovaných druhů, křížové ověření.

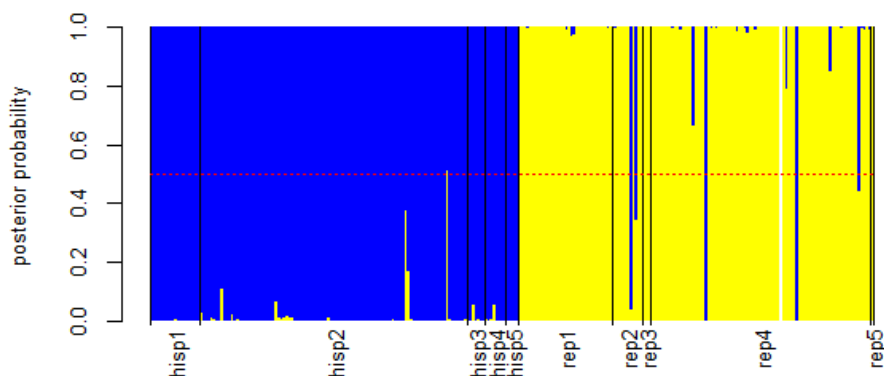
Tabulka 6: Klasifikace hybridů, výsledek klasifikační diskriminační analýzy, celkem 333 rostlin.

Taxon	<i>E. caninus</i>	<i>E. repens</i>	<i>E. hispidus</i>	celkový počet	% správně
hybrid	0	8	14	22	0

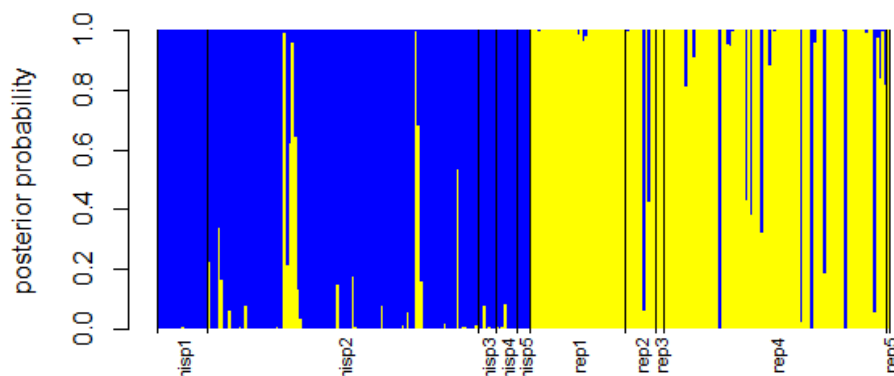
Jako další krok byla vytvořena klasifikační diskriminační analýza bez druhu *E. caninus* (279 rostlin bez hybridů). Výsledek „one-leave-out classification“ a křížového ověření („cross-validation“), včetně druhu *E. caninus*, byl zaznamenán do „classification matrix“ (tabulka 7, 8 a 9) a jako grafy (obrázek 31 a 32). V takto omezeném datasetu byla úspěšnost určení obou druhů přes 90 %.

Tabulka 7: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy 279 rostlin, „one-leave-out classification“.

Taxon	<i>E. repens</i>	<i>E. hispidus</i>	celkový počet	% správně
<i>E. hispidus</i>	1	141	142	99,3
<i>E. repens</i>	132	5	137	96,4

**Obrázek 31:** Grafický výstup klasifikační diskriminační analýzy 301 rostlin 2 studovaných druhů, „one-leave-out classification“.**Tabulka 8:** Výsledek klasifikační diskriminační analýzy 279 rostlin, křížového ověření.

Taxon	<i>E. repens</i>	<i>E. hispidus</i>	celkový počet	% správně
<i>E. hispidus</i>	7	135	142	95,1
<i>E. repens</i>	126	11	137	92,0

**Obrázek 32:** Grafický výstup klasifikační diskriminační analýzy 301 rostlin 2 studovaných druhů, křížové ověření.

Tabulka 9: Klasifikace hybridů, výsledek klasifikační diskriminační analýzy, celkem 301 rostlin.

Taxon	<i>E. repens</i>	<i>E. hispidus</i>	celkový počet	% správně
hybrid	4	18	22	0

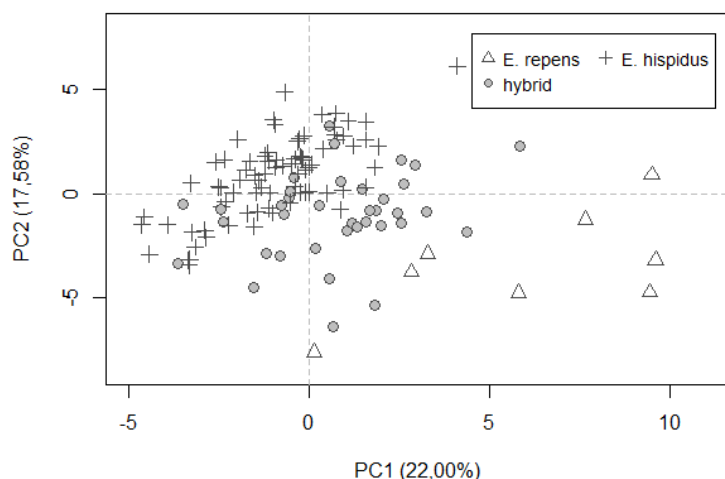
4.3.2. „Detailní studie Čertoryje“

Většina znaků z datasetu neměla podobně jako u extensivního datasetu normální rozdělení, proto byly všechny znaky upraveny pomocí přirozeného logaritmu. V případě, že u některých rostlin dosahoval znak nulových hodnot, byla ke znaku přičtena konstanta (+0,5). Spearmanův korelační koeficient přesáhl hodnotu 0,95 v případě znaku AL, který těsně koreloval se znakem LAL, LSTwtA.L4IR, který těsně koreloval se znakem LSTwA.L4IR, LG1.LSTwtA, který těsně koreloval se znakem LG1.LSTwA, LSTwtA.WST, který těsně koreloval se znakem LSTwA.WST, a proto byly z morfometrických analýz vyloučeny (zkratky názvů znaků viz volně přiložená tabulka).

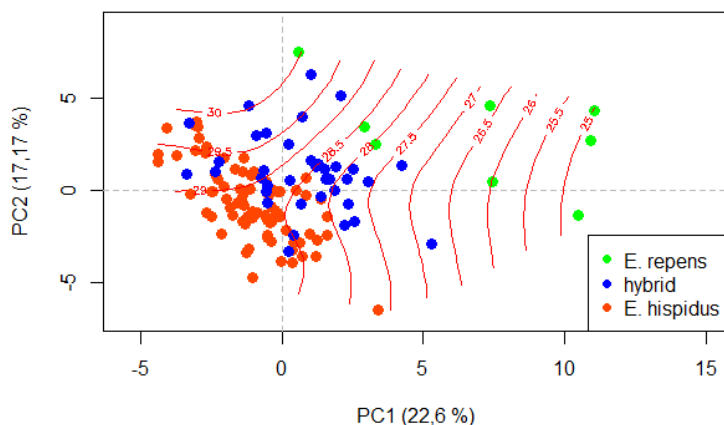
4.3.2.1. Analýza hlavních komponent

Na základě vybraných diskriminačních znaků určené rostliny byly podrobeny analýze hlavních komponent. První osa vyjadřuje 22,0 %, druhá 17,58 % a třetí 10,44 % celkové variability (obrázek 33). Na graf PCA byly pomocí balíčku *vegan* v programu R naneseny souřadnice absolutních genomových velikostí (model lokální regrese Loess, obrázek 34).

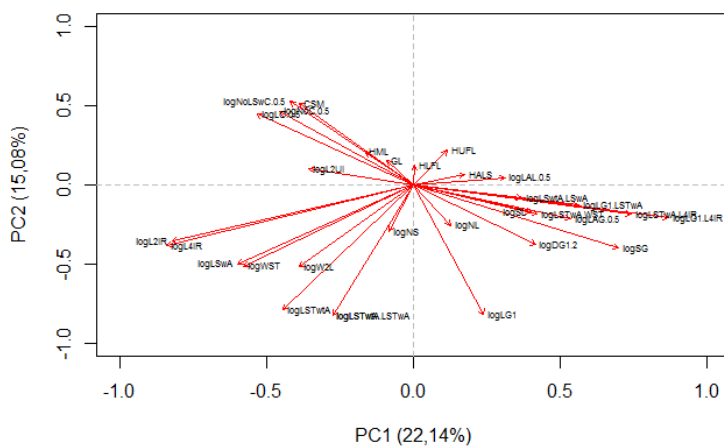
Znaky, které mají největší vliv na 1. a 2. PCA osu, jsou znázorněny na obrázku 35. První PCA osu ovlivňují nejvíce znaky: LG1.L4IR, L4IR, L2IR, LSTwA.L4IR a SG. Druhou PCA osu ovlivňují nejvíce znaky: LSTwtA.LSTwA, logLSTwA, LG1 a LSTwtA (příloha 3; zkratky názvů znaků viz volně přiložená tabulka).



Obrázek 33: Ordinační diagram objektů z analýzy hlavních komponent (PCA) 124 jedinců s 32 znaky. První osa vyjadřuje 22,0 % celkové variability, druhá osa vyjadřuje 17,58 % celkové variability.



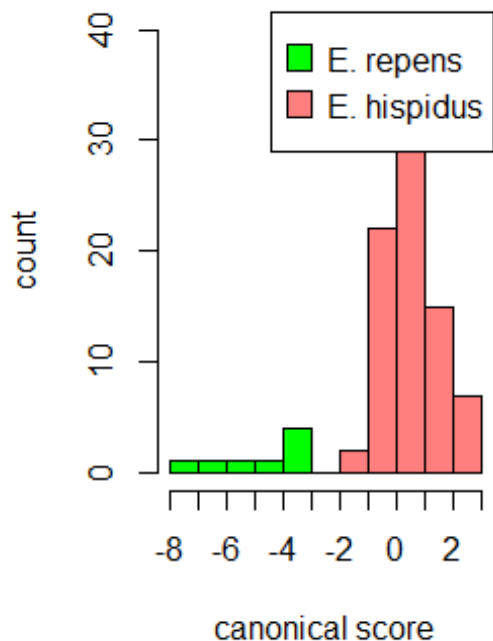
Obrázek 34: Ordinační diagram objektů z analýzy hlavních komponent (PCA) 124 jedinců s 32 znaky. První osa vyjadřuje 22,0 % celkové variability, druhá osa vyjadřuje 17,58 % celkové variability



Obrázek 35: Vliv 32 znaků na PCA osy (PCA se 124 jedinci).

4.3.2.2. Kanonická diskriminační analýza

Pro diskriminační analýzy byly vyloučeny znaky, které přispěly k zařazení rostlin do příslušných skupin a znaky, které byly pro druh konstantní (CMS, HALS, HUFL, HLFL, HML, SG, SL, AG, NoC, NoLSwC a LC; zkratky názvů znaků viz volně přiložená tabulka). Rodičovské druhy se, i přes pravděpodobně vyšší ploidní úroveň v rámci obou druhů, od sebe oddělily (obrázek 36).



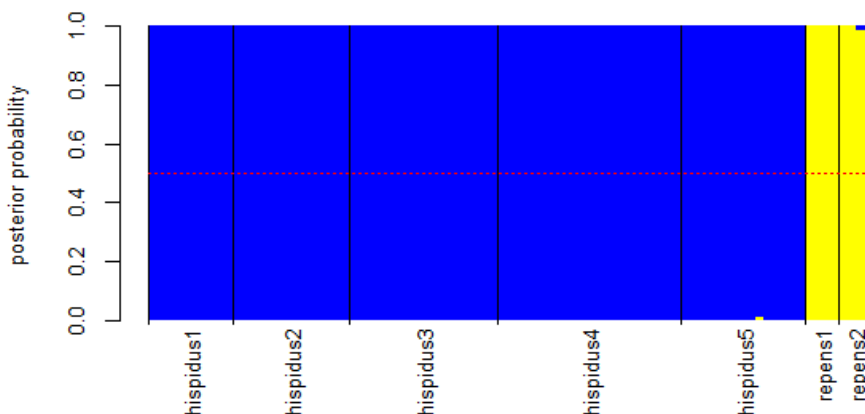
Obrázek 36: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy 124 rostlin pro druhy *E. repens* a *E. hispidus*.

4.3.2.3. klasifikační diskriminační analýza

Klasifikační diskriminační analýza byla provedena s redukováným počtem znaků jako kanonická diskriminační analýza. Výsledek „one-leave-out classification“ a křížového ověření („cross-validation“) byl zaznamenán do „classification matrix“ (tabulka 10, 11 a 12) a jako grafy (obrázek 37 a 38). Druh *E. hispidus* byl určen správně, druh *E. repens* z 62,5 % (tabulka 11).

Tabulka 10: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy 87 rostlin, „one-leave-out classification“.

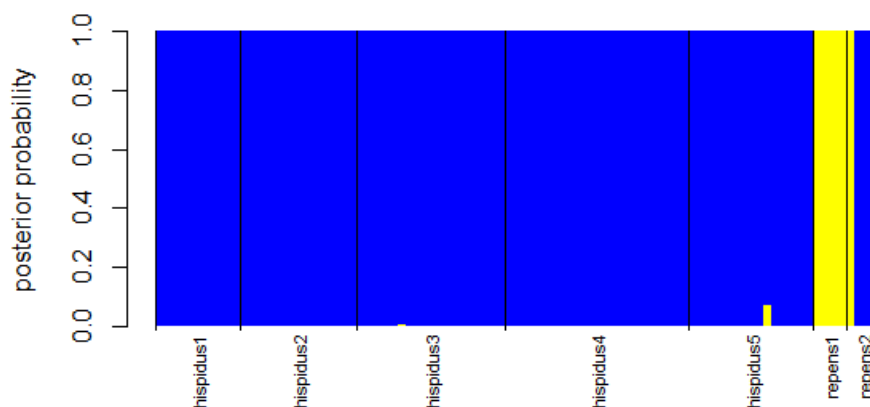
Taxon	<i>E. repens</i>	<i>E. hispidus</i>	celkový počet	% správně
<i>E. hispidus</i>	0	79	79	100
<i>E. repens</i>	8	0	8	100



Obrázek 37: Grafický výstup klasifikační diskriminační analýzy 2 studovaných druhů, 87 rostlin, „one-leave-out classification“.

Tabulka 11: Výsledek klasifikační diskriminační analýzy 87 rostlin, bez hybridních rostlin, křížové ověření.

Taxon	<i>E. repens</i>	<i>E. hispidus</i>	celkový počet	% správně
<i>E. hispidus</i>	0	79	79	100
<i>E. repens</i>	5	3	8	62,5

**Obrázek 38:** Grafický výstup klasifikační diskriminační analýzy 2 studovaných druhů, 87 rostlin, křížové ověření.**Tabulka 12:** Klasifikace hybridů, výsledek klasifikační diskriminační analýzy 124 rostlin.

Taxon	<i>E. repens</i>	<i>E. hispidus</i>	celkový počet	% správně
hybrid	7	30	37	0

4.4. Genomová hybridizace *in situ*

V rámci rodu *Elymus*, a celkově tribu *Triticeae*, kvůli jejich alopolyloidnímu původu (Mason-Gamer 2013), jsou části jejich genomu, u diploidů samostatné genomy, nazývány subgenomy. Kromě chromozomových počtů byly díky GISH získány informace o genomovém složení částí rostlin. Bylo potvrzeno genomové složení druhu *Elymus caninus*, který je tetraploidní ($2n=4x=28$) a obsahuje 2 subgenomy od rodu *Pseudoroegneria* a 2 subgenomy od rodu *Hordeum* (obrázek 39 a tabulka 13; Mason-Gamer et al. 2010; Orgaard & Ananthawat-Jónsson 2001). Dalším zásadním pozorováním byly rekombinace v subgenomovém složení hybridů (obrázek 41), kompozice genomu rostlin s vyšší ploidií (tabulka 13), počet chromozomů u druhu *E. pycnanthus* ($2n=6x=42$; obrázek 44) a potvrzení hexaploidního počtu chromozomů jedince *E. pungens* ($2n=6x=42$), který se lišil absolutní velikostí genomu od zbylých rostlin druhu, které jsou oktoploidní ($2n=8x=56$). Zároveň byla potvrzena genomová složení druhů *E. repens* a *E. hispidus* (obrázek 40, 42 a 43; v souladu s Mahelka & Kopecký 2010, Mahelka et al. 2011).

Rostliny *E. caninus* nemají rekombinace mezi genomy, rostliny *E. hispidus* mají rekombinací mnohem více, ale aby byly správně interpretovány, musí být většina rostlin otestována další kombinací genomových sond. Na 2 rostliny *E. hispidus* vypěstované z obilek

byly použity všechny 4 genomové sondy a byly u nich zjištěny všechny rekombinace (tabulka 14, rostliny R8/T12P3 a R10/T3P5, obrázek 42 a 43).

Tabulka 13: Chromozomové počty a subgenomové složení pěstovaných rostlin. Subgenomy značeny: Pse=*Pseudoroegneria*, Das=*Dasyphyrum*, Hb=*Hordeum* a Aet=*Aegilops*, x=sonda se nenařázala, - =sonda nebyla testována.

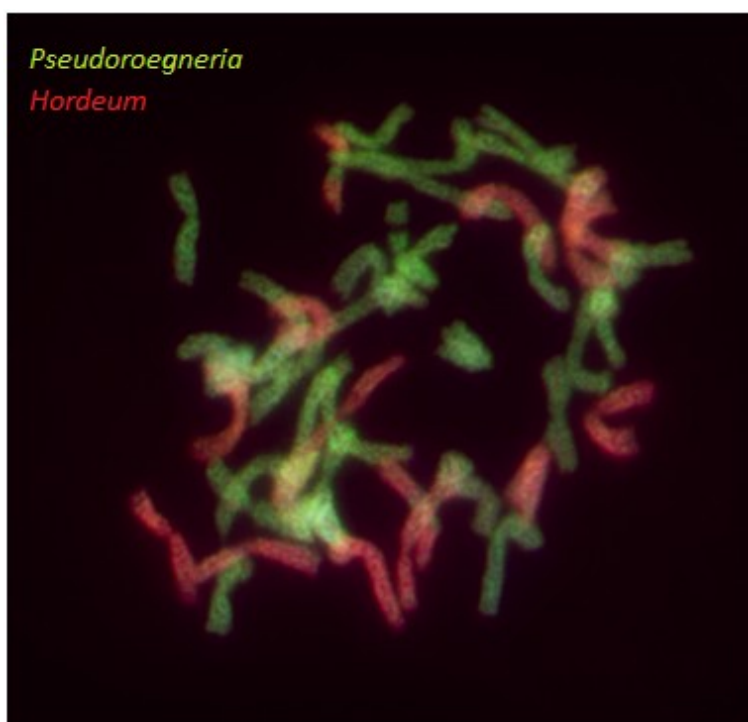
označení	rostlina	druh	GS (pg)	2n	Pse	Das	Hb	Aet	pouze DAPI
RP	CS24a	<i>E. caninus</i>	18,1	28	14	-	14	-	0
RR	CS24c	<i>E. caninus</i>	17,6	28	14	-	14	-	0
RC	CS19c	<i>E. caninus</i>	18,2	28	-	x	-	x	28
1B	Ch16-12e	<i>E. pungens</i>	20,6	42	14	-	x	-	28
RA	7 MO14	<i>E. repens</i>	24,5	42	-	x	-	x	42
1E	CS22a	<i>E. repens</i>	24,5	42	28	-	14	-	0
1F	MO24c	<i>E. repens</i>	25,0	42	28	-	14	-	0
1S	T3P10	hybrid	25,9	42	-	7	-	7	28
RK	O2	hybrid	26,5	42	-	7	-	7	28
1i	MO5b	hybrid	26,7	42	-	7	7	-	28
1U	T3P9	hybrid	26,7	42	21	7	-	-	14
RD	T13P12	hybrid	28,8	42	14	14	-	-	14
RB	T1P1	hybrid	35,4	56	24	-	4	-	28
1J	Ch16-14b	<i>E. hispidus</i>	27,9	42	14	14	-	-	14
RM	Ukr2B	<i>E. hispidus</i>	28,6	42	14	-	x	-	28
1L	CS16b	<i>E. hispidus</i>	29,3	42	14	14	-	-	14
1AC	T14P8	<i>E. repens</i>	30,2	49	28	-	7	-	14
1Q	Ch16-7a	<i>E. pycnanthus</i>	31,9	42	14	-	-	-	28
1AG	T4P5	<i>E. hispidus</i>	32,7	46	14	13	-	-	19
1AJ	T4P4	<i>E. hispidus</i>	33,2	56	-	14	-	14	28

Tabulka 14: Chromozomové počty a subgenomové složení rostlin vypěstovaných z obilek. Subgenomy značeny: Pse=*Pseudoroegneria*, Das=*Dasyphyrum*, Hb=*Hordeum* a Aet = *Aegilops*, x=sonda se nenařázala, - =sonda nebyla testována.

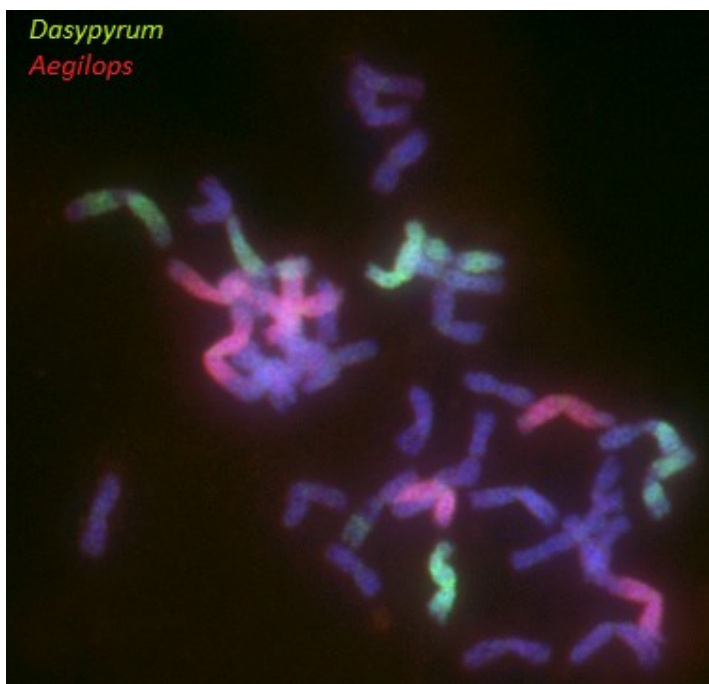
rostlina	druh	GS (pg)	druh rodič	GS (pg) rodič	2n	Pse	Das	Hb	Aet	pouze DAPI
R8/T12P3	<i>E. hispidus</i>	28,7	<i>E. hispidus</i>	31,8	42	14	14	-	14	0
R10/T3P5	<i>E. hispidus</i>	28,7	<i>E. hispidus</i>	29,4	42	14	14	-	14	0
R12/Ukr 2B	<i>E. hispidus</i>	30,3	<i>E. hispidus</i>	29,4	42	14	-	x	-	28
R14/1Da	<i>E. hispidus</i>	28,8	<i>E. hispidus</i>	28,6	42	14	-	x	-	28
R19/CS19b	<i>E. caninus</i>	17,9	<i>E. caninus</i>	17,9	28	14	-	14	-	0
R5/MO4b	<i>E. hispidus</i>	29,4	<i>E. hispidus</i>	28,1	42	14	14	x	-	14
R7/R4c	<i>E. hispidus</i>	28,4	<i>E. hispidus</i>	27,7	42	14	14	x	-	14
R9/T1P1	hybrid	32,8	hybrid	35,4	49	22	13	-	-	14
R1/CS1h	<i>E. hispidus</i>	28,9	<i>E. hispidus</i>	28,5	42	14	14	x	-	14
R2/CS1k	<i>E. hispidus</i>	28,7	<i>E. hispidus</i>	28,3	42	14	14	x	-	14



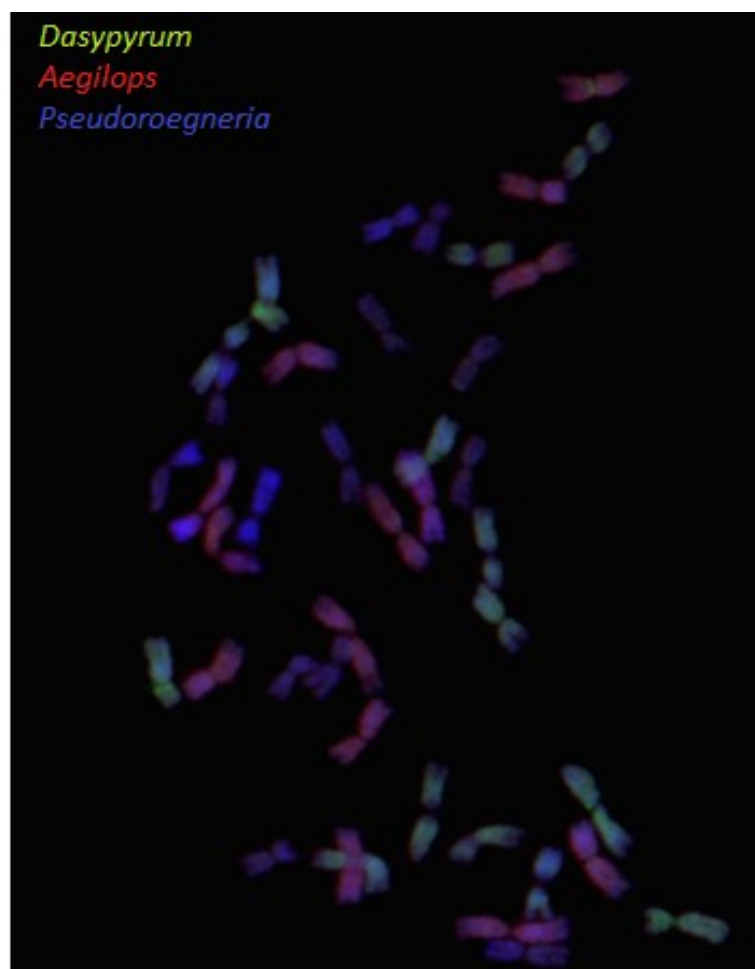
Obrázek 39: GISH se sondami *Pse* - zelená, značená digoxigeninem, a *Hb* - červená, značená biotinem, na rostlině CS24a *E. caninus*.



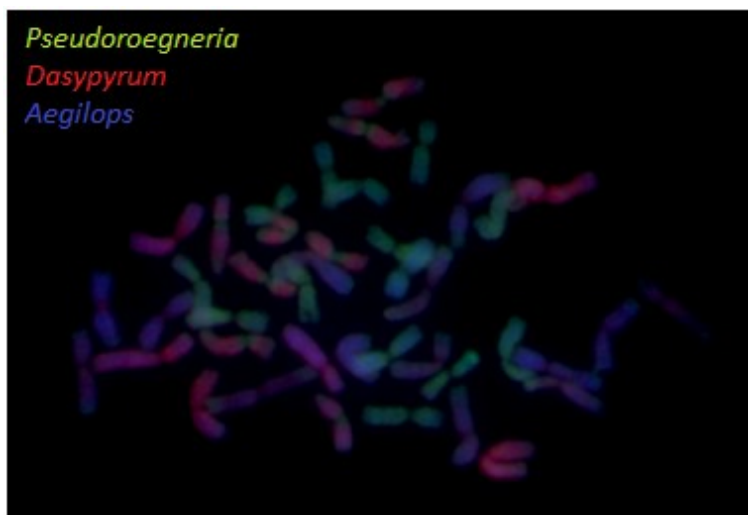
Obrázek 40: GISH se sondami *Pse* - zelená, značená digoxigeninem, a *Hb* - červená, značená biotinem, na rostlině CS22a *E. repens*. Zvětšení 10x100.



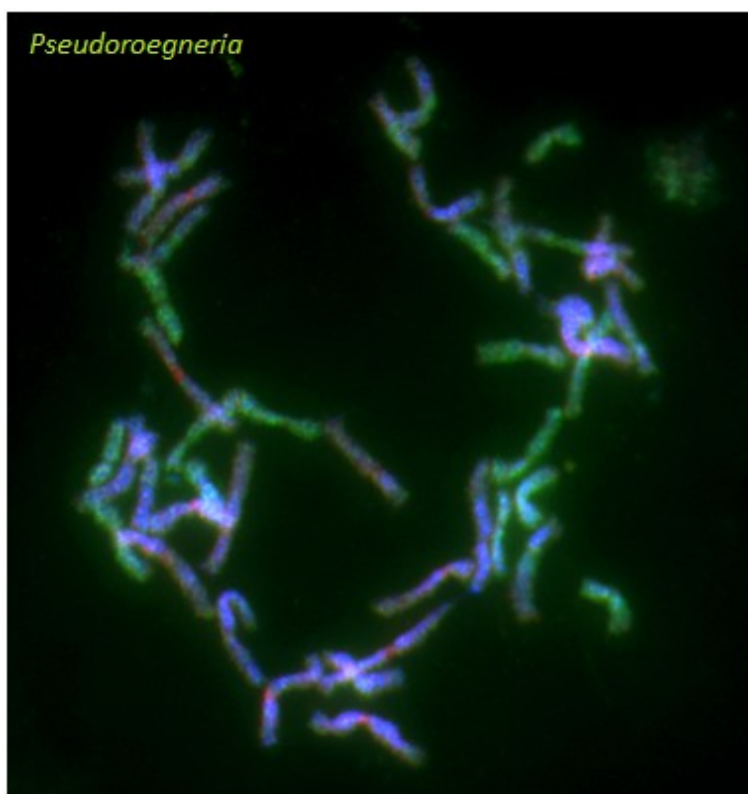
Obrázek 41: GISH se sondami Das - zelená, značená digoxigeninem, a Aet - červená, značená biotinem, na hybridní rostlině T3P10. Zvětšení 10x100.



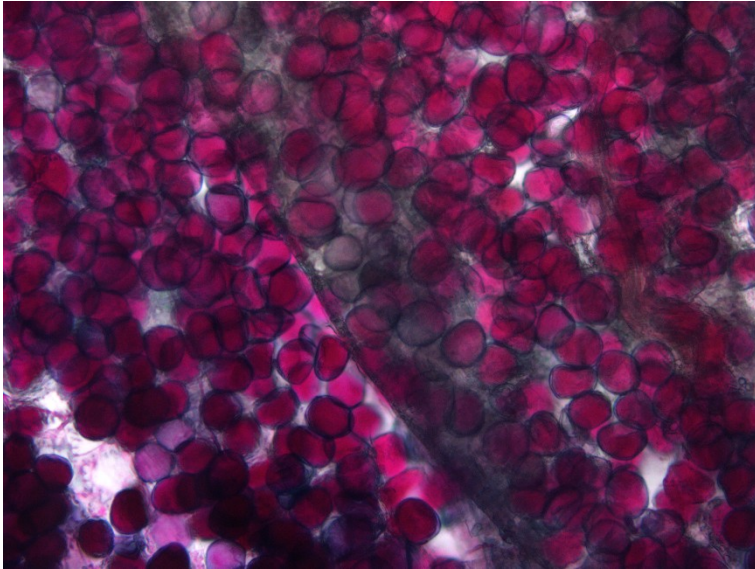
Obrázek 42: GISH se sondami Das - zelená, značená digoxigeninem, a Aet - červená, značená biotinem, na rostlině R8/T12P3 *E. hispidus*. Zvětšení 10x100.



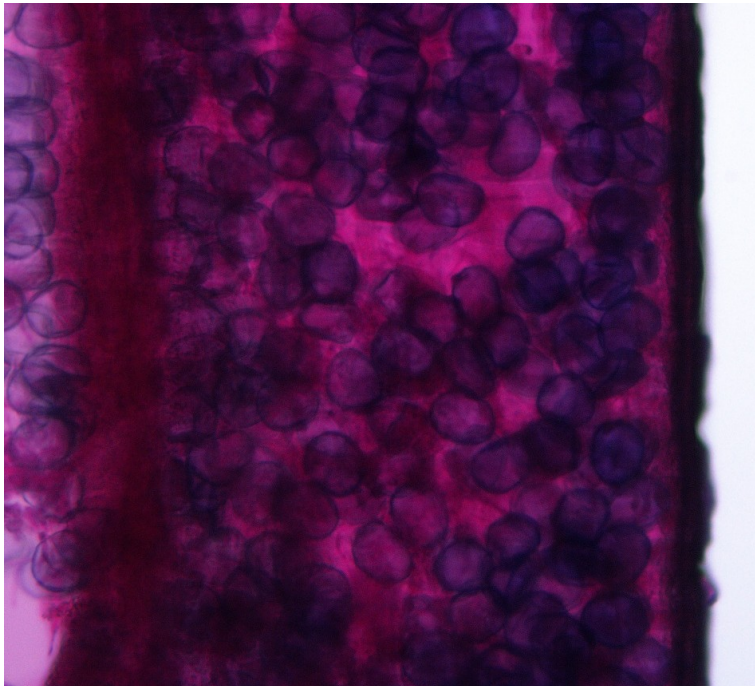
Obrázek 43: GISH se sondami *Pse* - zelená, značená digoxigeninem, a *Das* - červená, značená biotinem, na rostlině R8/T12P3 *E. hispidus*. Zvětšení 10x100.



Obrázek 44: GISH se sondami *Pse* - zelená, značená digoxigeninem, a *Das* - červená, značená biotinem, na rostlině Ch16-7a *E. pycnanthus*. Zvětšení 10x100.



Obrázek 46: Červeně obarvená viabilní pylová zrna druhu *E. hispidus*. Zvětšení 10x10.



Obrázek 47: Modře obarvená abortovaná pylová zrna hybridní rostliny. Zvětšení 10x10.

5. Diskuze

Diplomová práce navazuje na několik předchozích studií, které se zabývají podobnou tematikou na území České republiky, a jejich závěry rozšiřuje a doplňuje (Mahelka et al. 2005; Mahelka et al. 2007; Mahelka & Kopecký 2010; Mahelka et al. 2011). Oproti zmíněným pracím byl proveden výrazně rozsáhlejší náhodný „sampling“ (224 populací/714 rostlin) na větším geografickém území (střední Evropa a okolí). Kromě extenzivní úrovně byl ještě proveden „sampling“ na detailní modelovou studii hybridního roje (Čertoryje, Bílé Karpaty). K zodpovězení dílčích cílů byl zvolen odlišný soubor metod, tj. kombinace průtoková cytometrie, karyologie, barvení pylu, genomová hybridizace *in situ* a distanční morfometrika.

U části rostlin byl stanoven počet chromozomů, čímž byly kalibrovány cytometrické výsledky. Část rostlin byla otestována na celogenomové sondy pro jednotlivé subgenomy (dle Mahelka & Kopecký 2010, Mahelka et al. 2011) a výsledné „pattern“ např. potvrdilo introgresní jedince i zcela mimo rozlišovací schopnost ostatních konvenčních metod (zejména průtokové cytometrie a morfometriky).

Přínos práce, spolu s rozšířeným souborem výsledků studií Mahelky et al., je v propojení všech použitých metod, které umožňuje zhodnocení významu introgresivní hybridizace a polyploidizace, a další taxonomické zhodnocení studovaných autochtonních druhů. Dalším unikátním přínosem je ověření genomového složení, u nás dosud nestudovaného druhu *E. caninus*, které bylo dosud popsáno jen u islandských rostlin (Orgaard & Ananthawat-Jónsson 2001). Alespoň částí sond byl potvrzen hybridní původ vybraných studovaných rostlin a kalibrována příslušnost rostlin ke studovaným druhům.

5.1. Klasická karyologie

Karyologie je užitečný nástroj nezbytný, mimo jiné, pro kalibraci a zpřesnění cytometrických dat. Tato metoda je přesná, ale časově velmi náročná, proto bylo v rámci práce spočteno 31 rostlin pomocí GISH a 6 rostlin klasickou karyologií s pomocí V. Jarolímové.

Klasická karyologie má jen velmi omezené možnosti pro odhalení hybrida, identifikaci subgenomů a rekombinací (ve smyslu rozsáhlých chromozomových přestaveb; Krahulcová 1998). Studované druhy se však neliší velikostí ani morfologií chromozomů, proto jsou klasickou karyologií od sebe nerozlišitelné (Jarolímová pers. comm.).

V rámci studia modelového hybridního roje (lokalita Čertoryje) bylo spočteno 13 rostlin, z toho 1 aneuploid, 1 heptaploid, 2 oktoploidy a 9 hexaploidů (tabulka 15), zatímco

mezi 11 rostlinami extenzivní části „samplingu“ nebyl žádný aneuploid či vyšší polyploid (tabulka 16).

Tabulka 15: Absolutní genomové velikosti a chromozomové počty rostlin *Elymus* z lokality Čertoryje.

rostlina	druh	GS	počet chromozomů
T2P2	<i>E. repens</i>	24,9 pg	42
T3P10	hybrid	25,9 pg	42
T2P4	hybrid	26,1 pg	42
T2P6	hybrid	26,5 pg	42
T3P9	hybrid	26,7 pg	42
T13P12	hybrid	28,8 pg	42
T2P1	<i>E. hispidus</i>	28,1 pg	42
T2P8	<i>E. hispidus</i>	28,5 pg	42
T2P9	<i>E. hispidus</i>	28,8 pg	42
T14P8	<i>E. repens</i>	30,2 pg	49
T4P5	<i>E. hispidus</i>	32,7 pg	46
T4P4	<i>E. hispidus</i>	33,2 pg	56
T1P1	hybrid	35,4 pg	56

Mahelka et al. (Mahelka et al. 2005; Mahelka et al. 2007) uveřejnili 45 chromozomových počtů rostlin vyskytujících se volně v přírodě a 12 počtů od rostlin vzniklých volným sprášením nonaploida na lokalitě a vypěstovaných z obilek na experimentální ploše v Botanickém ústavu AV ČR v Průhonicích (tabulka 17). K publikovaným počtům lze ještě pro srovnání přiřadit 15 chromozomových počtů z lokality Čertoryje: 2 aneuploidní rostliny (ve smyslu přebývajících či chybějících jednotlivých chromozomů), 2 hexaploidní rostliny a 11 heptaploidních rostlin (tabulka 17; Mahelka et al. unpubl.).

Tabulka 16: Chromozomové počty rostlin *Elymus* z ČR a okolních států.

rostlina	druh	GS (pg)	2n
CS24a	<i>E. caninus</i>	18,1	28
CS24c	<i>E. caninus</i>	17,6	28
CS19c	<i>E. caninus</i>	18,2	28
7 MO14	<i>E. repens</i>	24,5	42
CS22a	<i>E. repens</i>	24,5	42
MO24c	<i>E. repens</i>	25,0	42
O2	hybrid	26,5	42
MO5b	hybrid	26,7	42
Ch16-14b	<i>E. hispidus</i>	27,9	42
Ukr2B	<i>E. hispidus</i>	28,6	42
CS16b	<i>E. hispidus</i>	29,3	42

Mahelka et al. (2005; 2007; unpubl.) neobjevili na území České republiky (s vyloučením hybridního roje na Čertoryjích) žádného aneuploida, ale velké množství

nonaploidů. Velký výskyt potvrzených nonaploidů (13 z 507 rostlin, tj. 2,6 %) může být pravděpodobně způsoben sběrovou strategií, která byla zaměřena na morfologicky výjimečné rostliny. Naopak „sampling”, který byl použit v diplomové práci, neodhalil na území České republiky překvapivě žádného aneuploida a pouze jednoho potenciálního DNA nonaploida z 613 rostlin (0,2 %). Tyto výsledky naznačují velmi malou frekvenci výskytu aneuploidních rostlin, popřípadě jejich nesnadné morfologické odlišení od euploidních rostlin. Naopak vyšší ploidní úrovně lze pravděpodobně odlišit na základě morfologie, pokud je na ně sběr zacílen.

Tabulka 17: Publikované chromozomové počty pro studované druhy rodu *Elymus* v rámci České republiky.

počet chromozomů	počet rostlin	lokalita	publikace
49	11	Čertoryje	Mahelka unpubl.
48	1	Čertoryje	Mahelka unpubl.
42	2	Čertoryje	Mahelka unpubl.
50	1	Čertoryje	Mahelka unpubl.
42	14	ČR	Mahelka et al. 2005
63	9	ČR	Mahelka et al. 2005
63	4	ČR	Mahelka et al. 2007
42	3	ČR	Mahelka et al. 2007
49	1	potomstvo nonaploida	Mahelka et al. 2007
50	3	potomstvo nonaploida	Mahelka et al. 2007
51	4	potomstvo nonaploida	Mahelka et al. 2007
52	1	potomstvo nonaploida	Mahelka et al. 2007
54	2	potomstvo nonaploida	Mahelka et al. 2007
63	1	potomstvo nonaploida	Mahelka et al. 2007

Na lokalitě Čertoryje byl proveden rozsáhlý „sampling” a byl objeven pouze jeden aneuploid ze 124 rostlin (0,8 %), ale vzhledem k vysokému zastoupení vyšších DNA ploidních úrovní, zde lze očekávat výskyt dalších aneuploidů (resp. výjimečných cytotypů; tabulka 15). Oproti tomu překvapivě Mahelka et al. (unpubl.) našli na lokalitě Čertoryje 2 aneuploidní rostliny a 11 heptaploidů (z 30, tj. 6,7 % aneuploidů; tabulka 17), což je dramatický rozdíl, který lze jen obtížně vysvětlit (pravděpodobně opět strategií „samplingu”).

Nonaploidní rostliny pravděpodobně vznikají splynutím redukované a neredukované gamety hexaploidních rostlin (Mahelka et al. 2007) a v experimentálních podmínkách produkují velmi variabilní potomstvo. Podobnou cestou pravděpodobně vznikly další detekované vyšší ploidní úrovně (7x a 8x) a aneuploidy v rámci čertoryjského hybridního roje, v němž byla nalezena mimořádná variabilita v absolutní velikosti genomu i velké množství různých chromozomových počtů (tabulka 15 a 17).

5.2. Průtoková cytometrie

Dříve publikované absolutní velikosti genomu jsou pro hexaploidní jedince *E. repens* 25,96 pg (Bennett et al. 1982) a pro hexaploidní jedince *E. hispidus* 26,25 pg a 25,92 pg (Vogel et al. 1999). Mahelka et al. (2005) stanovili absolutní velikosti genomu (\pm směrodatná odchylka) pro hexaploidní *E. repens* $23,27 \pm 0,20$ pg a pro hexaploidní *E. hispidus* $27,04 \pm 0,24$ pg. Pro tetraploidní druh *E. caninus* byla publikována absolutní velikost genomu 17,1 pg (Bennett et al. 2000).

Oproti stanoveným hodnotám v této práci však lze zaznamenat poměrně výrazný posun [u *E. repens* je o 4,8 % menší než publikovaná absolutní genomová velikost v Bennett et al. 1982 a o 5,8 % větší než u Mahelka et al. (2005), u *E. hispidus* je o 8,5 % a 7,3 % větší než absolutní genomová velikost publikovaná ve Vogel et al. 1999 a o 4,6 % větší než u Mahelka et al. (2005)]. Tento posun je pravděpodobně dán použitím různých interních standardů a naznačuje nutnost jejich kalibrace vůči sobě.

Analýzy absolutní velikosti genomu rostlin posloužily rovněž ke stanovení DNA ploidní úrovně (zejm. u čertoryjského datasetu; viz obrázky 48 a 49), která byla dále kalibrována chromozomovými počty. Koefficienty variance (CV) měly hodnoty do 5 %, což je v cytometrické praxi považováno za standardní (Doležel et al. 2007), a tak lze získané hodnoty považovat za vysoce přesné.

Spočtené tetraploidní rostliny *E. caninus* ($4x=28$) mají rozpětí absolutních velikostí genomu od 17,6 pg do 18,2 pg, hexaploidní *E. repens* ($6x=42$) mají absolutní velikosti genomu od 24,5 pg do 25 pg a hexaploidní *E. hispidus* ($6x=42$) mají rozpětí absolutních velikostí genomu 27,9 pg až 30,3 pg.

Aby mohla být zjištěna příčina rozpětí absolutních velikostí genomu u *E. hispidus*, je třeba otestovat karyologicky kalibrované rostliny všemi GISH sondami. Příčinou tohoto rozptylu by mohla být zpětná hybridizace a to by znamenalo, že druh není „čistý“. Další příčinou by mohla být variabilita v transpozomech (Šmarda et al. 2008).

Kontinuum a překryv absolutních velikostí genomu studovaných druhů s hybridem lze s nejvyšší pravděpodobností považovat za důkaz hybridizace a zpětné hybridizace (introgrese), která na základě rozdělení hodnot absolutních velikostí genomu asymetricky směřuje k rodičovskému druhu *E. hispidus*, s nímž se absolutní velikosti genomu hybridních rostlin překrývají víc (viz obrázek 48 a 49). Rovněž absolutní velikosti genomu druhu *E. repens* mají menší rozptyl (menší směrodatnou odchylku) než je u absolutních genomových velikostí druhu *E. hispidus*, a z grafu je zřejmé téměř diskrétní ohraničení druhu

(obrázek 48). Introgresivní hybridizaci směrem k rodičovskému druhu *E. hispidus* nad to podpořila i distanční morfometrika obrázek 51) a analýza barvitelnosti pylu.

5.2.1. „Dataset extenzivního samplingu“

E. caninus má absolutní velikost genomu $17,93 \pm 0,31$ pg. Největšími odchylkami jsou rostliny s absolutní velikostí genomu 16,9 pg a 24,6 pg. Rostlina s největší absolutní velikostí genomu je pravděpodobný hexaploid, vzhled má intermediární mezi druhy *E. caninus* a *E. repens*, ale je trsnatá. Obě rostliny byly nalezeny na ruderalních stanovištích, což není úplně typická lokalita výskytu druhu, a proto by mohla ovlivnit „chování“ rostlin.

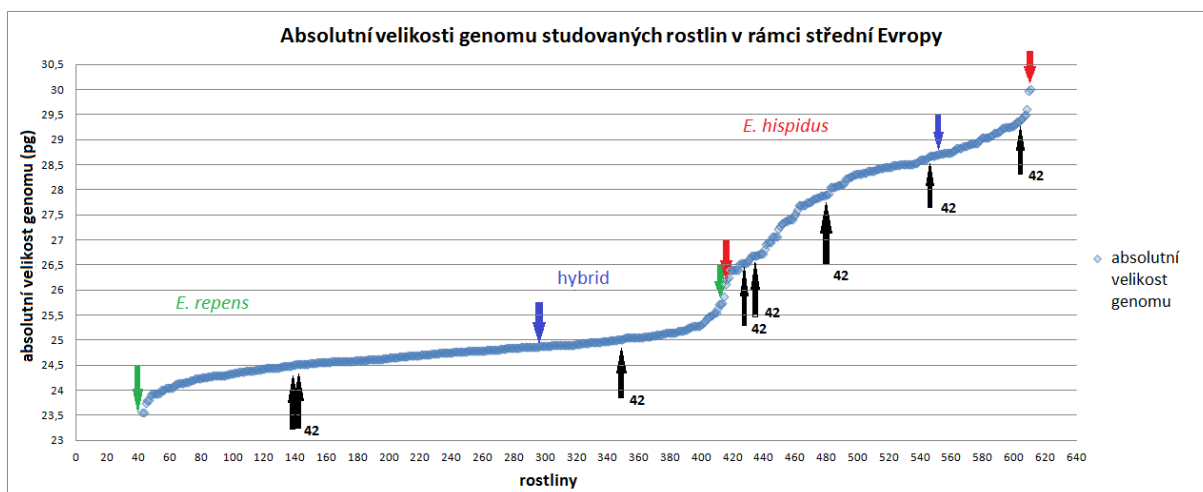
E. repens má absolutní velikost genomu $24,71 \pm 0,36$ pg. Absolutní velikost genomu menší než 24 pg mělo 5 rostlin, z čehož nejmenší genomová velikost byla 23,5 pg. Absolutní velikost genomu větší než 25 pg mělo 8 rostlin a největší velikost genomu byla 25,8 pg. Většina těchto rostlin se vyskytovala na ruderalním stanovišti, pouze jedna ve stepním trávníku, což je způsobeno i výskytem tohoto druhu.

Rozeptí absolutních genomových velikostí hybridů bylo od 26,2 pg do 28, pg. Výkyvy v absolutních genomových velikostech hybridů jsou pravděpodobně způsobeny různými počty a typy rekombinací a zejména zpětnou hybridizací. Rostliny se vyskytovaly v rámci všech typů stanovišť, takže vliv stanoviště a disturbance může být vyloučen.

Odlehle pozorování u absolutních velikostí genomu hybridních rostlin tvoří hybrid, pravděpodobný DNA nonaploid (37,3 pg), který se vyskytoval ve smíšené populaci s oběma rodičovskými druhy na kosené, a tedy pravidelně disturbované, stepní lokalitě, kde může s větší pravděpodobností docházet k hybridizaci, introgresivní hybridizaci a polyploidizaci. Pravděpodobný vznik tohoto DNA nonaploidního hybridu je splnutím neredukované gamety od *E. repens* a redukované gamety od hybridu. Tyto domněnky jsou vytvořeny na základě průměrných absolutních velikostí genomu, s přihlédnutím ke směrodatným odchylkám.

E. hispidus má absolutní velikost genomu $28,33 \pm 0,78$ pg. Absolutní velikost genomu pod 27 pg mělo 9 rostlin, z čehož nejmenší absolutní genomová velikost byla 25,9 pg. Absolutní velikost genomu nad 29 pg mělo 7 rostlin, kdy největší absolutní velikost genomu byla 30 pg. Všechny rostliny s odlišnými absolutními velikostmi genomu se vyskytovaly ve stepních trávnících blízkých primárním typům vegetace nebo na ruderalním stanovišti, proto by rovněž mohl být vyloučen vliv stanoviště.

Extrémní hodnoty absolutní velikosti genomu u všech druhů však mohou být také způsobeny aneuploidii, proto bude třeba stanovit jejich chromozomové počty.



Obrázek 48: Absolutní velikost genomu a chromozomové počty *Elymus repens*, *E. hispidus* a jejich potenciálních hybridů v rámci střední Evropy. Barevné šipky označují rozpětí hodnot pro studované morfokupiny, které se ovšem překrývají. Černé šipky ukazují chromozomové počty spočtených rostlin.

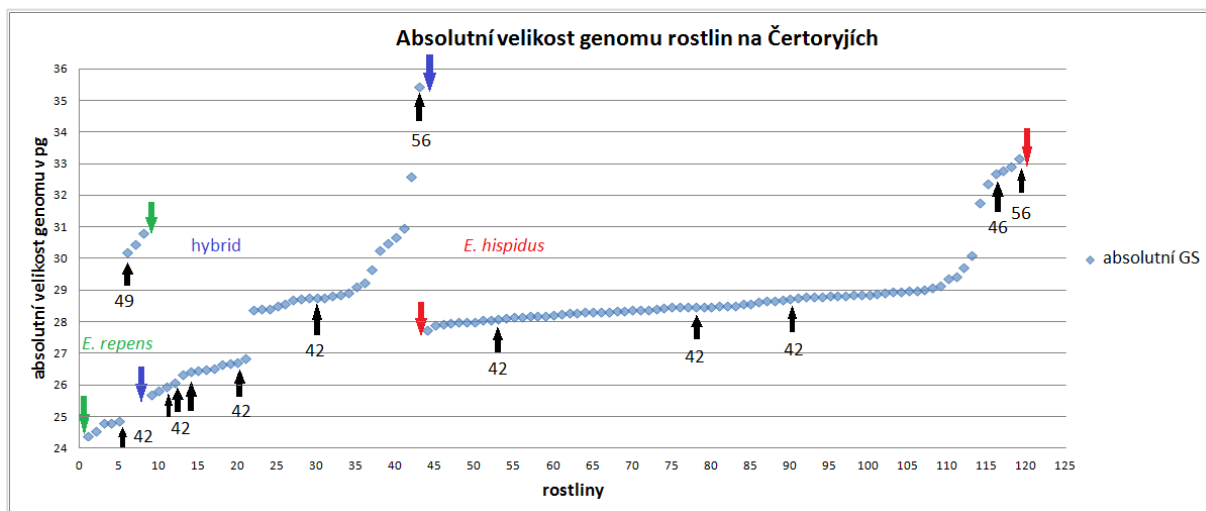
5.2.2. „Detailní studie Čertoryje“

Lokalita Čertoryje je mimořádná svým stářím, historií a specifickými půdními podmínkami. Tyto faktory mají vliv na rostliny, které se na ní nacházejí. Bílé Karpaty, včetně lokality Čertoryje, jsou osídleny již od raného neolitu, díky čemuž se vytvořily sekundární stanoviště (tj. louky), na kterých mohly oba studované druhy rodu *Elymus* růst dlouhodobě pospolu (Hájková et al. 2011). Studované druhy se zde morfologicky odlišují hůře, než na ostatních středoevropských lokalitách. Ani základní biosystematické přístupy (jako průtoková cytometrie a morfometrika) zde tak snadno nevytvářejí „pattern“ oddělených skupin, a proto populaci lze považovat ve středoevropském kontextu za extrémní případ hybridního roje. Rostliny jsou celkově vyššího vzrůstu, s širšími listy a reprodukční bariérou, u trav už tak malá, zde byla pravděpodobně zcela překonána, což je patrné z absolutních genomových velikostí vnesených do grafu (obrázek 49). Značná část rostlin má různou měrou intermediární charakter (absolutní velikost genomu, morfologie).

Ze 78 rostlin druhu *E. hispidus* má 8 rostlin absolutní velikost genomu odpovídající potenciálně vyšší ploidní úrovni než je rozpětí hexaploidů (tj. více než 29 pg). Je pravděpodobné, že tyto rostliny jsou rozsáhlým způsobem aneuploidní nebo mají větší ploidní úroveň. Rostlina s absolutní velikostí genomu 33,2 pg je potvrzený oktoploid ($2C=8x=56$) a rostlina s absolutní velikostí genomu 32,7 pg je aneuploid s 46 chromozomy. Rozdíl v absolutní velikosti genomu je minimální, ale počet chromozomů se diametrálně odlišuje (obrázek 49), což jednoznačně naznačuje výrazně odlišné velikosti v rámci chromozomových sádek různého subgenomového původu. Tři spočtené rostliny byly hexaploidní, s absolutní velikostí genomu 28,1 pg, 28,5 pg a 28,8 pg.

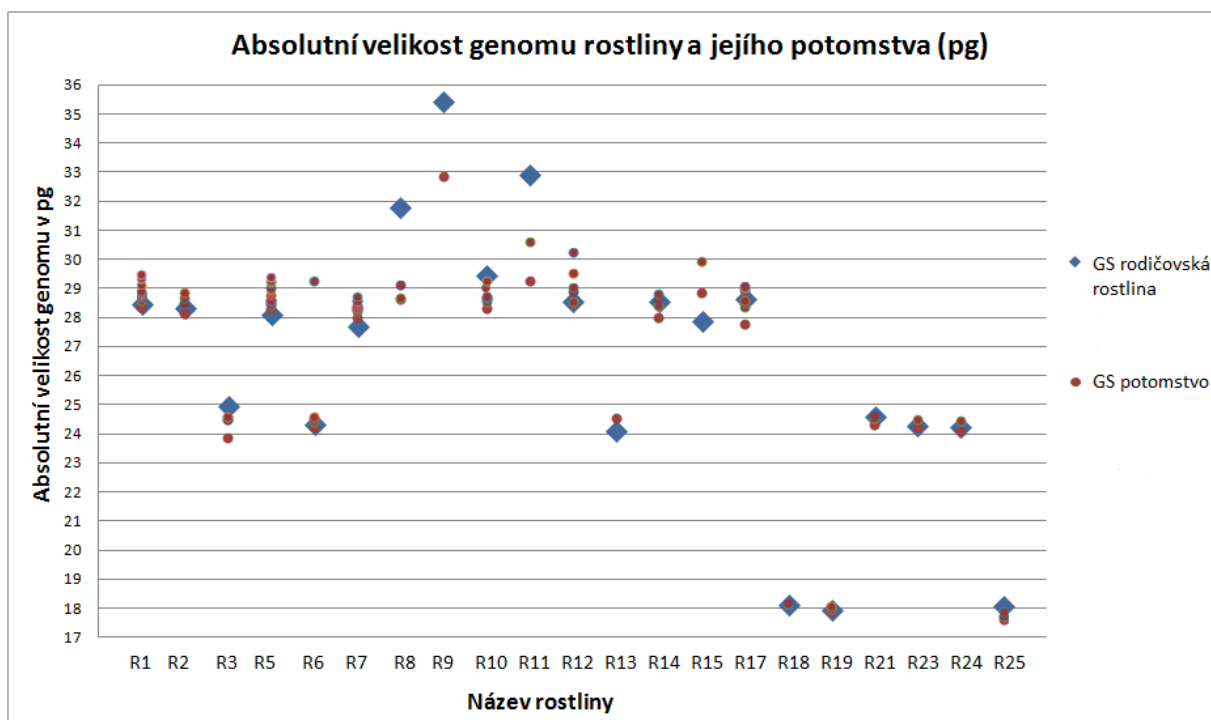
Z 8 rostlin *E. repens* mají 3 absolutní velikost genomu větší než 25 pg. Jedna z rostlin s absolutní velikostí genomu rovnou 30,2 pg je heptaploid se 49 chromozomy. Další rostlina s absolutní velikostí genomu 24,9 pg byla hexaploidní.

Ze 37 rostlin s hybridní morfologií má 24 absolutní velikost genomu větší než 28 pg. Oktoploid s 56 chromozomy má absolutní velikost genomu 35,4 pg. Pět rostlin s absolutní velikostí genomu 25,9 pg, 26,1 pg, 26,5 pg, 26,7 pg a 28,8 pg jsou potvrzené hexaploidy se 42 chromozomy.



Obrázek 49: Absolutní velikosti genomu a chromozomové počty rostlin rodu *Elymus* z čertoryjského hybridního roje. Barevné šipky označují rozpětí hodnot pro studované morfokupiny, které se ovšem překrývají. Černé šipky ukazují chromozomové počty spočtených rostlin.

V rámci průtokové cytometrie bylo změřeno potomstvo 21 rostlin kultivovaných na experimentální ploše Botanické zahrady PřF UK (obrázek 50). Obilky vznikly samovolně, tj. opylování nebylo kontrolováno, a jejich klíčení bylo různě úspěšné (klíčivost 40 % - 100 %, v průměru 62 %). Potomstvo jednotlivých rostlin vykazuje velkou variabilitu v absolutních genomových velikostech, proto je pravděpodobné, že i na experimentální ploše došlo k samovolné hybridizaci druhů, hybridů a vyšších alopolyloidů. Část potomstva byla testována na sondy GISH (tabulka 19).

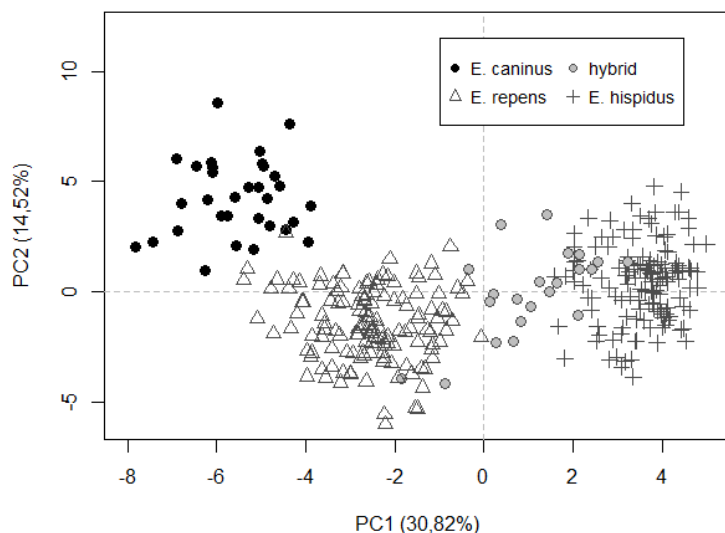


Obrázek 50: Srovnání absolutních velikostí rodičovských rostlin (modrý kosočtverec) a jejich potomstva (fialový puntík).

5.3. Distanční morfometrika

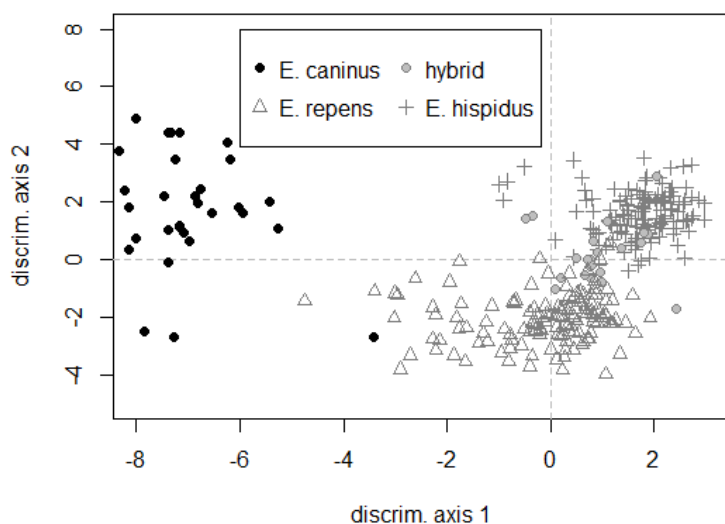
Analýza hlavních komponent (PCA) odhalila podobný „pattern” překryvu druhů a hybrida jako průtoková cytometrie (obrázek 51). Asymetrický překryv rodičovského druhu *E. hispidus* a hybridů naznačuje opět převažující směr introgresivní hybridizace k druhu *E. hispidus*. V analýze hlavních komponent byly ponechány morfologické znaky, které přispěly k definování skupin, což podle Marhold & Suda (2002) není problém, stejně jako u studie Hanušová et al. (2014) nebo Macková et al. (2017).

Do diskriminační analýzy nebyly znaky, podle kterých byly rostliny určeny, zařazeny. Tyto znaky nebyly silně ani velmi silně korelované s žádnými jinými, které byly v diskriminační analýze ponechány. Podle Marhold & Suda (2002) je možné druh definovat na základě morfologie a poté do diskriminační analýzy znak nezahrnout. A protože kanonická i klasifikační diskriminační analýza naznačují analogické „pattern” jako analýza hlavních komponent (obrázek 52), lze je považovat za validní a potenciální riziko definice kruhem za nepravděpodobné.



Obrázek 51: Ordinační diagram objektů z analýzy hlavních komponent (PCA) 333 jedinců s 39 znaky (včetně *E. caninus*). První osa vyjadřuje 30,82 % a druhá osa 14,52 % celkové variability.

Definice druhů na základě morfologických znaků a následné multivariační analýzy druhů s použitím morfologických znaků ovšem riziko definice kruhem představovat může. Ve výstupech multivariačních analýz lze proto na ráz stanovených skupin nahlížet jako na ilustrativní. Nicméně studium introgresivní hybridizace *in vivo* s sebou obvykle přináší stejné komplikace i při volbě jiného souboru metod a studované skupiny z principu nemívají diskretní charakter.



Obrázek 52: Grafický výstup kanonické diskriminační analýzy s pasivně promítnutými hybridy. První 2 osy vyjadřují: DA1 48,15 % a DA2 41,92 % celkové variability.

5.4. Genomová hybridizace *in situ*

V předchozích odstavcích zmíněné přístupy naznačily introgresivní hybridizaci směrem ke druhu *E. hispidus*, a proto bylo následně přistoupeno k použití metody GISH,

kteřá je vhodná pro detailnější studium subgenomového složení (tj. genomů od diploidních předků, u alopolyploidů v tribu *Triticeae* nazvaných subgenomy) a tím pádem pro určení původu rostlin (včetně introgrese).

Metoda GISH potvrdila subgenomové složení „čistých“ druhů a odhalila subgenomové složení hybridů, které překvapivě nebylo vždy stejné, i přestože nebyly testovány sondy na všechny subgenomy (tabulka 18). Dalším přínosem GISH bylo odhalení kombinací subgenomů u aneuploidní rostliny a vyšších polyploidů. I přesto, že tyto rostliny nebyly otestovány na všechny subgenomy, už z dosavadních nekompletních výsledků je jednoznačně patrné, že mají jiné subgenomové složení a tedy i odlišný původ (viz tabulka 18 a 19).

Tabulka 18: Chromozomové počty a subgenomové složení pěstovaných rostlin. Subgenomy značeny: Pse=*Pseudoroegneria*, Das=*Dasyphyrum*, Hb=*Hordeum* a Aet=*Aegilops*, x=sonda se nenavázala, - =sonda nebyla testována.

označení	rostlina	druh	GS (pg)	2n	Pse	Das	Hb	Aet	pouze DAPI
RP	CS24a	<i>E. caninus</i>	18,1	28	14	-	14	-	0
RR	CS24c	<i>E. caninus</i>	17,6	28	14	-	14	-	0
RC	CS19c	<i>E. caninus</i>	18,2	28	-	x	-	x	28
1B	Ch16-12e	<i>E. pungens</i>	20,6	42	14	-	x	-	28
RA	7 MO14	<i>E. repens</i>	24,5	42	-	x	-	x	42
1E	CS22a	<i>E. repens</i>	24,5	42	28	-	14	-	0
1F	MO24c	<i>E. repens</i>	25,0	42	28	-	14	-	0
1S	T3P10	hybrid	25,9	42	-	7	-	7	28
RK	O2	hybrid	26,5	42	-	7	-	7	28
1i	MO5b	hybrid	26,7	42	-	7	7	-	28
1U	T3P9	hybrid	26,7	42	21	7	-	-	14
RD	T13P12	hybrid	28,8	42	14	14	-	-	14
RB	T1P1	hybrid	35,4	56	24	-	4	-	28
1J	Ch16-14b	<i>E. hispidus</i>	27,9	42	14	14	-	-	14
RM	Ukr2B	<i>E. hispidus</i>	28,6	42	14	-	x	-	28
1L	CS16b	<i>E. hispidus</i>	29,3	42	14	14	-	-	14
1AC	T14P8	<i>E. repens</i>	30,2	49	28	-	7	-	14
1Q	Ch16-7a	<i>E. pycnanthus</i>	31,9	42	14	-	-	-	28
1AG	T4P5	<i>E. hispidus</i>	32,7	46	14	13	-	-	19
1AJ	T4P4	<i>E. hispidus</i>	33,2	56	-	14	-	14	28

Zatím nebyly publikovány počty rekombinací (ve smyslu rozsáhlejších chromozomových přestaveb mezi subgenomy) u druhu *E. hispidus*, ale jejich počet by měl být v rámci druhu stabilní (Kopecký pers. comm.). *E. repens* má popsané 2 rekombinace mezi

subgenomy (Mahelka & Kopecký 2010) a *E. caninus* nemá rekombinaci žádnou (Orgaard & Anamthawat-Jónsson 2001; vlastní pozorování).

Tabulka 19: Chromozomové počty a subgenomové složení rostlin vypěstovaných z obilek. Subgenomy značeny: Pse=*Pseudoroegneria*, Das=*Dasypyrum*, Hb=*Hordeum* a Aet=*Aegilops*, x=sonda se nenavázala, -=sonda nebyla testována.

rostlina	druh	GS (pg)	druh rodič	GS (pg) rodič	2n	Pse	Das	Hb	Aet	pouze DAPI
R8/T12P3	<i>E. hispidus</i>	28,7	<i>E. hispidus</i>	31,8	42	14	14	-	14	0
R10/T3P5	<i>E. hispidus</i>	28,7	<i>E. hispidus</i>	29,4	42	14	14	-	14	0
R12/Ukr 2B	<i>E. hispidus</i>	30,3	<i>E. hispidus</i>	29,4	42	14	-	x	-	28
R14/1Da	<i>E. hispidus</i>	28,8	<i>E. hispidus</i>	28,6	42	14	-	x	-	28
R19/CS19b	<i>E. caninus</i>	17,9	<i>E. caninus</i>	17,9	28	14	-	14	-	0
R5/MO4b	<i>E. hispidus</i>	29,4	<i>E. hispidus</i>	28,1	42	14	14	x	-	14
R7/R4c	<i>E. hispidus</i>	28,4	<i>E. hispidus</i>	27,7	42	14	14	x	-	14
R9/T1P1	hybrid	32,8	hybrid	35,4	49	22	13	-	-	14
R1/CS1h	<i>E. hispidus</i>	28,9	<i>E. hispidus</i>	28,5	42	14	14	x	-	14
R2/CS1k	<i>E. hispidus</i>	28,7	<i>E. hispidus</i>	28,3	42	14	14	x	-	14

Stabilní počet rekombinací u *E. hispidus* je na 8 chromozomech patřících subgenomu *Dasypyrum*, kde jsou středové části chromozomů (s centromerou) od *Pseudoroegneria*, ale větší část chromozomu je od *Dasypyrum* (část těchto chromozomů má také telomerické rekombinace s *Pseudoroegneria*). Další menší středová rekombinace s *Aegilops* je na 1 chromozomu patřícímu k subgenomu *Dasypyrum*.

Subgenomové složení hybridů mezi studovanými druhy zatím nebylo popsáno. Nejpravděpodobnější vznik primárního hexaploidního hybridu mezi *E. hispidus* a *E. repens* je pomocí redukovaných gamet obou rodičovských druhů a proto by měl obsahovat 21 chromozomů od *Pseudoroegneria* a po 7 chromozomech od *Dasypyrum*, *Hordeum* a *Aegilops* (tabulka 20).

Tabulka 20: Nejpravděpodobnější vznik a subgenomové složení hexaploidního primárního hybridu z redukovaných gamet rodičovských druhů.

subgenom	gameta <i>E. hispidus</i> (21 chr.)	gameta <i>E. repens</i> (21 chr.)	hybrid (42 chr.)
<i>Pseudoroegneria</i>	7	14	21
<i>Hordeum</i>	-	7	7
<i>Dasypyrum</i>	7	-	7
<i>Aegilops</i>	7	-	7

Hybridní rostliny nebyly testovány na všechny subgenomy a ani na stejné dvojice, proto nemůže být s přesností určen jejich vznik.

Hybrid s absolutní velikostí genomu 28,8 pg (T13P12; obrázek 53) má 14 chromozomů od *Pseudoroegneria* i *Dasypyrum*, takže je možné, že by to ještě mohl být morfologicky odlišný *E. hispidus*, kdyby zbylých 14 chromozomů bylo od *Aegilops* (hybrid

2.3; tabulka 21), proti této variantě ale mluví jiný „pattern” (tzn. četnost a lokalizace) rekombinací mezi subgenomy od *Pseudoroegneria* a *Dasypyrum* (10; obrázek 53). Další možnou variantou je, že 7 chromozomů má od *Hordeum* a 7 od *Aegilops*, což je ještě potřeba otestovat (hybrid 2.1; tabulka 21) a třetí variantou je 14 chromozomů od *Hordeum* (hybrid 2.2; tabulka 21).

Jednotlivé subgenomy mají různé velikosti, což je možné vysvětlení větší absolutní velikost genomu této rostliny, oproti „klasickým” primárním hybridům.

Tabulka 21: Potenciální subgenomové složení hybridu s 14 chromozomy od *Pseudoroegneria* a 14 od *Dasypyrum*.

subgenom	hybrid 2.1 (42 chr.)	hybrid 2.2 (42 chr.)	hybrid 2.3 (42 chr.)
<i>Pseudoroegneria</i>	14	14	14
<i>Hordeum</i>	7	14	-
<i>Dasypyrum</i>	14	14	14
<i>Aegilops</i>	7	-	14

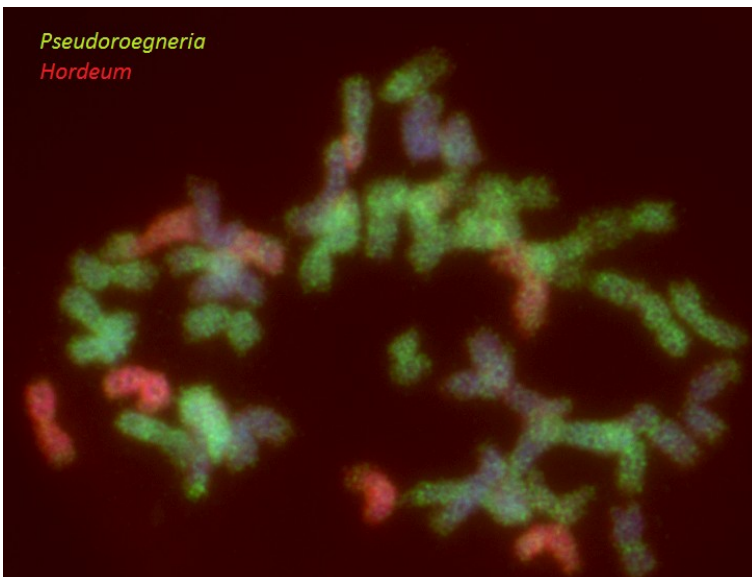
Vyšší ploidní úrovně studovaných druhů zatím nebyly popsány z pohledu subgenomového složení.

Nalezená oktoploidní rostlina *E. hispidus* ($2n=8x=56$) má 14 chromozomů od *Dasypyrum*, 14 od *Aegilops* a s největší pravděpodobností 28 neobarvených chromozomů od *Pseudoroegneria*. Sondy pro *Pseudoroegneria* na rostlině nebyly testovány. Aneuploid se 46 chromozomy má 14 chromozomů od *Pseudoroegneria*, 13 od *Dasypyrum* a s největší pravděpodobností 19 chromozomů od *Aegilops*. Sondy pro *Aegilops* na rostlině nebyly testovány (tabulka 18).

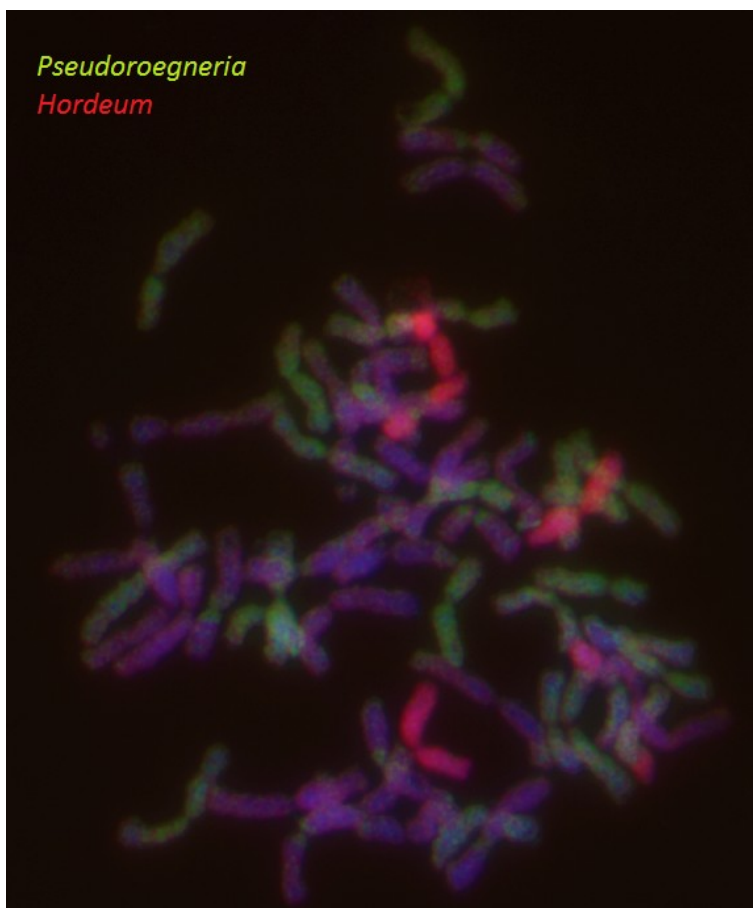
Heptaploidní *E. repens* ($2n=7x=49$; obrázek 54) má 28 chromozomů od *Pseudoroegneria*, 7 od *Hordeum* a 14 chromozomů neznámého původu, a proto by měla být zařazena mezi rostliny hybridní (tabulka 18). Použitím základních determinačních znaků byla rostlina určena jako *E. repens*, proto je možné, že přítomnost jednoho subgenomu od *Hordeum* nebo jeho kombinace se subgenomem od *Pseudoroegneria* souvisí s absencí brv na okraji listových pochev i špičatým tvarem plev.



Obrázek 53: GISH se sondami *Pse* - zelená, značená digoxigeninem, a *Das* - červená, značená biotinem, na hybridní rostlině T13P12 se 14 chromozomy od *Pseudoroegneria* a 14 chromozomy od *Dasypyrum*. Zvětšení 10x100.



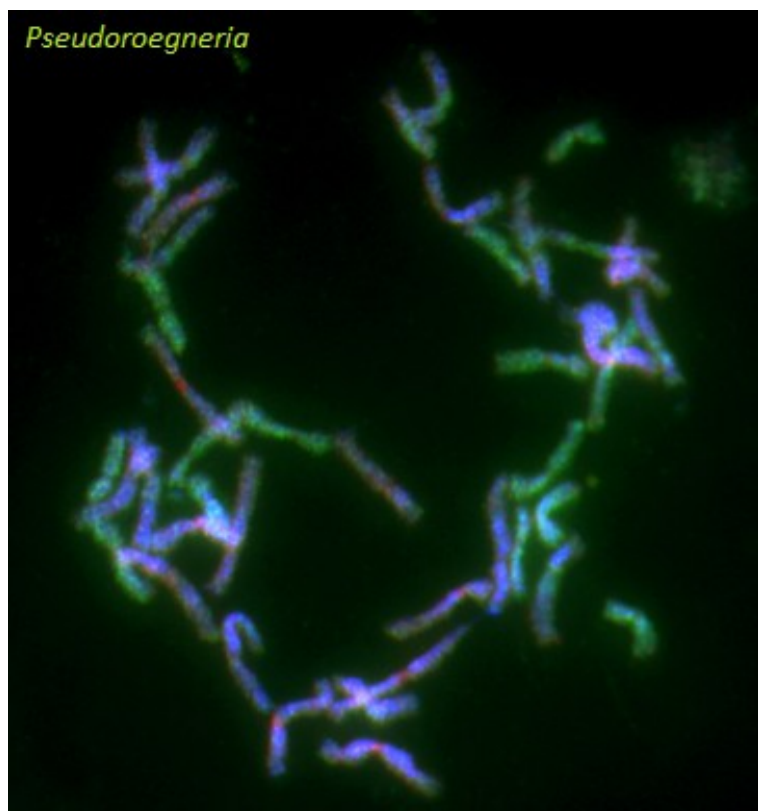
Obrázek 54: GISH se sondami *Pse* - zelená, značená digoxigeninem, a *Hb* - červená, značená biotinem, na hybridní rostlině T14P8 s 28 chromozomy od *Pseudoroegneria* a 7 chromozomy od *Hordeum*. Zvětšení 10x100.



Obrázek 55: GISH se sondami *Pse* - zelená, značená biotinem digoxigeninem, a *Hb* - červená, značená biotinem, na hybridní rostlině T1P1 s 24 chromozomy od *Pseudoroegneria* a 4 chromozomy od *Hordeum*. Zvětšení 10x100.

Oktoploid hybridního původu ($2n=8x=56$; obrázek 55) má pouze 4 chromozomy od *Hordeum* a 24 od *Pseudoroegneria*, zbylých 28 má od jiného donora. Toto složení genomu naznačuje složité vztahy mezi subgenomy a různý mechanismus vzniku hybridů a polyploidů.

Analýzou absolutní velikosti genomu byla objevena rostlina *E. pungens*, s potenciálně menší ploidní úrovní, která byla ověřena. *E. pungens* je za normálního stavu oktoploid ($2n=8x=56$), ale testovaná rostlina byla hexaploidní ($2n=8x=42$). Genom oktoploidního *E. pungens* se skládá z 28 chromozomů od *Pseudoroegneria*, 14 od *Thinopyrum* a 14 od *Agropyron*. Hexaploidní rostlina měla jen 14 chromozomů od *Pseudoroegneria* a zbylých 28 chromozomů nebylo obarvených, tudíž jí chybělo 14 chromozomů (tj. 2 subgenomy) od *Pseudoroegneria* (obrázek 56). To naznačuje, že problematika *E. pungens* je mimořádně vhodná pro další studium.



Obrázek 56: GISH se sondami Pse - zelená, značená digoxigeninem, a Hb - červená, značená biotinem, na rostlině *E. pungens* Ch16-12e se 14 chromozomy od *Pseudoroegneria* a 28 neobarvenými. Zvětšení 10x100.

5.5. Historický kontext

Studované druhy rostou v otevřených travinných ekosystémech (stepi, lesostepi, louky a ruderalní stanoviště), které se na území České republiky vyskytují již od pleistocénu v podobě srašových stepí a lesostepí (Chytrý 2012). Je známo, že během celého holocénu byl na našem území kontinuálně zastoupen recentní soubor stepních druhů, a to i během klimatického optima (Chytrý 2012).

Tyto otevřené plochy byly pravděpodobně také tvořeny a udržovány velkými herbivory, popřípadě bobry (Vera 2000), tudíž společný výskyt studovaných druhů nebyl ovlivněn primárně jen člověkem. Vliv člověka na společný výskyt druhů ale také není zanedbatelný, díky dlouhodobému pěstování obilovin (tj. kulturní stepi), které pro ně vytváří vhodné životní podmínky (Hájková et al. 2011). Tento společný výskyt by mohl mít stejné důsledky, jako je to u pšenice s druhy rodu *Aegilops*, tzn. dlouhodobý genový tok a genovou erozi (Arrigo et al. 2011).

U čeledi *Poaceae* jsou obecně malé reprodukční bariéry, takže je v ní mezidruhovú hybridizace běžná (např. Ainouche et al. 2004; Kopecký et al. 2005; Díaz-Pérez et al. 2014). Dlouhý společný kontakt studovaných druhů mohl vést k opakované hybridizaci jak

na primárních, tak na sekundárních stanovištích vytvořených člověkem (zemědělství - okraje polí, vinic). Zpětná hybridizace *E. hispidus* s hybridem mohla mít za následek velký počet rekombinací v genomu (ve smyslu rozsáhlých chromozomových přestaveb) samotného *E. hispidus* a svědčila by o výrazné asymetrii hybridizace rodičovských druhů.

5.6. Výskyt druhů

Izolované i smíšené populace *E. hispidus* se vyskytují v České republice hlavně v oblasti termofytika. V Evropě je soubor zahrnutých populací *E. hispidus* také soustředěn v teplejších regionech. Charakterem stanovišť tíhne druh spíše k lokalitám s přirozenou vegetací. Výskyt smíšených populací nicméně nevykazuje jednoznačné „pattern” na úrovni míry ovlivnění lidskou činností. Samotný druh se vyskytuje od planárního až do submontánního stupně, s těžištěm v planárním až kolinním stupni (Kubát et al. 2002), což bylo sběry potvrzeno. Smíšené populace se vyskytují spíš v nižších nadmořských výškách, jako samotný druh *E. hispidus*.

E. repens se vyskytuje primárně na ruderalizovaných stanovištích a na člověkem méně ovlivněných lokalitách se vyskytuje jen okrajově. Jeho výskyt je na celém výškovém gradientu (planární až supramontánní stupeň; Kubát et al. 2002), nicméně výškové rozložení sběrů to zcela nepotvrzuje, pravděpodobně z důvodu přednostního zacílení na sběr *E. hispidus*.

Hybridní rostliny vznikají a šíří se přednostně na synantropních stanovištích, kde jsou rodičovské druhy v kontaktu.

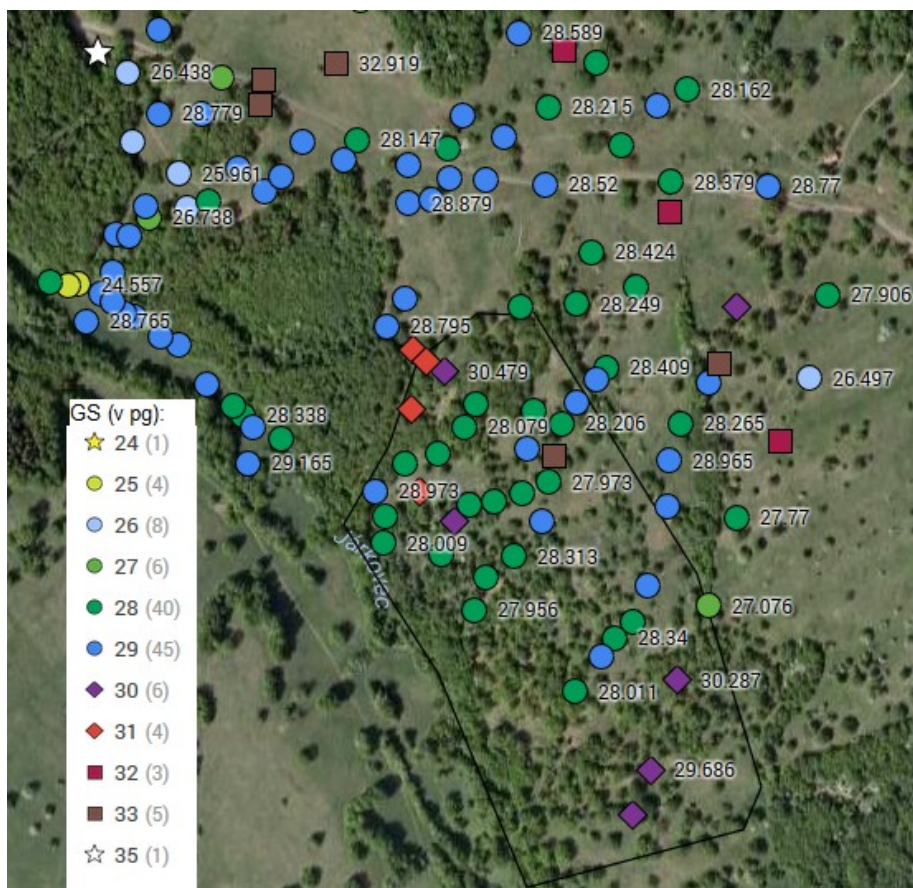
Malý výskyt druhů i hybrida byl zaznamenán na stanovišti středně ovlivněném člověkem (lem lesa, louka), kde je zvýšená kompetice, ale není zvýšená disturbance, a proto je pravděpodobně toto prostřední nevhodné pro uchycení druhů i hybrida.

E. caninus se vyskytuje primárně na ruderalizovaných stanovištích a je nezávislý na nadmořské výšce. Smíšené populace se vyskytují od pahorkatin výš. S ostatními druhy se *E. caninus* pravděpodobně téměř nekříží. Přesto však rostliny *E. caninus* z lokality v blízkosti Mělníka mají intermediární fenotyp mezi *E. repens* a *E. caninus*. Tyto rostliny rostly v mezeře v asfaltu na vozovce, což mohlo způsobit, že nepůsobí trsnatě, ale vzhledem připomínají *E. repens*. Potomstvo vykazuje stejnou velikost genomu a vzhled chromozomů jako *E. caninus*.

5.7. Ochranné souvislosti - výjimečné aspekty lokality Čertoryje

NPR Čertoryje leží na VJV České republiky, v oblasti CHKO Bílé Karpaty, a sběry byly situované na JJZ svahu lokality. *Elymus hispidus* zde roste ve zcela netypickém prostředí specifických mezofilních, subxerofilních i xerofilních bělokarpatských luk (Jongepierová & Devánová 2008). Kvůli odlišným a neobvyklým stanovištním podmínkám se zde *E. hispidus* „chová“ jinak než na svých obvyklých lokalitách. Příčina tohoto odlišného charakteru není prozatím známa, v genomovém složení nebyla nalezena odlišnost ve srovnání s rostlinami z jiných lokalit. Výlučnost čertoryjské populace může patrně souviset se samotným fenoménem bělokarpatských luk. Ty totiž představují jedny z druhově nejbohatších, reliktních společenstev v celé střední Evropě (Roleček et al. 2014; Wilson et al. 2012). Další potenciální vliv na lokální enormní biodiverzitu má i specifická stratigrafie flyšového substrátu (vlhké podloží, kam dosáhne kořeny jen část rostlin; Jongepierová & Devánová 2008).

Na lokalitě Čertoryje se rostliny s potvrzenou vyšší ploidní úrovní, větší velikostí genomu a hybridy měly tendenci koncentrovaně vyskytovat na okraji lesa, pod solitérními stromy a v okolí procházející cesty. Tento trend však není statisticky potvrzen. Větší disturbance v okolí cesty by mohla zvýšit šanci pro uchycení hybridních jedinců (včetně vyšších ploidí), kteří by byli pravděpodobně kompetičně vyloučeni na úrovni semenáčů. Rostlina T1P1 ($2n=8x=56$) s největší velikostí genomu (35,4 pg), byla nalezena na nejvíce podmáčeném a zarostlém místě lokality.



Obrázek 57: Vyznačení odlesněné plochy (černou čarou) a rozložení absolutních genomových velikostí na Čertoryjích. Číslo bez závorky=absolutní velikost genomu v pg, číslo v závorce=četnost pozorování.

Na lokalitě byl v minulosti proveden ochranný zásah - odstranění dřevinného náletu (Jongepierová & Devánová 2008; Fajmon pers. comm.; obrázek 57), a z toho důvodu bylo i jedním z minoritních cílů této práce zhodnotit, zda podobná disturbance umožnila zvýšený výskyt hybridů a vyšších ploidních úrovní na lokalitě. Velká čerstvě odlesněná plocha mohla představovat ideální prostředí pro uchycení některých hybridů, aneuploidů a dalších vzácných cytotypů, které by za normálních podmínek pravděpodobně podlehly v kompetici. Pokud ale srovnáme mapu sběru s vyznačeným ochranným zásahem, je patrné, že na výskyt hybridů a rostlin s potenciálně vyšší ploidní úrovní má vliv spíše opakovaná disturbance v podobě cesty procházející lokalitou víc, než odlesnění části plochy (obrázek 57).

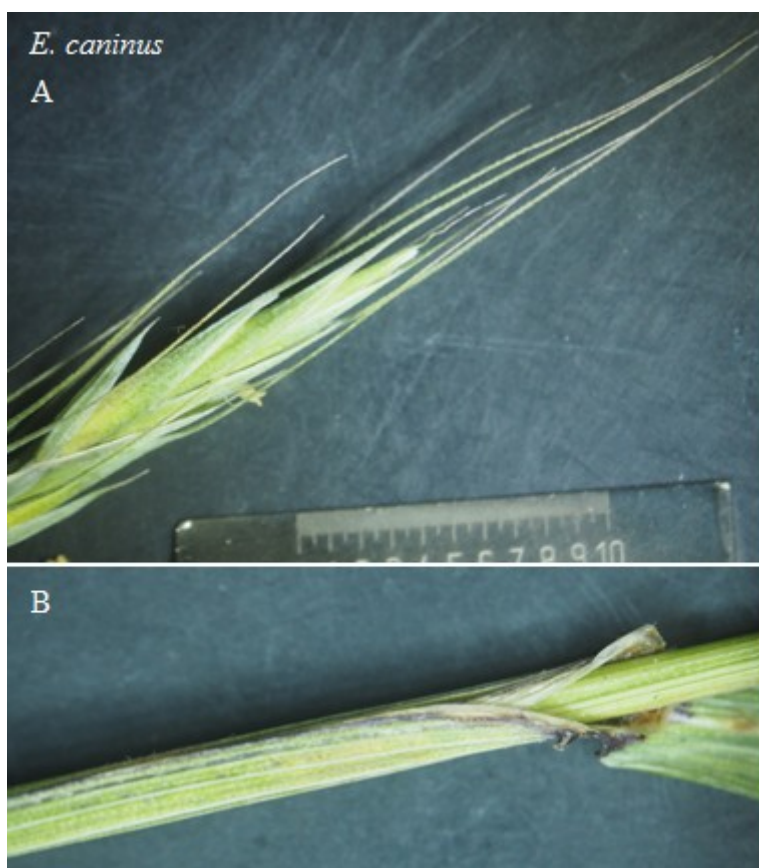
5.8. Taxonomické souvislosti

Studované druhy jsou na našem území členěny do 2 subspecií *E. repens* a 3 variet *E. hispidus* podle Kubát et al. (2002). Novější pojetí podle Danihelka et al. (2012) sloučilo 2 subspecie *E. repens* do 1 a 3 variety *E. hispidus* do 2. Výskyt subspecií a variet na území České republiky není dokonale znám (Kubát et al. 2002).

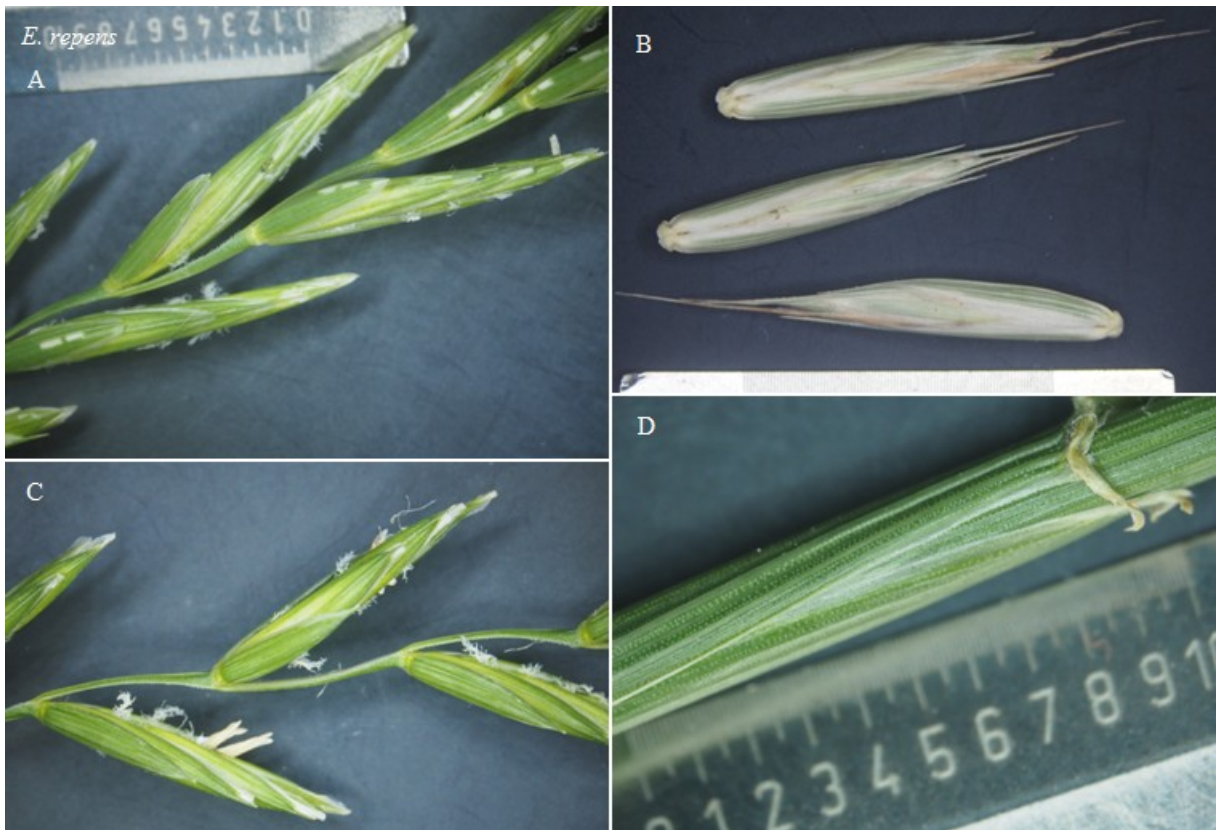
Ze studia morfologie v rámci diplomové práce vyplynulo, že dělení do nižších intraspecifických taxonů na našem území pravděpodobně nemá dostatečné opodstatnění. Především jednotlivé morfotypy nevytvářejí ani náznakem patrné distribuční „pattern“ a lze se s nimi roztroušeně setkat v rámci celého zahrnutého území.

Rozlišovací znak u subspecií *E. repens*, délka osiny v poměru k délce plevy, je běžně variabilní i v rámci populace. Podobná situace je i u chlupatosti pochev dolních listů, povrchu čepele listu a výraznosti střední žilky plev (u variet *E. hispidus*). Ani jeden znak není vhodný pro terénní determinaci, protože pochvy spodních listů se poměrně rychle rozpadají a mizí a pro zjištění znaku na plevách by musel být použit příčný řez plevou.

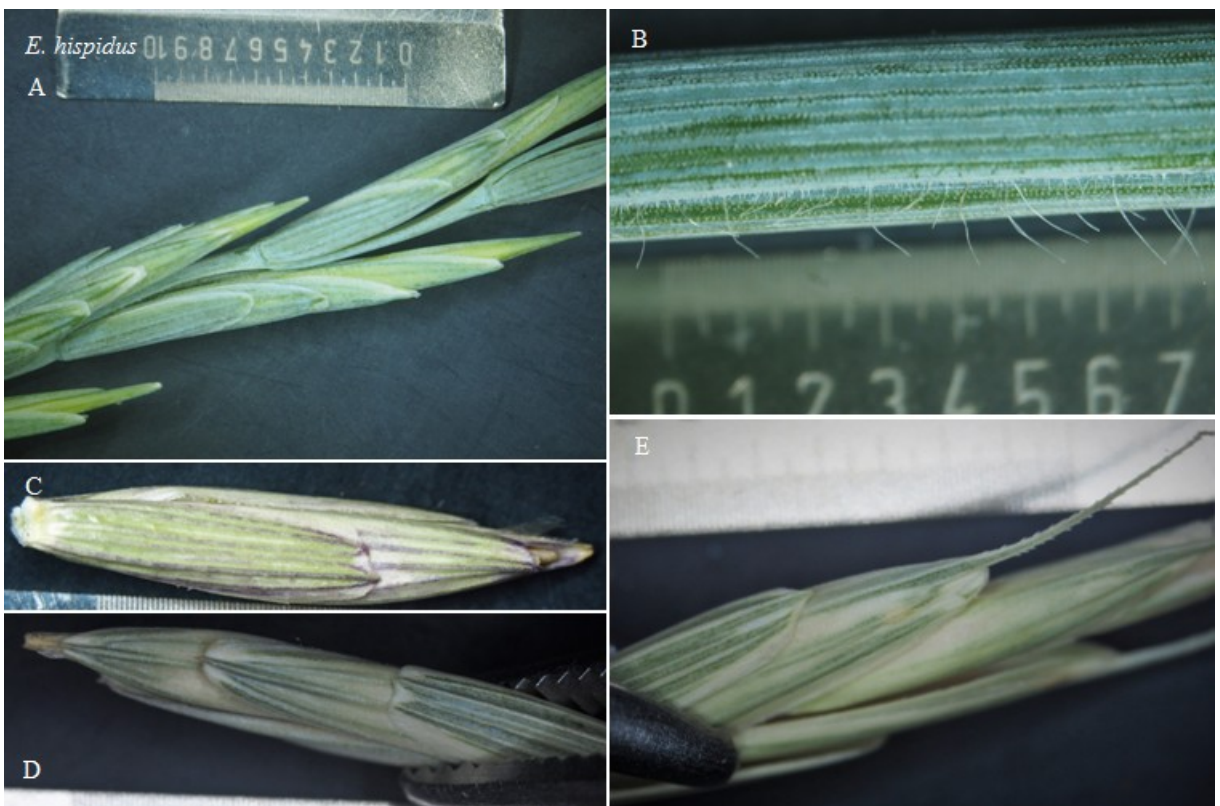
Morfologická variabilita druhů v determinačních znacích je zřetelná z obrázků 58, 59 a 60. *Elymus caninus* je variabilní v délce osin na plevách a pluchách, *E. repens* v přítomnosti osin na plevách a pluchách a *E. hispidus* je nejvíce variabilní ve tvaru zakončení plev a pluch, a to i v přítomnosti osin na nich. Osiny u *E. hispidus* jsou však vždy nasazeny ze hřbetu. Dalším variabilním znakem u *E. hispidus* je hustota brv na volných okrajích listových pochev.



Obrázek 58: Znaky druhu *E. caninus*. A) detail klásku a B) detail volného okraje listové pochvy, bez brv.



Obrázek 59: Variabilita u druhu *E. repens*. A), C) klásek s různými zakončeními plev a pluch, B) detail klásku s osinami na plevách a pluchách a D) detail volného okraje listové pochvy, bez brv.



Obrázek 60: Variabilita u druhu *E. hispidus*. A) celý klásek, B) brvy na volném okraji listových pochev a C), D), E) variabilita zakončení plev, pluch.

5.9. Barvení pylu

Do studia viability pylu nebyl zahrnut počet květů klásků, ve kterých z jakéhokoli důvodu chyběly prašníky (buď kvůli manipulaci s klásky, nebo nebyly vyvinuty). Tyto počty mohly ovlivnit celkové „pattern“ výsledků barvitelnosti pylu. Ale i přesto jsou některé výsledky zcela jednoznačné, např. vyšší ploidní úrovně druhů mají barvitelnost pylu srovnatelnou s rodičovskými druhy. Naproti tomu byly prokázány jednoznačně nižší hodnoty viability pylových zrn na prašník u hybridů, bez ohledu na malé množství zahrnutých vzorků (6 ze 45 celkových).

Nulová viabilita pylových zrn u některých pozorování „čistých“ druhů mohla být způsobena sběrem ve špatné vývojové fázi prašníků, ale celkový výsledek pravděpodobně neovlivnila, protože je rovnoměrně procentuálně zastoupena u všech studovaných skupin.

Vyšší procento fertilního pylu u vyšších polyploidů, než u hybridů, může být způsobeno zmnožením části genomu (části subgenomů) hybridů, které předtím bránily v párování chromozomů při meióze (pokud uvažujeme hybridní původ vyšších polyploidů).

6. Závěr

Předložená práce si kladla za cíl odpovědět na následující tématické okruhy:

1) Jaká je frekvence hybridizace a introgrese *E. repens* a *E. hispidus* na území střední Evropy?

Míra mezidruhové hybridizace dosahuje na základě použitých metod nezanedbatelných hodnot, z 215 populací (bez *E. pycnanthus* a *E. pungens*) bylo 7,9 % s hybridem, 71,2 % byl samostatný druh *E. repens* a 34 % samostatný *E. hispidus*. Smíšených populací s oběma rodičovskými druhy a hybridem bylo 2,3 %, rodičovských druhů bez hybrida 8,8 %, *E. hispidus* s hybridem 6 % a hybrida s *E. repens* bylo 3,3 % populací. Ve 14,4 % populací proběhla hybridizace (vyskytoval se v nich hybrid) nebo měly potenciál pro hybridizaci díky výskytu obou rodičovských druhů. Jak naznačuje dodatečná analýza GISH, může být skutečná míra hybridizace ještě podstatně vyšší, jelikož plošně použité metody (FCM a morfometrika) nedokáží podchytit složitější zpětné hybridy.

Cytometrická a morfometrická data naznačují výrazně asymetrický trend ve zpětné hybridizaci směrem k rodičovskému druhu *E. hispidus*. Jednosměrnou introgresi zřetelně odráží již kontinuální trend dat od intermediárních jedinců ke skupině *E. hispidus* (zejména absolutní velikost genomu). Dalším potenciálním důkazem směru hybridizace je i společný výskyt hybrida ve větším počtu populací s *E. hispidus* než s *E. repens*, i když je *E. repens* na našem území a v „samplingu“ častější.

2) Jaký mikroevoluční význam mají hybridní roje?

- příklad modelové populace Čertoryje

Význam hybridního roje na Čertoryjích je patrný zejména na úrovni tvorby nových ploidních úrovní čistých druhů a hybridů, v jejímž rámci dochází ke vzniku nových kombinací subgenomů. V čertoryjské populaci se vyskytuje enormní množství hybridů, kterých bylo nalezeno 29,6 %, a 8,9 % DNA vyšších polyploidů, z nichž bylo 36,4 % potvrzeno karyologií.

3) Mají studované mikroevoluční mechanismy nějaké morfologické důsledky?

Mezidruhová hybridizace se v morfometrických analýzách odráží spojitým „pattern“, v jehož rámci propojuje hybridní skupina jinak dobře odlišené shluky rodičovských druhů. Morfologická variabilita samotné hybridní skupiny dosahuje srovnatelné míry jako u rodičovských druhů, a tak příhodně odráží výsledky svědčící o výrazně heterogenním

charakteru kříženců (různé počty celých jednotlivých subgenomů od rodičovských druhů), což opět pravděpodobně svědčí o opakovaném vzniku a introgresi. U vyšších ploidních úrovní byl rovněž na základě odlišných subgenomových skladeb prokázán jejich různorodý původ.

4) Jaké je subgenomové složení studovaných druhů?

Diplomová práce potvrdila a značně zpřesnila předchozí studie na úrovni subgenomového složení zahrnutých druhů a počtů jejich rekombinací. Vůbec poprvé byly stanoveny kombinace subgenomů u hybridů.

E. caninus: 28 chromozomů (tetraploid), 14 od *Pseudoroegneria* a 14 od *Hordeum*, bez rekombinací mezi subgenomy.

E. repens: 42 chromozomů (hexaploid), 28 od *Pseudoroegneria* a 14 od *Hordeum*, se 2 rekombinacemi mezi subgenomy.

E. hispidus: 42 chromozomů (hexaploid), 14 od *Pseudoroegneria*, 14 od *Aegilops* a 14 od *Dasyphyrum*, s 9 rekombinacemi mezi subgenomy.

8. Literatura

- Adams K. & Wendel J. F. (2005): Polyploidy and genome evolution in plants. – *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 135–141.
- Ainouche M., Baumel A., & Salmon A. (2004): *Spartina anglica* CE Hubbard: A natural model system for analyzing early evolution changes that affect allopolyploid genomes. – *Biol. J. Linnean Soc.* 82: 475–484.
- Ainouche M. L., Fortune P. M., Salmon a., Parisod C., Grandbastien M. -a., Fukunaga K., Ricou M., & Misset M.-T. (2008): Hybridization, polyploidy and invasion: lessons from *Spartina* (*Poaceae*). – *Biol. Invasions* 11: 1159–1173.
- 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*. – *Evol. Appl.* 4: 685–695.
- Asay K. H. (1992): Breeding potentials in perennial *Triticeae* grasses Crested wheatgrass. – *Hereditas* 116: 167–173.
- Barkworth M. (1992): Taxonomy of the *Triticeae*: a historical perspective*. – *Hereditas* 14: 1–14.
- Barkworth M. E., Capels K. M., Long S., Andeston L. K., Piep M. B. [eds.] (2007): *Flora of North America*, vol. 24, Oxford University Press, New York. 238–378.
- Bennett M. D., Smith J. B. & Smith L. R. I. (1982): DNA amounts of angiosperms from the Antarctic and South Georgia. – *Environm. Exp. Bot.* 22: 307–318.
- Bennett M. D., Bhandol P., & Leitch I. J. (2000): Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and their modern Uses—807 New Estimates. – *Ann. Bot.* 86: 859–909.
- Bolaji A. O., Nwokeocha C. C., & Faluyi J. O. (2012): The occurrence of a hybrid swarm involving *O. longistaminata* A. Chev. et Roehr., *Oryza glaberrima* Steud. and *Oryza sativa* Linn. in Jebba, Nigeria. – *Ife J. Sci.* 14: 37–44.
- Conert H. J. (2000): *Pareys Gräserbuch, Die Gräser Deutschlands erkennen und bestimmen*, Berlin, Parey Buchverlag. 224–564.
- Conert H. J., Jäger E. J., Kadereit J. W., Schultze – Motel W., Wagenitz G., Weber H. E. [eds.] (1998): *Gustav Hegi Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, 1. Band, 3. Teil, Berlin, Parey Buchverlag, 3. ed. 771–843.
- Danihelka J., Chrtek J., & Kaplan Z. (2012): Checklist of vascular plants of the Czech Republic. – *Preslia* 84: 647–811.
- Díaz-Pérez A. J., Sharifi-Tehrani M., Inda L. A., & Catalán P. (2014): Polyphyly, gene-duplication and extensive allopolyploidy framed the evolution of the ephemeral *Vulpia* grasses and other fine-leaved *Loliinae* (*Poaceae*). – *Mol. Phylogenet. Evol.* 79: 92–105.
- Dewey D. R. (1984): The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial *Triticeae*. In: Gustafson J. P. [ed.]: *Gene Manipulation in Plant Improvement*. Plenum Publishing, New York, U. S. A. 209–279.
- Doležel J., Greilhuber J., & Suda J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – *Nat. Protoc.* 2: 2233–2244.
- Doležel J., Sgorbati S., & Lucretti S. (1992): Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. – *Physiol. Plant.* 85: 625–631.
- Dostál J. & Červenka M. (1992): *Velký klíč na určování vyšších rostlín II*, Bratislava, Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 1. ed. 1392–1401.
- Ellneskog-Staam P., Salomon B., Bothmer R. Von, & Anamthawat-Jónsson K. (2003): The genome composition of hexaploid *Psammopyrum athericum* and octoploid *Psammopyrum pungens* (*Poaceae:Triticeae*). – *Genome* 164–169.
- Ellstrand N. C., Whitkus R., & Rieseberg L. H. (1996): Distribution of spontaneous plant hybrids. – *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 5090–5093.
- Fedak G. & Han F. (2005): Characterization of derivatives from wheat-*Thinopyrum* wide crosses. – *Cytogenet. Genome Res.* 109: 360–367.
- Fischer M. A., Oswald K., Adler W. (2008): *Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol*, Linz., Biologiezentrum der Oberösterreichische Landesmuseen, 3. ed. 1197–1200.
- Fradkin M., Ferrari M. R., Ferreira V., Grassi E. M., Greizerstein E. J., & Poggio L. (2011):

- Chromosome and genome composition of a *Triticum* × *Thinopyrum* hybrid by classical and molecular cytogenetic techniques. – Genet. Resour. Crop Evol. 59: 231–237.
- Franke R., Nestrowicz R., Senula a., & Staat B. (1992): Intergeneric hybrids between *Triticum aestivum* L. and wild *Triticeae*. – Hereditas 116: 225–231.
- Goncharov N., Golovnina K., & Kondratenko E. (2009): Taxonomy and molecular phylogeny of natural and artificial wheat species. – Breed. Sci. 59: 492–498.
- Gustafson J. P. [ed.] (1984): Gene Manipulation in Plant Improvement. Plenum Publishing, New York, U. S. A. 209–279.
- Hájková P., Roleček J., Hájek M., Horsák M., Fajmon K., Polák M., & Jamrichová E. (2011): Prehistoric origin of the extremely species-rich semi-dry grasslands in the Bílé Karpaty Mts (Czech Republic and Slovakia). – Preslia 83: 185–204.
- Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 9.
- Hanušová K., Ekrt L., Vít P., Kolář F., & Urfus T. (2014): Continuous morphological variation correlated with genome size indicates frequent introgressive hybridization among *Diphasiastrum* species (*Lycopodiaceae*) in Central Europe. – PLoS One 9: e99552.
- Charkevicz S. S. (1985): Plantae vasculares orientis extremi sovietici, Vol. 1., Leningrad, Nauka. 110–141.
- Chytrý M. (2012): Vegetation of the Czech Republic: diversity, ecology, history. – Preslia 84: 427–504.
- Jäger E. J. (2011): Exkursionsflora von Deutschland, Vol. 3., Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 20. ed. 259–265.
- Jongepierová I. & Devánová K. (2008): Historie managementu. – In: Jongepierová I. [ed.], Louky Bílých Karpat (Grasslands of the White Carpathian Mountains). - ZO ČSOP Bílé Karpaty, Veselí nad Moravou. 434–436.
- Jongepierová I., Jongepier J. W., Devánová K., Fajmon K., Hájek M. & Škodová I. (2008): Vybrané vzácné rostliny. – In: Jongepierová I. [ed.], Louky Bílých Karpat (Grasslands of the White Carpathian Mountains). - ZO ČSOP Bílé Karpaty, Veselí nad Moravou. 101–127.
- Jongepierová I. [ed.] (2008): Louky Bílých Karpat (Grasslands of the White Carpathian Mountains). - ZO ČSOP Bílé Karpaty, Veselí nad Moravou. 1–461.
- Keim P., Paige K. N., Whitham T. G., & Lark K. G. (1989): Genetic analysis of an interspecific hybrid swarm of *Populus*: occurrence of unidirectional introgression. – Genetics 123: 557–565.
- Kellogg E. (1989): Comments on genomic genera in the *Triticeae* (*Poaceae*). – Am. J. Bot. 76: 796–805.
- Kihara H. (1930): Genomanalyse bei *Triticum* und *Aegilops*. I. Kihara, H., und L. Nishiyama, Genomaffinität in tri-, tetra- und pentaploiden Weizenbastarden. Cytologia 1: 263–284.
- Komarov V. L. (1934): Flora URSS, Vol. 2 (Flora Unionis Republicarum Sovieticum Socialistarum), Iedatel'stvo akademii nauk (Academiae Scientiarum URSS), Leningrad. 590–728.
- Kopecký D., Lukaszewski A. J., & Doležel J. (2005): Genomic constitution of *Festulolium* cultivars released in the Czech Republic. – Plant Breed. 124: 454–458.
- Koutecký P. (2015): MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. – Plant Syst. Evol. 1115–1121.
- Krahulcová A. (1998): Karyologie cévnatých rostlin při aplikaci metod klasického barvení chromozómů. Průhonice. 1–25.
- Krahulcová A., Krahulec F., & Kirschner J. (1996): Introgressive hybridization between a native and an introduced species: *Viola lutea* subsp. *sudetica* versus *V. tricolor*. – Folia Geobot. Phytotaxon. 31: 219–244.
- Kubát. K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J., Štěpánek J. [eds.] (2002): Klíč ke květeně České republiky. [Key to the flora of the Czech Republic.], Praha, Academia. 851–854.
- Liao J. Q., Ross L., Fan X., Sha L. N., Kang H. Y., Zhang H. Q., Wang Y., Liu J., Wang X. L., Yu X. F., Yang R. W., Ding C. B., Zhang L., & Zhou Y. H. (2013): Phylogeny and maternal donors of the tetraploid species with St genome (*Poaceae: Triticeae*) inferred from CoxII and ITS sequences. – Biochem. Syst. Ecol. 50: 277–285.
- Löve Á. (1982): Generic evolution of the Wheatgrasses, Biol. Zbl. 101: 199–212.

- Löve Á. (1984): Conspectus of the *Triticeae*. Feddes Repertorium. 95: 7-8: 425–521.
- Lumaret R. (1988): Cytology, genetics, and evolution in the genus *Dactylis*. – CRC Crit. Rev. Plant Sci. 7(1): 55-91.
- Macková L., Vít P., Ďurišová L., Eliáš P., & Urfus T. (2017): Hybridization success is largely limited to homoploid *Prunus* hybrids: a multidisciplinary approach. – Plant Syst. Evol. 303: 481–495.
- Mahelka V., Fehrer J., Krahulec F., & Jarolímová V. (2007): Recent natural hybridization between two allopolyploid wheatgrasses (*Elytrigia*, *Poaceae*): ecological and evolutionary implications. – Ann. Bot. 100: 249–260.
- Mahelka V. & Kopecký D. (2010): Gene capture from across the grass family in the allohexaploid *Elymus repens* (L.) Gould (*Poaceae*, *Triticeae*) as evidenced by ITS, GBSSI, and molecular cytogenetics. – Mol. Biol. Evol. 27: 1370–1390.
- Mahelka V., Kopecký D., & Paštová L. (2011): On the genome constitution and evolution of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*: *Poaceae*, *Triticeae*). – BMC Evol. Biol. 11: 127.
- Mahelka V., Suda J., Jarolímová V., Trávníček P., & Krahulec F. (2005): Genome size discriminates between closely related taxa *Elytrigia repens* and *E. intermedia* (*Poaceae*: *Triticeae*) and their hybrid. – Folia Geobot. 40: 367–384.
- Mallet J. (2005): Hybridization as an invasion of the genome. – Trends Ecol. Evol. 20: 229–237.
- Mandáková T. (2014): „Malování“ rostlinných chromozomů. – Živa. 3: 98–102.
- Mandáková T., Gloss A. D., Whiteman N. K., & Lysak M. A. (2016): How diploidization turned a tetraploid into a pseudotriploid. – Am. J. Bot. 103: 1187–1196.
- Marhold K. & Hindák F. [eds.] (1998): Checklist of non – vascular and vascular plants of Slovakia, Bratislava, Veda. 348–664.
- Marhold K. & Suda J. (2002): Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii. Karolinum, Praha. 1-159.
- Mason-Gamer R. J. (2004): Reticulate evolution, introgression, and intertribal gene capture in an allohexaploid grass. – Syst. Biol. 53: 25–37.
- Mason-Gamer R. J. (2008): Allohexaploidy, introgression, and the complex phylogenetic history of *Elymus repens* (*Poaceae*). – Mol. Phylogenet. Evol. 47: 598–611.
- Mason-Gamer R. J. (2013): Phylogeny of a genomically diverse group of *Elymus* (*Poaceae*) allopolyploids reveals multiple levels of reticulation. – PLoS One 8: e78449.
- Mason-Gamer R. J., Burns M. M., & Naum M. (2010): Reticulate evolutionary history of a complex group of grasses: Phylogeny of *Elymus* StStHH allotetraploids based on three nuclear genes. – PLoS One 5: e10989.
- Melderis (1980): Tribe Triticeae Dumort. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. [eds.] (1980): Flora Europaea, Vol. 5, Cambridge, Cambridge University Press. 190–206.
- Mirek Z, Piękoś – Mirkowa H., Zając A., Zając M. (2002): Flowering plants and pteridophytes of Poland a checklist, W. Szafer Institute of Botany, Kraków, Biodiversity of Poland, vol. 1. 24, 25, 91, 91, 94, 151, 180.
- Míka V., Kohoutek A., & Odstrčilová V. (2002): Characteristics of important diploid and tetraploid subspecies of *Dactylis* from point of view of the forage crop production. – Rostl. výroba 48: 243–248.
- Mujeeb-Kazi A., Gul A., Rizwan S., Farooq M., Bux H., Ahmad I., Mirza J. I., Delgado R., Rosas V., & Cortes A. (2007): Cytogenetics of intergeneric hybrids between durum wheat (*Triticum turgidum* L.) with *Thinopyrum intermedium* and sub-species *acutum*, *glaucum*, *pulcherrimum*, *trichophorum*, *varnense*. – Pakistan J. Bot. 39: 1217–1227.
- Murat F., Zhang R., Guizard S., Flores R., Armero A., Pont C., Steinbach D., Quesneville H., Cooke R., & Salse J. (2014): Shared subgenome dominance following polyploidization explains grass genome evolutionary plasticity from a seven protochromosome ancestor with 16K protogenes. – Genome Biol. Evol. 6: 12–33.
- Orgaard M. & Anamthawat-Jónsson K. (2001): Genome discrimination by in situ hybridization in Icelandic species of *Elymus* and *Elytrigia* (*Poaceae*: *Triticeae*). – Genome 44: 275–283.
- Otto S. P. & Whitton J. (2000): Polyploidy incidence and evolution. – Annu. Rev. Genet. 34: 401–437.

- Paterson A. H., Bowers J. E., & Chapman B. A. (2004): Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. – *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 9903–9908.
- Peterson R., Slovin J. P., & Chen C. (2010): A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. – *Int. J. Plant Biol.* 1: 66–69.
- Pikaard C. S. (2001): Genomic change and gene silencing in polyploids. – *Trends Genet.* 17: 675–677.
- Refoufi A., Jahier J., & Esnault M. (2001): Genome analysis of a natural hybrid with $2n=63$ chromosomes in the genus *Elytrigia* Desv. (*Poaceae*) using the GISH technique. – *Plant Biol. (Stuttg.)* 3: 386–390.
- Rieseberg L. H. & Carney S. E. (1998): Plant hybridization. *New Phytol.* 140: 599–624.
- Roleček J., Čornej I., Tokarjuk A. A. I. (2014): Understanding the extreme species richness of semi-dry grasslands in east-central Europe: A comparative approach. – *Preslia* 86: 13–34.
- Rubidge E. M. & Taylor E. B. (2004): Hybrid zone structure and the potential role of selection in hybridizing populations of native westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) and introduced rainbow trout (*O. mykiss*). – *Mol. Ecol.* 13: 3735–3749.
- Salina E. A., Adonina I. G., Badaeva E. D., Kroupin P. Y., Stasyuk A. I., Leonova I. N., Shishkina A. A., Divashuk M. G., Starikova E. V., Khuat T. M. L., Syukov V. V., & Karlov G. I. (2015): A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases. – *Euphytica* 204: 91–101.
- Salmon A., Ainouche M. L., & Wendel J. F. (2005): Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (*Poaceae*). – *Mol. Ecol.* 14: 1163–1175.
- Shouliang Ch. & Guanghua Z. (2006): 15. Tribe *Triticeae*. In: Zhengyi W., Raven P. H., Deyuan H. [eds.] (2006): *Flora of China*, Vol. 22, Beijing, Science Press. 386–444.
- Stace C. A., Preston C. D., Pearman D. A. (2015) *Hybrid flora of the British Isles*, 3. ed. BSBI, Bristol.
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: p. 671–675
- Silva G. S. & Souza M. M. (2013): Genomic *in situ* hybridization in plants. – *Genet. Mol. Res.* 12: 2953–2965.
- Soltis D. E., Albert V. A., Leebens-Mack J., Bell C. D., Paterson A. H., Zheng C., Sankoff D., DePamphilis C. W., Wall P. K., & Soltis P. S. (2009): Polyploidy and angiosperm diversification. – *Am. J. Bot.* 96: 336–348.
- Soltis D. E., Soltis P. S., & Tate J. A. (2004): Advances in the study of polyploidy since plant speciation. – *New Phytol.* 161: 173–191.
- Stebbins G. & Pun F. (1953): Artificial and natural hybrids in the *Gramineae*, tribe *Hordeae*. VI. chromosome pairing in *Secale cereale* x *Agropyron intermedium* and the problem of genome homologies in the *Triticinae*. – *Genetics* 38: 600–608.
- Suda J. (2009): Darwinova “odporná záhada” po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí krytosemenných rostlin? – *Živa* 5: 204–208.
- Suda J. (2011): Průtoková cytometrie a její využití v botanice. – *Zprávy Čes. Bot. Společ., Praha*, 46, Mater. 25: 21–42.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P., & Krahulec F. (2006): Ploidy level versus DNA ploidy level: An appeal for consistent terminology. – *Taxon* 55: 447–450.
- Szczepaniak M. (2009): Biosystematic studies of *Elymus repens* (L.) Gould (*Poaceae*): Patterns of phenotypic variation. – *Acta Soc. Bot. Pol.* 78: 51–61.
- Szczepaniak M., Cieslak E., & Bednarek P. T. (2007): Natural hybridization between *Elymus repens* and *Elymus hispidus* assessed by AFLP analysis. – *Acta Soc. Bot. Pol.* 76: 225–234.
- Šmarda P. & Bureš P. (2012): The variation of base composition in plant genomes. In Wendel J. et al. *Plant Genome Diversity, Volume I: Plant Genomes, their Residents, and their Evolutionary Dynamics*. 1. vyd. Wien; Heidelberg; New York et. al. 209–235.
- Šmarda P., Bureš P., Horová L., Foggi B., & Rossi G. (2008): Genome size and GC content evolution of *Festuca*: Ancestral expansion and subsequent reduction. – *Ann. Bot.* 101: 421–433.
- Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. [eds.] (1980): *Flora Europaea*, Vol. 5, Cambridge, Cambridge University Press, 190–206.
- Tzvelev N. N. (1976): *Poaceae* URSS (Zlaki SSSR), Leningrad, Nauka. 105–206.

- Vera F. W. M. (2000): Grazing ecology and forest history. – CAB International, New York. 61–101.
- Vogel K. P., Arumuganathan K. & Jensen K. B. (1999): Nuclear DNA content of perennial grasses of the *Triticeae*. – *Crop Sci. (Madison)* 39: 661–667.
- Walisch T. J., Colling G., Poncelet M., & Matthies D. (2012): Effects of inbreeding and interpopulation crosses on performance and plasticity of two generations of offspring of a declining grassland plant. – *Am. J. Bot.* 99: 1300–1313.
- Ward J. L., Blum M. J., Walters D. M., Porter B. a., Burkhead N., & Freeman B. (2012): Discordant introgression in a rapidly expanding hybrid swarm. – *Evol. Appl.* 5: 380–392.
- Wendel J. F. (2000): Genome evolution in polyploids. – *Plant Mol. Evol.* 225–249.
- Wendel J., Greilhuber J., Doležal J., Leitch I. J. [eds.] (2012): Plant genome diversity, Volume I: Plant genomes, their residents, and their evolutionary dynamics. 1. vyd. Wien; Heidelberg; New York et. al.: Springer. 209-235.
- Wilson J. B., Peet R. K., Dengler J., & Pärtel M. (2012): Plant species richness: the world records. – *J. Veg. Sci.* 23: 796–802.
- Wissemann V. (2007): Plant evolution by means of hybridization. – *Syst. Biodivers.* 5: 243–253.
- Zhengyi W., Raven P. H., Deyuan H. [eds.] (2006): *Flora of China*, Vol. 22, Beijing, Science Press. 386–444.

9. Přílohy

Příloha 1: Eigenvalues znaků pro osy PCA 333 rostlin.

kód znaku	PC1	PC2	PC3
Tu	-0,50657	0,580478	0,40351
HLSL	0,069372	-0,16051	0,002664
HLSU	-0,14113	0,189714	0,172136
logNL	-0,34873	-0,19487	-0,11479
GL	0,71527	0,041898	0,165368
logW2L	-0,01695	0,150416	-0,48028
logL2UI	0,181856	0,35612	-0,38227
logL2LI	0,017898	0,287043	-0,07974
logNS	-0,06015	0,111603	-0,18412
logL4IR	0,267227	0,7919	-0,35386
logL2IR	0,102093	0,722574	-0,43383
logLSwA	0,088544	0,678864	-0,46212
MRS	-0,06896	0,070439	-0,19326
HRS	-0,34763	0,063706	0,021456
HL	-0,11837	0,0798	0,026491
HALS	0,108025	0,031105	-0,04908
logLSTwtA	-0,19625	0,653078	-0,48745
logLSTwA	-0,61687	0,74207	0,031017
logWST	-0,05754	0,241641	-0,73782
logLG1	-0,82564	0,142753	-0,3982
logLG1.LSTwtA	-0,81384	-0,23999	-0,15114
logLSTwtA.WST	-0,15515	0,453751	0,350794
logLSTwA.WST	-0,58195	0,596509	0,475123
logDG1.2	-0,25157	0,040765	-0,25976
logLSwtA.LSwA	0,541643	-0,49303	-0,42561
logLSTwtA.LSTwA	-0,6829	0,506211	0,410087
logLG1.LSTwA	-0,26574	-0,66888	-0,49743
logLSTwtA.L4IR	-0,46083	-0,50697	0,079831
logLG1.L4IR	-0,81956	-0,45899	-0,05529
logLSTwA.L4IR	-0,79405	-0,02314	0,334869
logSG	-0,90434	-0,15983	-0,16517
logSL	-0,74822	-0,08346	-0,16029
logLAG.0.5	-0,79215	0,003451	-0,03271
logLAL.0.5	-0,79209	0,287086	0,198442
AL	-0,74876	0,037773	0,029979
logNoC.0.5	0,904546	0,187545	0,15013
logNoLSwC.0.5	0,88583	0,206407	0,142004
logLC.0.5	0,820211	0,186484	0,143316
CSM	0,90515	0,181145	0,154817

Příloha 2: Eigenvalues znaků pro osy PCA 301 rostlin bez *E. caninus*.

zkratka znaku	PC1	PC2	PC3
HLSL	0,022942	-0,09254	0,066209
logNL	0,413295	-0,03663	-0,04088
GL	-0,68368	-0,13489	0,123932
logW2L	0,015441	0,286808	-0,44076
logL2UI	-0,22942	0,444759	-0,1857
logL2LI	-0,11876	0,205865	-0,10351
logNS	0,016229	0,084166	-0,25495
logL4IR	-0,47003	0,804482	0,054813
logL2IR	-0,28442	0,842515	-0,00428
logLSwA	-0,26462	0,741177	-0,17288
MRS	0,044551	0,129745	-0,22538
HRS	0,273586	0,091408	0,093318
HL	0,057711	0,068385	-0,03029
HALS	-0,10493	0,034494	-0,04392
logLSTwtA	0,030278	0,823903	-0,17334
logLSTwA	0,352029	0,822647	0,15368
logWST	0,084868	0,562219	-0,59534
logLG1	0,809256	0,46989	-0,1349
logLG1.LSTwtA	0,889153	0,016791	-0,04395
logLSTwtA.WST	-0,07396	0,226677	0,562832
logLSTwA.WST	0,294033	0,31122	0,783139
logDG1.2	0,177746	0,072257	-0,4333
logLSwtA.LSwA	-0,3843	-0,18243	-0,61046
logLSTwtA.LSTwA	0,589156	0,211994	0,54427
logLG1.LSTwA	0,774476	-0,08077	-0,31045
logLSTwtA.L4IR	0,586862	-0,42633	-0,18033
logLG1.L4IR	0,909514	-0,24222	-0,13462
logLSTwA.L4IR	0,74561	-0,29858	0,04636
logSG	0,919538	0,071251	-0,10847
logSL	0,738381	0,112694	-0,0703
logLAG.0.5	0,799637	0,148577	0,234943
logLAL.0.5	0,716904	0,185425	0,382305
AL	0,713005	0,136523	0,21832
logNoC.0.5	-0,91788	-0,02156	0,143062
logNoLSwC.0.5	-0,90053	0,00814	0,160518
logLC.0.5	-0,82733	-0,005	0,152852
CSM	-0,91812	-0,0324	0,141418

Příloha 3: Eigenvalues znaků pro osy PCA 124 rostlin z Čertoryjí.

zkratka znaku	PC1	PC2	PC3
CSM	-0,38727	0,513673	-0,64382
logNL	0,125498	-0,25431	-0,06877
GL	-0,08993	0,153986	0,10557
logW2L	-0,38851	-0,51637	-0,04007
logL2UI	-0,35581	0,099985	0,1402
logNS	-0,08243	-0,2936	-0,34776
logL4IR	-0,84196	-0,38321	0,158818
logL2IR	-0,82328	-0,35655	0,163328
logLSwA	-0,59952	-0,49619	-0,16236
HALS	0,174583	0,06322	-0,35209
HUFL	0,114372	0,216428	-0,52066
HLFL	0,004554	0,124589	-0,30048
HML	-0,16466	0,20768	0,087908
logLSTwtA	-0,4457	-0,78875	-0,21204
logLSTwA	-0,27611	-0,82272	-0,36824
logWST	-0,57915	-0,51145	0,014174
logLG1	0,239225	-0,81631	-0,11372
logLSTwA.WST	0,420936	-0,183	-0,36965
logDG1.2	0,414545	-0,37801	-0,03973
logLSTwtA.LSTwA	-0,27611	-0,82272	-0,36824
logLSwtA.LSwA	0,368083	-0,08202	-0,34489
logLG1.LSTwA	0,563784	-0,12896	0,239965
logLG1.L4IR	0,867559	-0,20819	-0,20836
logLSTwA.L4IR	0,740328	-0,1823	-0,45275
logSG	0,697592	-0,39754	-0,20654
logSL	0,400639	-0,17214	-0,33112
logLAG.0.5	0,535298	-0,21265	0,0332
logLAL.0.5	0,311179	0,046303	-0,16937
logNoC.0.5	-0,45503	0,464161	-0,60565
logNoLSwC.0.5	-0,42051	0,524833	-0,62191
logLC.0.5	-0,53339	0,444966	-0,5136

Příloha 4: Seznam lokalit sběru. Druhové složení: **h**=*E. hispidus*, **r**=*E. repens*, **hy**=hybrid, **c**=*E. caninus*, **pu**=*E. pungens*, **py**=*E. pycnanthus*. Kombinace písmen znamenají složení smíšené populace.

populace	lokality	souřadnice	nadm. výška (mnm)	druhové složení
SK	Polsko, Skorocice, Rezerwat Skorocice	N 50.41956°, E 20.67146°	204	hr
HV1	Hrubá Vrbka, u autobusové zastávky Hrubá Vrbka, ZD	N 48.86809°, E 17.47311°	266	hr
CS4	Hrádek, 300 m	N 50.40782°, E 13.76225°	285	hr
CS9	Stroupeč, PP Stroupeč, na cestě vedoucí přes PP, 100 m od Z okraje, pravá část PP	N 50.35814°, E 13.50463°	241	hr
CS10	Stroupeč, PP Stroupeč, J okraj PP, u cesty, levá část PP	N 50.35895°, E 13.49832°	237	hr
MO7	Klentnice, vrchol Stolové hory, NPR Tabulová	N 48.84112°, E 016.63668°	453	hr
MO20	Kurdějov, Kopaniny, cesta do Kopanin za obcí Kurdějov	N 48.9653194°, E 16.7611731°	254	hr
MO25	Havraníky, Na Pískách	N 48.81422°, E 16.00201°	329	hr
MO29	Znojmo, Načeratický kopec, silnice na PP	N 48.8257°, E 16.0933°	275	hr
MO35	Komořany, PP Stepní stráň u Komořan	N 49.19459°, E 16.92602°	295	hr
MO41	Mohelno, S okraj NPR Mohelenská hadcová step, u cesty	N 49.10950°, E 16.18576°	390	hr
MO43	Tetčice, u sochy sv. Jana	N 49.17138°, E 16.40997°	300	hr
Ch16-5	Chorvatsko, Golaš, farma Histria Aromatica	N 45.07168°, E 013.76280°	193	hr
MO26	Havraníky, PP Skalky u Havraníků	N 48.80693°, E 16.00867°	311	hhyr
MO31	Bučovice, PR Šévy	N 49.13652°, E 16.97326°	255	hhyr
MO34	Němčany, PP Mrazový klín	N 49.17305°, E 16.91474°	303	hhyr
MO37	Slavkov u Brna, cesta u kaple sv. Urban	N 49.17022°, E 16.88927°	358	hhyr
MO5	Čelechovice na Hané, PP Vápenice	N 49.53736°, E 17.08824°	319	hhy
VŽ2	Velké Žernoseky, PR Kalvárie, Tři kříže	N 50.54664°, E 14.04997°	234	hhy
L3	Lovosice, Lovoš, 25 m ZJZ od rozcestí Lovoš - pod vrcholem	N 50.52708°, E 14.01813°	535	hhy
CS5	Milá, vrchol Milé	N 50.4348142°, E 13.7580092°	500	hhy
MO32	Bučovice, příjezdová cesta k PP Člupy	N 49.15053°, E 16.96276°	224	hhy
MO44	Podmolí, vinice Šobes, u rozcestí	N 48.815375°, E 15.97601°	282	hhy
CS41	Dolánky, PP Hlaváčková stráň	N 50.21339°, E 14.35749°	229	hhy
CS12	Brzánky, 100 m SV od SZ okraje PP Sovice u Brzáněk	N 50.46674°, E 14.30905°	172	hhy
R1	Žalhostice, 100 m na S od železnice na žluté turistické značce	N 50.52437°, E 14.09035°	182	hyr
CS8	Žatec, PP Žatec, S okraj PP	N 50.34723°, E 13.53634°	267	hyr
MO33	Hodějice, PP Návdivky u Němčan	N 49.15578°, E 16.92359°	278	hyr
N1	Nelahozeves, silnice č. 616, 360 m JZ od vlakové stanice	N 50.28214°, E 14.30415°	203	hyr
CS34	Kadaň, PR Běšický chochol, u okraje lesa	N 50.366981°, E 13.355011°	304	hrc
SI R1	Slovensko, Ružomberok, okraj NP Nízké Tatry u mostu Revúca	N 48.99055°, E 19.28293°	556	rc
SI R2	Slovensko, Ružomberok, okraj NP Nízké Tatry, na cyklostezce č. 033, 200 m ZJZ od křižovatky se zelenou turistickou značkou	N 48.99231°, E 19.28703°	555	rc
Sp4	Polsko, Sromowce Niżne, 400 m VJV od vrcholu Pdskałnia Góra, na žluté turistické značce	N 49.40975°, E 20.40879°	528	rc
Sp5	Polsko, Sromowce Niżne, 300 m SSZ od vrcholu Łysina na zelené turistické značce	N 49.41184°, E 20.42177°	714	rc
Sp11	Slovensko, Tatrská Javorina, 150 m JV po modré turistické značce od rozcestí Pod Muráňom	N 49.24955°, E 20.157333°	1094	rc
Sp12	Slovensko, Lendak, 400 m SSZ od SSZ okraje NPR Belianske lúky	N 49.22078°, E 20.37525°	698	rc

populace	lokality	souřadnice	nadm. výška (mm)	druhové složení
Sp17	Slovensko, Jezersko, 1500 m J od rozcestí v obci na zelené turistické značce	N 49.289078°, E 20.348687°	827	rc
Sli16-4	Slovinsko, Planina, Ravbarjev stolp	N 45.82196°, E 14.24782°	481	rc
CS20	Jinonice, PR Prokopské údolí, žlutá značka na S okraji, u sadu	N 50.04071°, E 014.36295°	279	rc
CS27	Praha - Cholupice, ulice pod Remízem, začátek zahr. kolonie	N 49.9968608°, E 14.4351675°	307	rc
CS35	Korunní Kyselka, Stáž nad Ohří, Korunní, kraj Vojenského újezdu Hradiště	N 50.334038°, E 13.080634°	440	rc
SC3	Nová Paka, čerpací stanice Benzina, Pražská, směr do Jičína	N 50.4829433°, E 15.5047083°	470	rc
TR	Slovensko, Ždiar, 1 200 m SV od vrcholu Havran, u potoka	N 49.25483916°, E 20.20919916°	1364	c
Sp8	Slovensko, Tatranská Javorina, 1000 m SZ po modré turistické značce od rozcestí Kopské sedlo	N 49.23421°, E 20.2083°	1578	c
H4	Hodonín, Hodonínská Důbrava, pramen Ilčíčka	N 48.88529°, E 17.06806°	170	c
CS19	Velemín, cesta na vrchol Kletečné od vesnice Zbožná	N 50.56258°, E 13.97431°	541	c
CS42	Sázava, ulice Benešovská, levý břeh Sázavy, u mostu	N 49.87268°, E 14.89729°	290	c
SK K	Slovensko, Podbanské, NPR Tichá dolina, 1000 m SSV od obce na žluté turistické značce	N 49.1481500°, E 19.9125500°	950	c
1Sr	Srbsko, Deliblato	N 44.85574°, E 21.09236°	148	r
SI R3	Slovensko, Ružomberok, ulice I. Houdeka, 50 m S od křižovatky s ulicí Do Baničného	N 49.06974°, E 19.2989°	474	r
SI R4	Slovensko, Ružomberok, u Kaplnky sv. Jána Nepomuckého na rozcestí zelené turistické značky a cyklostezky 2436	N 49.04667°, E 19.28872°	740	r
SI R5	Slovensko, Martinček, 50 m V od hřbitova	N 49.09062°, E 19.33587°	577	r
SI R6	Slovensko, Martinček, 400 m JV od hřbitova	N 49.08802°, E 19.33095°	688	r
SI R7	Slovensko, Martinček, 800 m JV od hřbitova	N 49.08767°, E 19.32853°	692	r
SI R8	Slovensko, Ploštín, 350 m JJV od vrchu Rohačka	N 49.04441°, E 19.60086°	679	r
SI R9	Slovensko, Pavčina Lehota, Demänovská dolina, u rozcestí ATC Bystrina	N 49.03182°, E 19.57348°	712	r
SI R10	Slovensko, Liptovská Lúžna, 1 200 m S po červené turistické značce od rozcestí v Lipt. Lúžné	N 48.94904°, E 19.32168°	751	r
SI R11	Slovensko, Liptovská Lúžna, 1. odbočka na ZSZ z červené turistické značky vedoucí od Lipt. Lúžné, 600 m od rozcestí	N 48.96063°, E 19.32003°	898	r
SI R12	Slovensko, Liptovská Lúžna, 400 m od V okraje obce, na cyklostezce 042	N 48.93974°, E 19.35434°	862	r
Jas	Slovensko, Jasná, Demänovská dolina, 200 m Z od Z konce obce, u silnice	N 48.971545°, E 19.5881731°	1102	r
Sp1	Slovensko, Haligovce, 400 m od rozcestí v obci, na zelené turistické značce	N 49.37501°, E 20.4618°	505	r
Sp2	Slovensko, Červený Kláštor, 100 m ZJZ od rozcestí zelené a červené turistické značky Pod Pašnou	N 49.38572°, E 20.45777°	529	r
sp3	Slovensko, Lesnica, 100 m V od horního konce sjezdovky	N 49.40301°, E 20.45547°	522	r
Sp7	Slovensko, Ždiar, Monkova dolina, rozcestí červené a zelené turistické značky	N 49.26424°, E 20.2366°	927	r
Sp15	Slovensko, Vojňany, 250 m JJZ od vrcholu Spádník, na cestě	N 49.28058°, E 20.42094°	1013	r
Sp6	Polsko, Sromowce Niżne, 25 m JJZ od Schronisko Trzy Korony	N 49.40477°, E 20.41069°	469	r

populace	lokality	souřadnice	nadm. výška (mmm)	druhové složení
Sp9	Slovensko, Tatranská Javorina, 1200 m JJV od rozcestí Pod Muráňom, modrá turistická značka	N 49.23594°, E 20.17542°	1277	r
Sp13	Slovensko, Kamenica, nezpevněná cesta 100 m od žluté značky na Z konci obce	N 49.19438°, E 20.966°	560	r
Sp14	Slovensko, Kamenica, 50 m Z od vrcholu Zámok	N 49.19589°, E 20.96963°	711	r
Sp16	Slovensko, Rešov, rozcestí Magurské sedlo	N 49.28976°, E 20.42815°	955	r
H1	Hodonín, ulice Lipová alej, vedle integrované střední školy	N 48.8631°, E 17.11269°	187	r
H2	Hodonín, ulice K Hájence, okraj lesa v ohybu silnice	N 48.86316°, E 17.10979°	183	r
H3	Hodonín, Hodonínská Důbrava, ulice U Zoo, mezi zoo a silnicí č. 55	N 48.86514°, E 17.10564°	175	r
H5	Hodonín, Hodonínská Důbrava, 50 m SSZ na žluté turistické značce od rozcestí Svatojánská alej	N 48.88411°, E 17.09767°	181	r
J1	Javorník, Filipovské údolí, rozcestí Liščí bouda	N 48.842248°, E 17.572045°	432	r
S1	Strážnice, Staré Město, levý břeh závlahového kanálu, 200 m Z od mostu přes kanál	N 48.89896°, E 17.29942°	181	r
V	Malá Vrbka, rozcestí Pod Výzkumem	N 48.86677°, E 17.43904°	426	r
VM1	Veselí nad Moravou, 200 m na JJZ od silničního mostu přes Moravu (141,3 km), na levém břehu Moravy	N 48.95114°, E 17.37756°	163	r
Mi2	Mikulov, ulice Kozi Hrádek, rovnoběžná s hranou židovského hřbitova	N 48.80931°, E 16.63658°	258	r
Val	Valtice, nejjižnější okraj vinice U Sv. Anny	N 48.7510005°, E 16.7691605°	211	r
LR	Lednice, rozcestí Lednice - rybníky, žst.	N 48.78124°, E 16.80313°	166	r
PL1	Lednice, 50 m SSV od jízďárny v zámeckém parku	N 48.80321°, E 16.80562°	164	r
Je1	Krhová, rozcestí Jehličná - host.	N 49.4957444°, E 18.0068017°	389	r
Hr1	Hranice na Moravě, 50 m JJZ od železniční stanice	N 49.56416°, E 17.7406167°	280	r
MO1	Otaslavice, před kostelem	N 49.38513°, E 17.06768°	276	r
MO2	Vincencov, J okraj PR Blátka, u silnice	N 49.39945°, E 17.07214°	316	r
VŽ1	Velké Žernoseky, 600 m SSZ od rozcestníku Velké Žernoseky - přívoz, zelená turistická značka	N 50.54461°, E 14.05799°	156	r
O1	Radostice, 800 m JJZ od rozcestníku Radostice, zelená turistická značka	N 50.50192°, E 14.00641°	332	r
N2	Holubice, 310 m JZ od kostela Narození P. Marie	N 50.2013°, E 14.28974°	235	r
PL16-1	Polsko, Krakov, ul. M. Kopernika	N 50.06128°, E 019.94756°	215	r
PL16-2	Polsko, Vratislav, Bastion Sakwowy	N 51.10492°, E 017.03820°	141	r
Sli16-1	Slovinsko, Šmarje, čerpací stanice OMW	N 45.51052°, E 013.70727°	222	r
Sli16-2	Slovinsko, Laze, 198 m od zastávky autobusu	N 45.86383°, E 14.26443°	449	r
Sli16-3	Slovinsko, Laze, 1,2 km od Sli12-2	N 45.8732°, E 14.25849°	524	r
IT16-1	Itálie, Campo Sacro, čerpací stanice Esso u silnice E70	N 45.71882°, E 013.72987°	139	r
IT16-2	Itálie, Romans d' Isonzo, křižovatka Via Cjabanaris a Via del Bosco	N 45.87569°, E 13.43600°	11	r
IT16-3	Itálie, Zugliano, Autostrada Alpe-Adria, čerpací stanice Q8	N 46.01514°, E 013.21994°	77	r
IT16-4	Itálie, Udine, 275 m JJV od kruhového objezdu na Via Andrea Palladio, u Rio Tresemane	N 46.11230°, E 013.22630°	129	r
IT16-5	Itálie, Amaro, levý břeh řeky Fiume Tagliamento, 525 m SZ od mostu přes řeku	N 46.36620°, E 013.06931°	271	r
IT16-6	Itálie, Campiolo, Autostrada Alpe-Adria, odpočívadlo u řeky naproti čerpací stanici Tamoil	N 46.39763°, E 013.16781°	302	r
Ch16-1	Chorvatsko, Pula, Amfiteatar u Puli	N 44.87267°, E 013.85013°	17	r

populace	lokality	souřadnice	nadm. výška (mnm)	druhové složení
Ch16-2	Chorvatsko, Rovinj, Palud, mokřad	N 45.02555°, E 013.70121°	0	r
Ch16-3	Chorvatsko, Rovinj, Palud, mořské pobřeží	N 45.02419°, E 013.70138°	1	r
Ch16-4	Chorvatsko, Rovinj, ulička spojující ulice Istarska a Braće Pesel	N 45.08062°, E 013.64661°	28	r
Ch16-6	Chorvatsko, Svetvinčenat, Svetvinčenat 53	N 45.08942°, E 013.88261°	313	r
Ch16-8	Chorvatsko, Rupa, Rupa Zapad AC Rupa-Rijeka, čerpací stanice Crodux	N 45.44312°, E 014.27353°	404	r
Ch16-9	Chorvatsko, Počitelj, okraj lesa na cestě k Planinarsko Sklonišťe Struge	N 44.37581°, E 15.46575°	1405	r
MO9	Mikulov, zámecký park	N 48.8064228°, E 16.6356283°	253	r
MO10	Dolní Věstonice, červená značka, cesta mezi vinicemi U Kapličky a Pod Lešem	N 48.88279°, E 016.65185°	219	r
MO11	Nosislav, Niva u Šatavy mezi Nosislaví a Pšisticemi	N 49.014433°, E 16.634867°	177	r
MO12	Křepice, Křepické Šidonky	N 49.005167°, E 16.729722°	233	r
MO13	Pavlov, ulice Na Cimbuři, naproti vinici	N 48.876139°, E 16.666944°	271	r
MO14	Milovice, okraj PR Milovická stráň	N 48.847028°, E 16.691806°	194	r
MO16	Zaječí, u železniční stanice a FVE Zaječí	N 48.89040°, E 16.78396°	181	r
MO17	Lednice, Nejdek - rozcestí	N 48.81864°, E 16.77888°	161	r
MO18	Bzenec, NPP Váté písky, u žel. Stanice Bzenec-přívóz	N 48.93525°, E 17.28634°	190	r
MO19	Starovičky, Rybníky	N 48.9073272°E 16.7509728°	172	r
MO21	Křepice, Panin kopec, vinice	N 48.9890581°, E 16.7206100°	300	r
MO22	Kurdějov, Kopaniny, okraj pole rovnoběžného se silnicí č. 420	N 48.9697586°, E 16.7552347°	283	r
MO23	Kurdějov, Kolíbky, okraj cesty ke hurdějovskéu rybníku	N 48.9325928°, E 16.7729425°	205	r
MO24	Sobotín, silnice č. 11, u rozcestí s cyklostezkou u Klepáčova	N 50.0090278 °, E 17.1536667°	812	r
MO36	Rousínov, silnice k PP Hřebenatkový útes	N 49.19241°, E 16.90272°	316	r
MO38	Polička, hřbitov, Starohradská ulice	N 49.71465°, E 16.25503°	565	r
MO39	Bernartice, SZ okraj NPP Hadce u Želivky	N 49.68919°, E 15.10883°	416	r
MO40	Herálec, čerpací stanice OMV, E65	N 49.51455°, E 15.41650°	626	r
MO45	Bojanovice, Bojanovice 64, vjezd do rekreačního areálu Bojanovice-píla	N 48.9507931°, E 15.9878850°	340	r
CS17	Černolice, ulice Novodvorská, mezi Černolicemi a Všerory	N 49.9155381°, E 14.3086719°	336	r
CS18	Praha 4 - Michle, park u podchodu pod magistrálou (5. května)	N 50.0459886°, E 14.4566778°	260	r
CS21	Praha, cesta u pole mezi Butovicemi, Radlicemi a Hlubočepy	N 50.04606°, E 014.37841°	318	r
CS22	Mělník, křižovatka ulic Nádražní a Jiřího z Poděbrad	N 50.3529156°, E 14.4911008°	170	r
JC 1	Velešín, čerpací stanice Benzina, silnice č. 3	N 48.8209761 °, E 14.4591108°	549	r
CS23	Mělník, cesta mezi Pšovkou a zahr. osadou, 100 m JV od silnice č. 9	N 50.34906°, E 014.49429°	165	r
CS24	Mělník, ul. Okružní, most přes Pšovku	N 50.34599°, E 014.50136°	173	r
CS25	Dlouhopolsko, autobusová zastávka Dlouhopolsko .ZD	N 50.1751925°, E 15.3051353°	235	r
CS26	Dlouhopolsko, u křižovatky polní cesty vedoucí k Dlouhopolskému rybníku a silnice č. 328	N 50.1679464°, E 15.3033436°	231	r
SC1	Nová Ves nad Nisou, naproti základní škole	N 50.7251111°, E 15.216774°	625	r
SC2	Lípa nad Orlicí, u silnice č. 30432, mezi tratí a náhonem	N 50.1311111°, E 16.1316111°	261	r

populace	lokality	souřadnice	nadm. výška (mnm)	druhové složení
JC2	Dobrotín, naproti zahradnictví Filipov	N 48.9966722°, E 15.2132203°	644	r
JC3	Vnorovice, u rozcestí Hardův Mlýn	N 49.0358089°, E 15.4335964°	455	r
JC4	Marketa, Z konec obce, cesta vedoucí do pole	N 48.9770431°, E 15.4765264°	500	r
JC5	Staré Město pod Landštejnem, rozcestí žluté a červené turistické značky, u ŘOP	N 49.0151733°, E 15.2388358°	595	r
JC6	Albeř, hráz rybníku Osika, u výpustě do říčky Dračice	N 49.0298958°, E 15.1432681°	636	r
JC7	Třeboň, ulice Na Kopečku, mezi autobusovými zastávkami U Petra a Pavla a U myslivny	N 49.0075547°, E 14.8019039°	441	r
JC8	Třeboň, U Svatého Víta, v zatáčce u Mlýnského rybníka	N 49.01844°, E 14.777603°	433	r
CS27 I.	Mukařov, polní cesta z Vicmanova	N 50.587472°, E 14.917034°	367	r
CS28	Žďár, silnice č. 279 od Žehrova, odbočka k památníku	N 50.527692°, E 15.101862°	270	r
CS29	Žďár, žlutá turistická značka, cesta od Žehrova, odbočka k Hornímu rybníku	N 50.530171°, E 15.088645°	254	r
CS30	Kochánky, pole mezi vesnicemi Kochánky a Mačeříž, Pod Vinicí	N 50.2890886°, E 14.7621956°	226	r
CS31	Strašnov, břeh rybníka Jordán	N 50.352445°, E 14.877915°	262	r
CS32	Brodce, cesta k vrcholu Homolka	N 50.324679°, E 14.880584°	244	r
CS33	Dětenice, PP Dymokursko-Bahenské louky	N 50.344929°, E 15.136725°	239	r
CS36	Vojenský újezd Hradiště, Na Příčinách, louka na úbočí vrchu Havraň	N 50.33545°, E 13.145611°	698	r
CS39	Boží Dar, Turistický přístřešek na NS Božídarská rašeliníště u Blatenského příkopu	N 50.414254°, E 12.899932°	977	r
CS40	Praha 6 - Ruzyně, Drnovská, u nádraží Praha - Ruzyně	N 50.0847728°, E 14.3089983°	334	r
JC9	Suchdol nad Lužnicí, u kempu Vodácká Základna	N 48.90635°, E 14.889131°	446	r
JC10	Horní Cerekev, čerpací stanice Euro Oil, Tyršova	N 49.32543°, E 15.32009°	605	r
Plzeň	Plzeň, Lobzy, les u ulice Na Hraně	N 49.7388889°, E 13.4158333°	340	r
SOOS	Nový Drahov, NS SOOS mezi geologickým parkem a Císařským pramenem	N 50.14761°, E 12.40327°	439	r
vu vl	Německo, Zogenreuth, Truppenübungsplatz Grafenwöhr, vápencový lom	N 49.701145°, E 11.669842°	557	r
vu D	Německo, Brandlberg, 600 m SV na cestě vedoucí do Grünthalu	N 49.0443106°, E 12.1434103°	413	r
vp sk	Německo, Zogenreuth, Truppenübungsplatz Grafenwöhr, JV 2 km vzdušnou čarou od Zogenreuth	N 49.6962469°, E 11.6910303°	556	r
vD 2	Německo, Brandlberg, u křižovatky ulic Haidhofsweg a Bodenwöhrstrasse	N 49.04156°, E 12.13546°	351	r
nDsv sv 1	Německo, Pfatter, Pfatterer Au, ZJZ od kříže na křižovatce cest	N 48.97146°, E 12.37798°	321	r
nDnv 2	Německo, Pfatter, Pfatterer Au, JJV od kříže na křižovatce cest	N 48.97084°, E 12.38213°	324	r
MO46	Olomouc, ulice Šlechtitelů, u autobusové zastávky Šlechtitelů	N 49.57450°, E 17.27853°	218	r
MO47	Olomouc, 105 m ZJZ od vlakového přejezdu v ulici U Botanické zahrady	N 49.5855967°, E 17.2475903°	213	r
MO48	Zderaz, Pískovcová skalní obydlí	N 49.82717°, E 16.10019°	479	r
Ukr 1	Ukrajina, Zarvanytsya, silnice H0	N 49.76822°, E 24.99994°	301	h
Ukr 2 a	Ukrajina, Wolica, Terebovlja	N 49.28536°, E 25.712527°	298	h
Ukr 2 b	Ukrajina, Ivakhnivtsi, západní okraj města	N 49.0915°, E 26.352916°	301	h

populace	lokality	souřadnice	nadm. výška (mnm)	druhové složení
Ukr 3A	Ukrajina, Čortkiv, Horishnya Vyhnanka, severní okraj města, 50 m od železnice	N 49.03055°, E 25.79716°	285	h
Ukr 3B, C	Ukrajina, Čortkiv, Horishnya Vyhnanka, severní okraj města 200 m od železnice	N 49.029972°, E 25.79577°	288	h
Ukr 4	Ukrajina, Kamjanec-Podilskyj, meandr řeky Smotrych, 300 m severně nad městem Ustyja	N 48.577361°, E 26.64294°	160	h
H6	Pánov, JZ okraj PP Pánov u střelnice	N 48.88323°, E 17.13418°	201	h
H7	Pánov, PP Pánov, 100 m na cestě vedoucí od střelnice do přírodní památky	N 48.88419°, E 17.13482°	205	h
H8	Pánov, 200 m na cestě v PP Pánov vedoucí od Z okraje PP	N 48.88546°, E 17.141101°	206	h
M2	Vrbovce, PR Machová, cesta vedoucí od SSZ na JJV, 400 m od JJV okraje rezervace	N 48.82723°, E 17.53209°	464	h
1D	Pavlov, 50 m SSV od rozcestí Pod Děvínem, na zelené turistické značce	N 48.8671039°, E 16.6488061°	503	h
2D	Pavlov, 150 m JZ od vrcholu Děvína, na zelené turistické značce	N 48.86851°, E 16.64833°	523	h
3D	Pavlov, 75 m VJV od vrcholu Děvína, na zelené turistické značce	N 48.8692706°, E 16.6511075°	534	h
4D	Pavlov, 25 JJV od rozcestí Děvín - rozc.	N 48.8675803°, E 16.6505978°	514	h
Mil	Mikulov, 150 m VSV od rozcestí Pod Božím hrobem, nezpevněná cesta	N 48.80735°, E 16.65229°	344	h
VS	Pavlov, 400 m SSZ od rozcestí Soutěska - prm., červená turistická značka	N 48.8647961°, E 16.6435758°	426	h
MO3	Vranovice, Trávník, lokality Na skále	N 49.39954°, E 17.09314°	250	h
MO4	Čelechovice na Hané, NPR Růžičkův lom	N 49.52903°, E 17.08576°	297	h
R2	Žalhostice, 350 m JJV na žluté turistické značce od rozcestí Radobýl - odb.	N 50.5296°, E 14.08924°	297	h
L1	Lovosice, 100 m pod vrcholem Lovoše, na zelené turistické značce	N 50.52696°, E 14.01939°	508	h
R3	Žalhostice, Z okraj PP Radobýl	N 50.53002°, E 14.0903°	315	h
R4	Žalhostice, vrchol Radobýl	N 50.53036°, E 14.09342°	400	h
O3	Radostice, Ovčín, 50 m JJZ vrcholu Ovčína	N 50.50436°, E 14.0041°	401	h
O4	Radostice, Ovčín, 70 m JJZ od vrcholu Ovčína	N 50.50456°, E 14.0041°	411	h
L2	Lovosice, vrchol Lovoše	N 50.52762°, E 14.01817°	577	h
CS1	Mnichov, vrchol Oblíku	N 50.41101°, E 13.80669°	493	h
CS2	Mnichov, Oblík, 50 m JJZ od vrcholu, zelená turistická značka	N 50.40969°, E 13.80652°	455	h
CS3	Raná, 150 m J od kostela Všech svatých	N 50.40909°, E 13.77849°	310	h
CS6	Kozly, PP Tobiášův vrch	N 50.45706°, E 13.77495°	344	h
CS7	Staňkovice, PP Staňkovice	N 50.35346°, E 13.56046°	224	h
CS11	Záhoří, 1200 m po od rozcestníku Stroupeč-rozc., po proudu řeky	N 50.34738°, E 13.51011°	223	h
CS13	Štětí, 600 m VSV od MVE Štětí	N 50.47523°, E 14.35306°	158	h
CS14	Štětí, PP Bílé stráně u Štětí, 175 m SSZ od železničního mostu	N 50.46853°, E 14.38400°	208	h
CS15	Radouň, J okraj PP Radouň, části u západního okraje obce	N 50.47907°, E 14.38591°	225	h
CS16	Radouň, PP Radouň, části u severního okraje obce	N 50.48605°, E 14.40194°	222	h
Ch16-10	Chorvatsko, Stari Grad, Nacionalni Park Paklenica	N 44.3670692°, E 15.4630961°	1322	h

populace	lokality	souřadnice	nadm. výška (mnm)	druhové složení
Ch16-14	Chorvatsko, Krš, silnice č. 5146 mezi vesnicemi Krš a Studenci	N 44.717873°, E 15.336321°	576	h
Ch16-15	Chorvatsko, Gornji Kosinj, silnice č. 5153 mezi vesnicemi Gornji Kosinj a Kosinj	N 44.729037°, E 15.280131°	496	h
MO8	Mikulov, PP Kočičí skála	N 48.82614°, E 16.64158°	353	h
MO15	Mikulov, PR Tuold	N 48.81676°, E 16.63831°	322	h
MO27	Nový Šaldorf-Sedlešovice, PP Pustý kopec u Konic	N 48.81268°, E 16.0368°	256	h
MO28	Nový Šaldorf-Sedlešovice, Na Jezeru, cesta podél železnice	N 48.8164947°, E 16.0429808°	252	h
MO30	Dyje, PP Dyjské svahy	N 48.84175°, E 16.12119°	211	h
MO42	Moravský Krumlov, NPR Krumlovsko-rokytenské slepence, okraj u Kaple Svatého Floriána	N 49.04737°, E 16.32021°	311	h
CS37	Kadaň, Úhošť, okraj NPR Úhošť	N 50.364812°, E 13.239735°	551	h
CS38	Kadaň, Úhošť, vrchol	N 50.3587986°, E 13.2381992°	566	h
MO6	Slatinice, 100 m od S okraje PR Malý Kosíř, na silnici	N 49.55643°, E 17.09551°	279	hy
O2	Radostice, 500 m JJZ od rozcestníku Radostice, zelená turistická značka	N 50.5026°, E 14.00719°	336	hy
3T	Turecko, İzmit Yolu 7 km Çiflikköy, břeh Marmarského moře	N 40.68238°, E 29.35588°	1	pu
Ch16-11	Chorvatsko, Ljubač, rozcestí se silnicí do Podvršje a Jordani	N 44.259376°, E 15.321243°	98	pu
IT15-9	Itálie, Brentino Belluno, pravý břeh řeky Adige, u mostu spojující Borghetto a Mama D'avio di Sotto	N 45.698194°, E 10.92405°	133	py
IT15-15	Itálie, Argenta, Z břeh Valli di Comacchio, most ze Strada Umana přes Canale Circondariale Gramigne Fosse	N 44.605527°, E 12.09755°	4	py
IT15-16	Itálie, Alfonsine, Via Raspona přes Canale di bonifaca Destra Reno do madonna del Bosco	N 44.54508°, E 12.062527°	2	py
Ch16-7	Chorvatsko, Rovinj, ulice Šetaliště braće Gnot, svah k mořskému břehu	N 45.0832142°, E 13.6294172°	8	pupy
Ch16-12	Chorvatsko, Rtina, cesta mezi Rtina a Ljubač	N 44.274685°, E 15.298867°	45	pupy
Ch16-13	Chorvatsko, Stara Vas, silnice při severním okraji jezera/mokřadu Velo Blato	N 44.361264°, E 15.146374°	10	pupy