Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Botanika

Studijní obor: Cévnaté rostliny

Bc. Aneta Tröglerová

Hybridizace u středoevropských zástupců rodu *Pulsatilla* a její důsledky pro ochranu

Hybridization of Central European taxa of genus *Pulsatilla* and its conservation consequences

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Konzultanti: Mgr. Marek Slovák, Ph.D.

RNDr. Petr Vít, Ph.D.

Praha, 2024

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, 12.12.2024

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především mému školiteli Tomáši Urfusovi za podporu, cenné rady a neutuchající trpělivost. Nebylo to se mnou vždy snadné, proto si velmi vážím toho, že to se mnou nevzdal.

Také bych chtěla poděkovat přátelům a rodině za podporu, doprovázení na sběry do terénu a pomoc při pěstování mých konikleců. Jsem vám všem vděčná, že jste ve mně věřili a nenechali jste mě to vzdát. Bez vás by se tato práce možná nikdy nedokončila.

Abstrakt

V rámci rostlinné říše je mezidruhová hybridizace rozšířený fenomén. Jedná se o přirozený evoluční proces, který u rostlin hraje dvojí roli. Na jedné straně podporuje genetickou diverzitu a vznik nových druhů, na straně druhé může ohrožovat vzácné taxony narušením jejich genetické integrity. Velké riziko představuje zejména pro vzácné druhy. Jedním z rodů, který je mezidruhovou hybridizací ohrožen, je rod *Pulsatilla*. Mezi druhy jsou velice slabé reprodukční bariéry, takže pokud se na lokalitě vyskytuje více taxonů, velmi pravděpodobně dojde ke křížení. Zároveň se jedná o vzácné a ohrožené druhy, jejichž populace klesají napříč Evropou. Je proto potřeba se věnovat jejich studiu a snažit se odhalit příčiny a důsledky jak jejich úbytku, tak mezidruhového křížení, aby bylo možné stanovit správný management ochrany.

V této práci byla zkoumána hybridizace in-situ a ex-situ u druhů *Pulsatilla patens*, *P. pratensis* subsp. *bohemica* a *P. grandis* za použití průtokové cytometrie a experimentálního křížení. Pomocí průtokové cytometrie se potvrdilo křížení mezi *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica* na lokalitě Humnický vrch v Doupovských horách. Kříženci byly nalezeni dokonce ve vyšším počtu oproti poslední studii. Znamená to, že hybridi se na lokalitě nejen udrží, ale zároveň jich zřejmě přibývá. Zároveň byla odhalena hybridní semena, která poukazují na skutečnost aktivního křížení mezi rodičovskými druhy.

Experimentální křížení bylo prováděno jak na homoploidní, tak heteroploidní úrovni. V případě reciproční kombinace křížení *P. patens* × *P. pratensis* subsp. *bohemica* se ukázalo, že jako mateřská rostlina figuruje *P. pratensis* subsp. *bohemica*, zatímco *P. patens* je dárcem pylu. Heteroploidní hybridizace nebyla úspěšná, jelikož nevyklíčila žádná semena. Pravděpodobně ke křížení mezi *P. pratensis* subsp. *bohemica* × *P. grandis* nedochází, a pokud ano, tak jen velice sporadicky. Důležitým poznatkem vzniklým z experimentálního křížení je prokazatelná schopnost autogamie u *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*.

Pro další ochranářské postupy je potřeba brát v potaz i mezidruhové křížení. Zejména na lokalitě Humnický vrch v Doupovských horách se jedná o zřejmě aktivní proces, k čemuž je nutné přihlédnout při plánování dalšího ochranářského managementu.

Klíčová slova: *Pulsatilla*, mezidruhová hybridizace in-situ ex-situ, průtoková cytometrie, experimentální křížení,

Abstract

Within the plant kingdom, interspecific hybridization is a widespread phenomenon. It is a natural evolutionary process that plays a dual role in plants. On the one hand, it promotes genetic diversity and the emergence of new species; on the other hand, it can threaten rare taxa by disrupting their genetic integrity. It poses a particular risk to rare species. One of the genera that is threatened by interspecific hybridisation is the genus *Pulsatilla*. There are very weak reproductive barriers between species, so if multiple taxa occur on a site, hybridisation is very likely to occur. At the same time, these are rare and endangered species whose populations are declining across Europe. It is therefore necessary to study them and try to identify the causes and consequences of both their decline and interspecific hybridisation in order to determine the correct conservation management.

In this study, in-situ and ex-situ hybridization in the species *Pulsatilla patens*, *P. pratensis* subsp. *bohemica* and *P. grandis* was investigated using flow cytometry and experimental crossing. Using flow cytometry, hybridisation between *P. patens* and *P. pratensis* subsp. *bohemica* was confirmed at the Humnický vrch site in the Doupovské hory Mountains. Crosses were found in even higher numbers than in the last study. This means that hybrids are not only persisting at the site, but are probably increasing. At the same time, hybrid seeds have been discovered, indicating the fact of active hybridization between the parent species.

Experimental crossing was carried out at both homoploid and heteroploid levels. In the case of the reciprocal combination of the *P. patens* × *P. pratensis* subsp. *bohemica* cross, *P. pratensis* subsp. *bohemica* was found to be the parent plant, while *P. patens* was the pollen donor. Heteroploid hybridization was not successful as no seeds germinated. It is likely that hybridisation between *P. pratensis* subsp. *bohemica* × *P. grandis* does not occur and, if it does, only very sporadically. An important finding arising from experimental crosses is the demonstrable capacity for autogamy in *P. patens* and *P. pratensis* subsp. *bohemica*.

Interspecific hybridisation should also be taken into account for further conservation practices. Especially at the Humnický vrch site in the Doupovské hory this is probably an active process, which should be taken into account when planning further conservation management.

Key words: *Pulsatilla*, interspecific hybridization in-situ and ex-situ, flow cytometry, experimental crossing

Obsah

1. Úvod 13

2. Teoretický úvod 14

2.1. Význam mezidruhové hybridizace pro rostliny 14

2.2. Nebezpečí mezidruhové hybridizace pro vzácné druhy 17

2.3. Vybrané druhy České republiky ohrožené mezidruhovou hybridizací z rodu *Pulsatilla* 21

2.3.1. Systematické zařazení rodu *Pulsatilla* 21

2.3.2. Morfologie rodu *Pulsatilla* 23

2.4. *Pulsatilla patens* 24

2.4.1. Morfologie 24

2.4.2. Ekologie 25

2.4.3. Rozšíření a výskyt v České republice 25

2.5. *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* 25

2.5.1. Morfologie 25

2.5.2. Ekologie 26

2.5.3. Rozšíření a výskyt v České republice 26

2.6. *Pulsatilla grandis* 27

2.6.1. Morfologie 27

2.6.2. Ekologie 27

2.6.3.Rozšíření a výskyt v České republice 28

2.7. Ohrožení a ochrana vybraných druhů konikleců 28

2.8. Mezidruhová hybridizace v rámci rodu *Pulsatilla* 29

2.9. Použité metody 31

2.9.1. Průtoková cytometrie 31

2.9.2. Experimentální křížení 32

3. Materiál a Metody 33

3.1. Sběry a rostlinný materiál 33

3.2. Průtoková cytometrie 34
3.3. Experimentální křížení 35
4. Výsledky 38
4.1. Hybridizace in-situ 38
4.1.1. Analýza semen 44
4.2. Hybridizace ex-situ 45
4.2.1. Analýza semen z experimentálních křížení 51
5. Diskuze 53
5.1. Mezidruhová hybridizace in-situ 53
5.2. Mezidruhová hybridizace ex-situ 55
5.3. Význam pro ochranu přírody 58
6. Závěr 59
7. Literatura 61

1. Úvod

Mezidruhová hybridizace představuje přirozený, ale komplikovaný jev, který může být jak na jedné straně hnací silou evoluce, tak na druhé straně důvodem ztráty diverzity. Přestože přispívá ke genetické rozmanitosti a vzniku nových druhů, zároveň často představuje riziko pro ohrožené taxony. Kvůli hybridizaci dochází k oslabení genetické identity vzácného druhu, což může vést až k vytlačení hybridy či konkurenčním příbuzným druhem. V závislosti na schopnosti rozmnožování kříženců lze tuto situaci rozdělit na demografický „swamping" (v případě sterilních hybridů) nebo na genetický „swamping" (v případě, že jsou hybridi fertilní). Ve většině případů jsou tyto jevy vzájemně propojeny. Tyto procesy jsou zvláště ohrožující pro rody, jako je *Pulsatilla*, kde slabé reprodukční bariéry umožňují časté mezidruhové křížení.

Rod *Pulsatilla*, který patří do čeledi *Ranunculaceae*, zahrnuje přibližně 40 druhů rozšířených napříč temperátní oblastí od Evropy, přes Asii, až po severní Ameriku. V podstatě všechny druhy rostoucí v Evropě jsou předmětem ochranářských opatření. Navzdory veškerým snahám dochází ke stálému úbytku populací. Kvůli ztrátě přirozených stanovišť a změně v managementu krajiny jsou jednotlivé lokality izolované a často se na nich druhy setkávají, což může vyústit v mezidruhové křížení. V České republice roste pět druhů koniklecŭ, přičemž jsou zde popsány tři hybridní taxony.

Mezi hlavní cíle této práce patří prozkoumání stavu mezidruhové hybridizace *P. patens* × *P. pratensis* subsp. *bohemica* na lokalitě Humnický vrch v Doupovských horách, odkud byli kříženci popsáni v minulých letech. Také prověřit, zda se rodičovské druhy a jejich hybrid dají spolehlivě rozlišit za použití průtokové cytometrie. Dalším cílem je pomocí experimentálního křížení určit četnost a směr hybridizace mezi druhy *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Dále bude zkoumána možnost křížení na heteroploidní úrovni mezi diploidní *P. pratensis* subsp. *bohemica* a tetraploidní *P. grandis*.

Konkrétně bude snaha odpovědět na tyto otázky:

1. Dochází ke křížení jak na homoploidní (*P. patens* × *P. pratensis* subsp. *bohemica*), tak heteroploidní úrovni (*P. pratensis* subsp. *bohemica* × *P. grandis*)?
2. Jaký je podíl hybridů ve smíšených populacích *Pulsatilla patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*?
3. Je mezidruhová hybridizace jednosměrná nebo obousměrná?

2. Teoretický úvod

2.1. Význam mezidruhové hybridizace pro rostliny

Vědecký pohled na mezidruhovou hybridizaci se v průběhu času výrazně měnil. Zpočátku to bylo téma kontroverzní a zatracované. Díky časté sterilitě hybridů se na mezidruhové křížení pohlíželo jako na minoritní událost či dokonce slepou uličku (Knobloch, 1972). Částečná změna přístupu nastala poté, kdy začalo vycházet najevo, že evoluce nemusí probíhat vždy pomalými a postupnými kroky. Naopak se v některých případech mohlo jednat o rychlou diverzifikaci katalyzovanou často právě mezidruhovým křížením (Anderson & Stebins, 1954).

I když hlavní zájem o mezidruhové křížení v botanice nastal především až během dvacátého století, je jasné, že muselo být důležité již od počátků neolitické revoluce. Postupným výběrem nejlepších znaků a následným vzájemným křížením vznikali jedinci s požadovanými charakteristikami (Zirkle, 1935). Mohly díky tomu vzniknout nejen dnešní běžně rozšířené plodiny. Například při studiu pšenice se ukázalo, že v sobě obsahuje hned několik různých genomů (Feldman & Levy 2012; Walkowiak et al. 2020). Dodnes se hojně v zemědělství využívá tzv. efekt heteroze, projevující se především v prvních filiálních generacích. Kříženci se vykazují vyšší biomasou, rychlejším růstem a reprodukcí a celkovou vyšší životaschopností (Jones, 1917). Dochází tak ke zvýšení výnosů ze sklizně, a proto jsou komerčně dostupné především varianty F1 hybridů, ale využívá se například i při pěstování *Oryza sativa* (Zhou et al., 2012) či *Gossypium hirsutum* (Shang et al., 2016). V případě, že hybridi přežívají a mohou se dále rozmnožovat, lze často pozorovat tzv. transgresivní segregaci. Což znamená, že v pozdějších generacích začínají v některých znacích převyšovat původní rodičovské druhy. Mohou tak například díky vyšší adaptibilitě snadněji osidlovat nová prostředí (Vega & Frey, 1980).

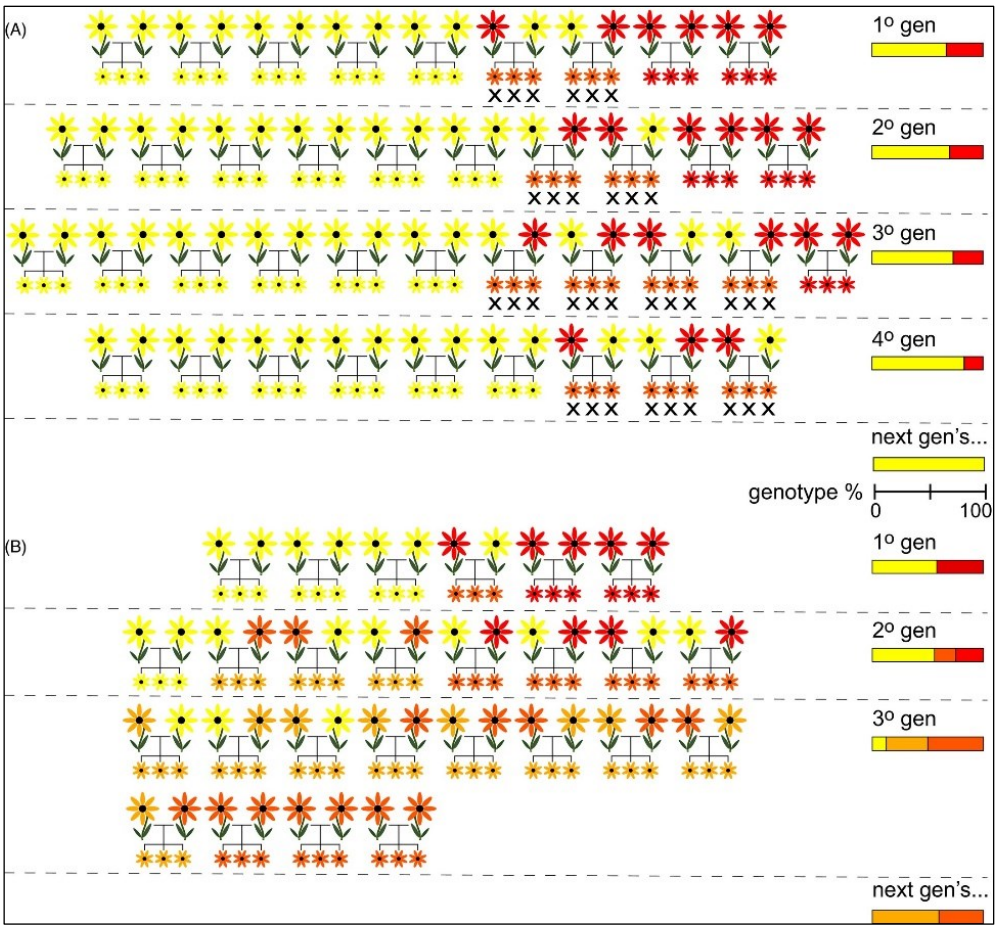
Zprvu odmítavý pohled na hybridizaci se výrazně změnil poté, co došlo k objevení a pochopení mechanismů polyploidizace, neboli multiplikace genomu (Wingë, 1917). Tradičně se rozděluje na autopolyploidii (genomová duplikace v rámci druhu) a alopolyploidii (znásobení chromozových sad pocházejících z více druhů). Nicméně typ ploidie není vždy možné spolehlivě rozlišit (Mallet, 2007). Při studiu alopolyploidie bylo odhaleno několik mechanismů vzniku. Duplikace genomu často následuje po mezidruhové hybridizaci (Stebins, 1947), spojením neredukovaných gamet (Karpechenko, 1927) či tzv. triploidním mostem (Ramsey & Schemske, 1998).

Dnes už je všeobecně přijat názor, že k hybridizaci dochází napříč rostlinnou říší. Stále ale není úplně jasná její role při vzniku nových druhů. Lze ji vnímat jako pouhý „evoluční šum“ (Wagner, 1970) či jako počátek vzniku genetické variability a nových adaptací (Anderson & Stabbins, 1954). Ke vzniku nového druhu může dojít dvěma způsoby; zachováním stejné ploidní úrovně (Abbott et al, 2010; Wang et al. 2021) nebo její změnou (Soltis & Soltis, 1993; Brochmann et al., 2004). Předpokládá se, že homoploidní hybridní speciace je vzácnější (Riesenberg, 1997). Navíc je těžké ji spolehlivě prokázat.

Schumer et al., (2014) stanovili tři podmínky pro dokázání speciace při zachování ploidní úrovně; reprodukční izolace od rodičovských linií, molekulární potvrzení hybridního původu a důkaz, že speciace je následek hybridizace. Tyto tři požadavky nakonec splnila pouze trojice druhů rodu *Helianthus* (Riesenberg et al., 2003). Ukazuje se, že pro stabilizaci nových druhů se stejnou ploidní úrovni je nejdůležitější odlišení habitatu, ať už geografické či ekologické, ideálně spojené s posunem doby kvetení (Abbott et al., 2000; Wang et al., 2001, Wang et al., 2021). Stále není jasné v jak velké míře je homoploidní hybridizace zastoupena, ale předpokládá se, že s posunem v odvětví genetiky a molekulárních metod se podaří odhalit nové případy (Abbott et al., 2010).

Mnohem častěji dochází ke vzniku nových druhů, pokud po hybridizaci následuje znásobení genomu (Stebins, 1947). Wood et al. (2009) dospěli k závěru, že změnou ploidie prošlo během své speciace přibližně 15 % krytosemenných rostlin. Odhady na celkové zastoupení polyploidie v rostlinné říši se různí, ale předpokládá se, že je zastoupena u 30, ale také možná až u 70 % krytosemenných rostlin (Stebbins, 1947; Masterson, 1994). Ve skutečnosti může být procento polyploidů ještě vyšší, jelikož stále dochází k objevu nových paleoploidů (Gao et al. 2018). V průběhu času mohla část (nebo možná všichni) projít procesem tzv. diploidizace, tedy návrat z polyploidní fáze do diploidní (Mandakova et al., 2010; Mandáková & Lysak 2018; Li et al. 2021). Polyploidizace může přinášet velké výhody v podobě efektu heteroze, znásobení počtu genů, maskování recesivních a škodlivých alel a fixace heterozygotů (Osborn et al. 2003; Comai 2005). Díky kombinaci těchto vlastností je pro alopolyploidy snadnější osidlovat nová prostředí. Velice často se tak vyskytují na místech změněných disturbancí, ať už vzniklých lidskou činností nebo změnou klimatu (Brochmann *et al.,* 2004). Předpokládá se, že s postupující klimatickou změnou se bude zvyšovat i procento nově vzniklých druhů znásobením chromozomových sad (Levin, 2019).

Na mezidruhovou hybridizaci nemusíme pohlížet pouze jako na pozitivní proces vzniku nových druhů. Speciálně pro vzácné a ohrožené druhy může mít velmi negativní efekt. Pokud se začnou křížit druhy, mezi kterými nejsou dostatečně vytvořeny reprodukční bariéry, mohou vznikat jak sterilní, tak fertilní hybridi. V případě sterilních kříženců je největším rizikem soupeření o zdroje (např. voda, živiny, světlo…), místo či opylovače. Jestliže se jedná o vytrvalý druh mohou hybridi na lokalitě přetrvávat dlouhodobě a jejich počet se může pomalu navyšovat. Rodičovské druhy se tak postupně vyčerpají tvorbou neplodných hybridních jedinců. Takovýto proces můžeme nazývat tzv. demografickým „swampingem“ (Wolf et al., 2001). Mnohem větší nebezpečí nastává, pokud jsou hybridi fertilní a mohou se zpětně křížit s rodiči. V takovém případě může během jedné sezóny dojít ke vzniku jak nových, tak i zpětných kříženců. Čisté rodičovské linie pak mohou po několika málo generacích zcela zaniknout. V tomto případě lze mluvit o tzv. genetickém „swampingu“ (viz. Obrázek 1; Rhymer & Simberloff, 1996; Todesco *et al.*, 2016).



Obrázek 1–V případě křížení vzácného (červeného) a běžnějšího (žlutého) druhu, může ohrožený druh vyhynout skrze demografický (A) „swamping“ jestliže jsou hybridi sterilní nebo skrze genetický (B) „swamping“ v případě fertility hybridů (převzato z Todesco et al., 2016)

Ke křížení nemusí docházet jen ojediněle na jednotlivých lokalitách. V některých případech mohou vznikat i celé hybridní zóny. Taková oblast může mít několik metrů, ale ty rozsáhlejší se mohou rozkládat v řádech kilometrů (Barton & Hewitt, 1985). Tradičně je lze dělit do tří kategorií. V tzv. „tension zones“ probíhají dva efekty srovnatelného významu, tj. tvorba nových hybridů a selekce vůči nim. Na základě toho se mohou společné regiony v čase a prostoru měnit, což bylo pozorováno například u druhů z rodu *Centaurea* (Hardy et al., 2000), *Populus* (Martinsen et al., 2001) nebo *Senecio* (Prentis et al., 2007). Kříženci mohou vykazovat nižší fitness než rodičovské linie (Barton & Hewitt, 1985). Naproti tomu jsou zóny, kde se hybridi v přechodných stanovištích vyznačují vyšší zdatností než rodiče, ale nižší na specifických stanovištích rodičovských linií. Takové oblasti se většinou nacházejí v ekotonech mezi biotopy rodičovských druhů (Moore, 1977). Tam kde existuje spleť stanovišť, která zaujímají rodičovské druhy, mohou vznikat mozaikové hybridní zóny (Harisson & Rand, 1989). Hybridi vznikají všude, kde se rodičovské formy setkávají a jejich fitness tak může být variabilní. Většinou se jedná o variabilitu na úrovni ekologie, např. odlišný typ půdy (Harrison & Larson, 2016). Pokud fitness hybridů značně převyšuje rodičovské druhy, lze rozlišit ještě další typ hybridní zóny. Kříženci díky své

vyšší zdatnosti, a případně kombinaci nových genů, mohou snadněji osidlovat nové niky, případně méně konkurenceschopného rodiče zcela z hybridní zóny vytlačit (Arnold, 1997).

Není vždy snadné určit, do které kategorie konkrétní hybridní zóna spadá (Abbott, 2017). Navíc se mohou v průběhu let posouvat a měnit. Předmětem zájmu vědců není pouze určení podoby hybridní zóny, ale i zjištění, zda se jedná o primární či sekundární kontakt. V případě primárního kontaktu jde o situaci, kdy se druhy od počátku vyvíjejí pospolu a v průběhu času se akumulují změny a vytvářejí reprodukční bariéry, např. *Knautia arvensis* (Hanzl et al*.,* 2014), *Tephroseris helenitis* (Pflugbeil et al. 2021). Pokud se druhy vyvíjí alopatricky a dojde ke ztrátě překážky, ať už přirozeně (např. konec doby ledové) nebo antropogenním vlivem a dojde tak k sekundárnímu kontaktu, mohou se spolu začít křížit (Barton & Hewitt, 1985). Příkladem sekundárního kontaktu mohou být severoamerické druhy rodu *Pinus* (Latta & Mitton, 1999) či *Populus* (Bolte et al. 2024). Stejně jako není jednoduché určit typ hybridní zóny, tak ani rozhodnutí, o jaký typ kontaktu se jedná, není snadné (Abbott, 2017). Pokud dochází ke zpětnému křížení s rodičovskými druhy může vzniknout extrémní forma hybridní zóny, a to hybridní roje.

Ve snaze vyhnout se hybridizaci a jejím negativním vlivům si rostliny vyvinuly vzájemné bariéry zamezující křížení. Rozdělujeme je podle toho, ve které fázi vývoje se nachází, na prezygotické a postzygotické. Jak vyplývá z názvu, prezygotické bariéry slouží k zabránění vzniku zygoty. Mohou se dále dělit na tzv. „pre-mating“, pokud mají zabránit opylení a „post-mating“, které následují, pokud už k opylení dojde (Moyle et al. 2014). V prvním případě se jedná zejména o geografické rozdělení výskytu, případně specializaci na odlišný druh stanoviště. Dále sem lze zařadit i posuny ve fenologii nebo specializaci na rozdílné opylovače. Do druhé kategorie spadá například inhibice klíčení pylové láčky na blizně nebo kompetice pylu. Do postzygotických bariér lze zařadit sterilitu či sníženou plodnost a tvorbu semen u hybridů, nižší fitness a celkově nízké přežívání kříženců (Pickup et al., 2019; Köhler et al. 2021). Většina studií se shoduje, že prezygotické bariéry hrají významnější roli při vzniku nových druhů, zejména na homoploidní úrovni (Lowry et al. 2008; Christie et al. 2022) Velice účinnou bariérou je duplikace genomu, díky čemuž při případném zpětném křížení s rodičovskými druhy vznikají málo životaschopní a většinou sterilní jedinci. Zájem vědců o studium reprodukční izolace stále stoupá a začínají se používat nové přístupy. Nicméně výzkumy jsou soustředěny jen na malou část cévnatých rostlin. Nejvíce studií se zabývá rody *Ophrys, Pedicularis* a *Mimulus* (Christie et al. 2022).

2.2. Nebezpečí mezidruhové hybridizace pro vzácné druhy

V současné době převládá názor, že mezidruhová hybridizace sehrála významnou roli při formování nových druhů. Zároveň ale může působit opačným směrem a způsobovat ztrátu biodiverzity. Jedná se zejména o případy, kdy se mezi hybridizujícími druhy vyskytne vzácný taxon. Na ohrožené druhy působí celá řada negativních vlivů, a pokud se přidá navíc i mezidruhové křížení, mohou zcela vymizet (Levin et al., 1996; Rhymer and Simberloff, 1996; Todesco et al., 2016).

Stále běžnější způsob ohrožení hybridizací pro vzácné druhy je setkání s příbuzným, a zároveň odolnějším taxonem. Velice často druhotný kontakt způsobí lidská činnost (Ellstrand & Elam, 1993). Člověk krajinu kolem sebe ovlivňuje neustále, a s nástupem globalizace se jeho vliv stále navyšuje. Velký dopad na biodiverzitu má zejména zemědělství, mezinárodní obchod, doprava (zejména lodní na mořské organismy), vytváření disturbancí (těžba surovin, stavba silnic, změna managementu krajiny…) a klimatická změna (Field et al., 2011).

Do kontaktu se tak dostávají druhy, které by se jinak nesetkaly a nemají vůči sobě vytvořené reprodukční bariéry. Případem, který se dá relativně snadno napravit je, pokud jsou hybridi sterilní neboli demografický „swamping". Jedním z takových může být například křížení českého hadcového endemita *Cerastium alsinifolium* s běžně rozšířeným druhem *C. arvense* (Vít el al., 2014). Díky rozdílné velikosti genomu bylo možné využít průtokovou cytometrii, která odhalila hybridní původ u 38,7 % vzorků. Zajímavé na této studii bylo zjištění, že se endemit vyskytuje na stinných a vlhkých habitatech, což bylo v rozporu s původním předpokladem. To dokazuje, že i pro ochranu přírody a určení správného managementu jsou důležité systematické studie (Vít et al., 2014). Australský *Senecio pinnatifolius* sice nepatří mezi vzácné druhy, ale přesto může být demografickým „swampingem" významně ohrožený. Stále častěji se dostává do kontaktu s invazivním *S. madagascariensis*. Přestože jsou vzniklý hybridi sterilní, na některých lokalitách se jejich zastoupení pohybovalo až kolem 75 %. Mohlo by dojít k lokální extinkci původního druhu, a je proto nutné pokusit se zabránit dalšímu šíření *S. madagascariensis* (Prentis et al.,2007).

Daleko větší problém nastává, pokud jsou hybridi fertilní a mohou se dál křížit mezi sebou, případně i zpětně s rodiči. Navíc introgrese ve většině případů probíhá směrem k ohroženým druhům. Riziku křížení s běžnějším příbuzným druhem je vystaven endemický *Cyclamen balearicum*, který se na ostrově Korsika může setkávat s běžnějším *Cyclamen repandum* (Thompson et al., 2010). Nejdříve byli hybridi určeni morfologicky, a poté potvrzeni i pomocí molekulárních markerů. Hybridní pyl prokazoval asi 65 % životnost. Introgrese byla prokázána vůči oběma rodičům, ale násobně více ve směru endemického vzácného druhu. Jelikož je stále dostatečné množství čistých populací *C. balearicum*, není hybridizace přímo ohrožující. Nicméně obě rostliny se vyznačují stejnou fenologií, takže je potřeba zabránit dalšímu pronikání *C. repandum* na lokality *C. balericum* (Thompson et al., 2010). Podobný způsob ohrožení prostřednictvím genetického „swampingu" byl odhalen i v rodu *Onopordum* v jižním Španělsku (Balao et al., 2015). Běžně rozšířený *Onopordum nervosum* se šíří na lokality vzácného *O. hinojense*, kde vytvářejí hybridní taxon *O.* × *onubense*. Křížení probíhá na homoploidní úrovni, takže hybridi jsou fertilní a zpětně se kříží s běžnějším druhem. Z výzkumu navíc vyplývá, že *O. hinojense* produkuje jen asi 8 % životaschopných semen. Vytváří se tak velice silný tlak na vzácný druh, jelikož je vytlačován jak příbuzným druhem, tak i kříženci, kteří ho v obou případech převyšují svou fitnes (Balao et al., 2015).

V rodu *Betula* je hybridizace relativně běžná, a jedním z takto ohrožených druhů je endemit pohoří Altaj; *Betula microphylla* (Ding et al., 2024). Vyskytuje se společně s běžnější *B. tianshanica*, se kterou se i kříží. Molekulární studie ukázaly, že probíhá i introgrese vůči *B. microphylla*. Na některých lokalitách už *B. microphylla* zcela vymizela a na zbývajících se téměř nevyskytují semenáčky. Navíc byli nalezeni kříženci s diploidní *B. pendula* (Koropachinskii, 2013) a další studie odhalila geny introgresně s ní sdílené (Ding et al., 2024). Predikce předpokládají další rozšiřování *B. tianshanica* a *B. pendula*, a tím pádem i nárůst hybridizace s postupující klimatickou změnou a nešetrným hospodařením s okolní krajinou (Ding et al., 2024).

Zároveň i relativně běžné druhy mohou být ohroženy hybridizací, pokud se vinou člověka dostanou do kontaktu s příbuzným nepůvodním druhem. Původní japonský plevel *Eclipta thermalis* dominoval rýžovým polím(Kameyama et al., 2024). Nicméně v padesátých letech byla na ostrovy introdukována *Eclipta alba*. Začala se rychle šířit a hybridizovat s *E. thermalis*. Studie potvrdila několik generací kříženců, což původní druh vystavuje vysokému riziku genetického „swampingu“. Na některých lokalitách byla zcela vytlačena nebo zůstali jen poslední čistí jedinci. Pro zachování původního druhu je potřeba zabránit dalšímu šíření na jih Japonska, kde zůstávají poslední populace *E. thermalis* (Kameyama et al., 2024).

Dalším hojně rozšířeným druhem, který je i přesto ohrožený hybridizací je například *Spartina foliosa*. Původní kalifornský druh je ohrožen invazí *S. alterniflora*, která je kompetičně velmi silná a šíří se podél pobřeží. Zpočátku se vysazovala pro zpevnění okrajů písčin (Wan et al., 2009), ale později se ukázalo, že může jít o nebezpečný invazivní druh. Velmi rychle a efektivně se přizpůsobuje novým, a to i extrémním podmínkám (Hao et al., 2024). Výzkum prokázal, že tam kde se společně nachází *S. foliosa* a *S. alterniflora* se vyskytuje několik generací hybridů. Na mnoha původních lokalitách se *S foliosa* ani nepodařilo identifikovat (Ayres et al., 2002). *Spartina alterniflora* se dál šíří v Evropě (Baumel et al., 2003), Číně (Chung, 2006) i v Africe (Adams et al., 2016), kde se dál kříží s původními druhy a přetváří prostředí kolem sebe (Zhou et al. 2014). Je potřeba její postup dále monitorovat a snažit se zabránit dalšímu šíření.

V posledních letech se začíná stále více zkoumat dopad křížení mezi plodinami a příbuznými divokými druhy. S postupným přeměňováním krajiny na zemědělskou dochází ke stále větší fragmentaci prostředí. Populace zůstávají izolované a může dojít k inbreedingu (Keller & Waller, 2002; Oakley & Winn, 2012). Většina plodin má velice nízkou genetickou variabilitu, čímž se může vzájemným křížením snižovat variabilita a integrita i u původních druhů (Warschefsky et al., 2014). Populace *Macadamia tetraphylla* se rozpadly vinou lidské činnosti a v jejich blízkosti jsou pěstovány kultivary druhu *Macadamia integrifolia*. Oba druhy si jsou blízce příbuzné a překrývají se svou fenologií, takže existuje vysoká pravděpodobnost hybridizace. O´Conor et al., (2015) skutečně potvrdili hybridní původ u 7 % vzorků z populací *M. tetraphylla*. Přenos pylu byl prokázán na vzdálenost až dvou kilometrů a

disperze semen až na 80 metrů. Křížením jsou tak ohroženy i relativně vzdálené populace, což by se mělo brát v potaz při budování dalších makadamových sadů (O'Connor et al., 2015).

Vysoká míra rizika vznikajícího z křížení se ukázala pro divoké příbuzné jabloní. Cornille et al., (2013) studovali tři původní druhy; kavkazskou jabloň východní *Malus orientalis*, evropskou j. lesní *M. sylvestris* a j. Sieversovu *M. siversii* z Centrální Asie. Nejvyšší zastoupení kříženců s *Malus domestica* se prokázalo u *M. sylvestris,* a to 37 %. Pro *M. orientalis* se jednalo o 15 % a nejmenší zastoupení bylo u *M. sieversii* s třemi procenty. Zejména pro *Malus sylvestris* je to velmi znepokojivý výsledek, jelikož se předpokládalo, že křížení probíhá jen ojediněle a kříženci se prokazují nízkou fitnes (Coart et al., 2003). Pro lepší pochopení situace genetického toku mezi jabloněmi je zapotřebí se dále věnovat jejich studiu (Cornille et al., 2013).

Vinná réva se ve Španělsku pěstuje minimálně od starověku ((Buxó i Capdevila 1997; Valera et al., 2024). Podél řek se stále vyskytují přirozené populace divoké *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. Genetická studie ukázala nízkou heterozygozitu u většiny populací a bylo nalezeno deset hybridů z celkového počtu 237 vzorků. Skutečné zastoupení kříženců může být mnohem vyšší vzhledem k omezenému vzorku a relativně malé prozkoumané části z celkového areálu (De Andrés et al., 2012).

Příkladem hybridizace divokého příbuzného druhu s kultivary z českých zemí může být výzkum Macková et al., (2018) na *Prunus fruticosa*. Díky průtokové cytometrii bylo odhaleno dokonce dvojí křížení, a to s *P. cerasus* na homoploidní a s *P. avium* na heteroploidní úrovni. Původní druh je tak ohrožen genetickým „swampingem", tak i demograficky ze strany triploidního potomstva (Macková et al., 2018). Řada divokých příbuzných druhů se začala využívat pro získání nových výhodných genů zejména pro odolnost vůči suchu (Pruski, 2007; Barać et al., 2017). Ztráta genetické integrity původních druhů by tak mohla znamenat vymizení těchto důležitých genů a velké problémy v budoucnosti zemědělství vzhledem k postupujícímu globálnímu oteplování a změnám, které z toho plynou.

Zcela novým problémem v posledních desetiletích je přenos genů z transgenních rostlin do divokých populací příbuzných druhů (Ellstrand et al., 2013). V některých geneticky modifikovaných kultivarech mohou být vloženy geny pro odolnost vůči herbicidům (Gallo-Meagher & Irvine, 1996), patogenní infekci (Verberne et al., 2000) či. suchu (Todaka et al., 2015). Problém nastává, pokud se takové geny přenesou do rostlin, které mají potenciál stát se invazními či plevelnými a mohou tak způsobit značné ztráty (Stewart et al*.,* 2003; Chapman & Burke, 2006). Velká pozornost se věnuje hybridizaci rýžových kultivarů s plevelnou divokou rýží (Oard *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2016). Shodná doba kvetení a blízká genetická příbuznost zvyšují riziko křížení. Prokázaný genetický tok byl sice malý, ale jelikož se stejné kultivary sází i několik sezon za sebou, mohlo by docházet k nárustu kříženců (Chen, 2004; Sanchez Olguin *et al.*, 2009; Pu *et al.*, 2014).

Studie na geneticky modifikované sóji a divokých populacích *Glycine soja* prokázala přenos genu CP4-EPSPS, který je spojován s glyfosátovou rezistencí (Zhang et al., 2023). Kříženci sice

neprokazovali vyšší rezistenci, nicméně měli podobné hodnoty pro plodnost a klíčivost jako divoká sója. Jsou tak plně konkurenceschopní, mohou velice snadno přežívat a šířit se do dalších populací. Také je potřeba brát v potaz dormanci, jelikož hybridní semena prokázala podobně dlouhou životnost jako divoká. Kříženci navíc mohou semena šířit pomocí roztříštění lusků, což by mohlo riziko přenosu transgenních genů ještě znásobit (Zhang et al., 2023).

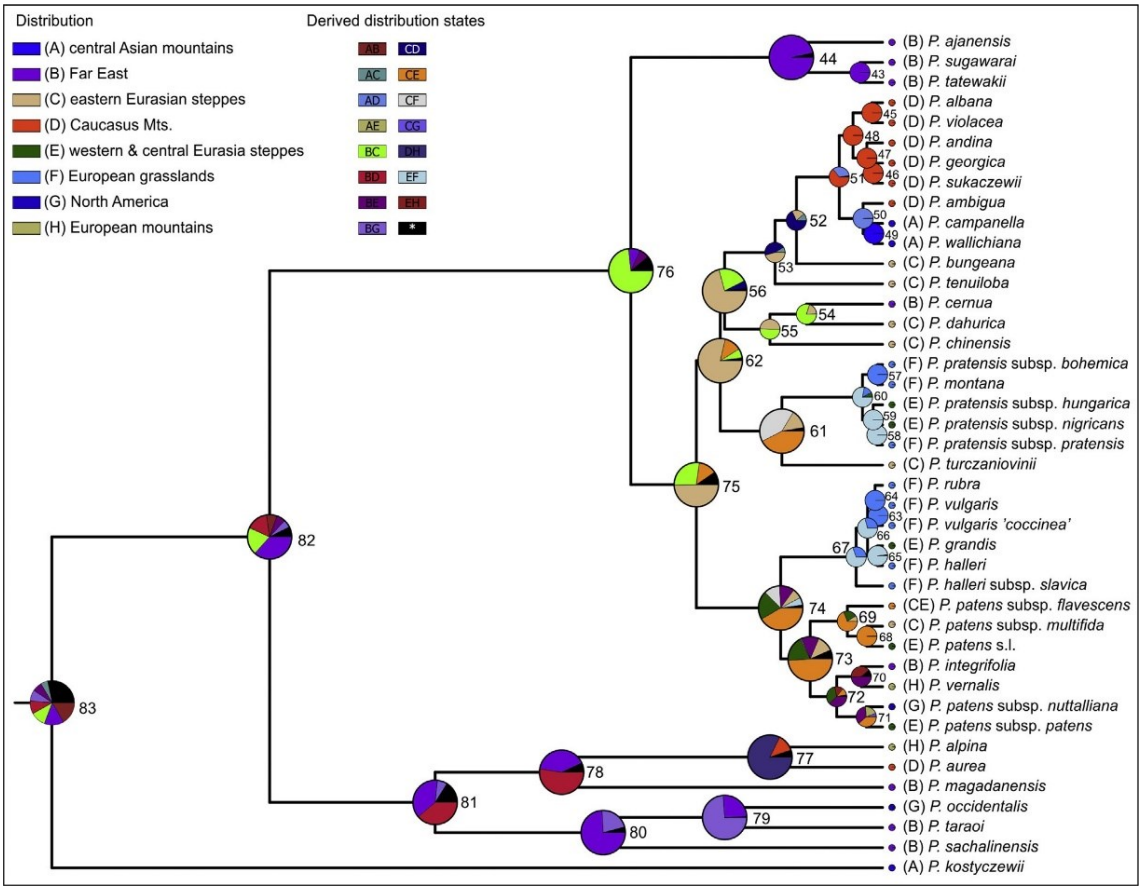
Lactuca serriola je divokým příbuzným pro kultivary salátu *L. sativa*. Jelikož sdílí velkou část genomu, panují oprávněné obavy, že se v případě křížení s geneticky modifikovanými (GM) kultivary přenesou geny pro toleranci abiotického stresu, zejména sucha. Uwimana et al., (2012) provedli výzkum ve sklenících jak v kontrolovaných stresových (sucho, zasolení a nízká hodnota živin), tak v kontrolních nestresových podmínkách. Hybridi z velké části převyšovali svou fitness rodiče v obou experimentech. Představují tak velké riziko pro *L. serriola*, protože ji mohou relativně snadno vytlačit. Prokázal se přenos transgenů, nicméně na první F generace jejich přítomnost neměla velký vliv. I přesto hybridi byli úspěšní a v dalších kříženích by se efekt genů pro odolnost vůči stresorům mohl navyšovat. V přirozených podmínkách se mohou výsledky lišit, nicméně by se při výsadbě GM kultivarů salátu měla brát v potaz hrozba mezidruhového křížení (Uwimana et al., 2012).

Pro hlubší prozkoumání a porozumění mezidruhové hybridizace na území České republiky byl vybrán rod *Pulsatilla*. V tomto rodě jsou vyvinuty jen slabé reprodukční bariéry, a proto mezi druhy běžně dochází ke křížení (Aichele & Schwegler, 1957). Na našem území roste pět druhů konikleců, přičemž všechny jsou vedeny jako ohrožené (Grulich, 2017). Dva z nich se aktivně účastní mezidruhového křížení, konkrétně *Pulsatila patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica* (Krejčová, 2014).

2.3. Vybrané druhy České republiky ohrožené mezidruhovou hybridizací z rodu *Pulsatilla*

2.3.1. Systematické zařazení rodu *Pulsatilla*

Rod *Pulsatilla* náleží do čeledi *Ranunculaceae*, podčeledi *Ranunculoideae*, tribu *Anemoneae* (Tamura, 1993). Sesterský rod představuje *Anemone s.s.* (Hoot et al., 2012; Sramkó et al., 2019). Mezi znaky, kterými lze rod *Anemone* odlišit patří nepravidelně rozvětvený stonek u některých druhů, listeny připomínající přízemní listy, vyšší počet okvětních lístků (až 20) a chybějící nektaria (Skalický, 1988; Tamura, 1993). V současné době je v rodě *Pulsatilla* rozeznáváno přibližně 40 druhů s areálem rozšíření v temperátní zóně od Evropy po severní Ameriku, s centrem v centrální Asii. Rostou od nížin po horská pásma, především na slunných stepích a stráních (Aichele & Schwegler, 1957). Dlouhou dobu byli druhy rozdělovány podle morfologie do pěti sekcí (*Iostemon, Semicampanaria, Preonanthus, Preonanthopsis, Pulsatilla*). Za nejbazálnější druh byla považován *P. kostyczewii* (Aichele & Schwegler, 1957). Recentní studie založená na jaderné a plastidové DNA se zabývala evoluční historií rodu *Pulsatilla* a byl vytvořen příbuzenský genetický strom (viz. Obrázek 2) (Sramkó et al., 2019).

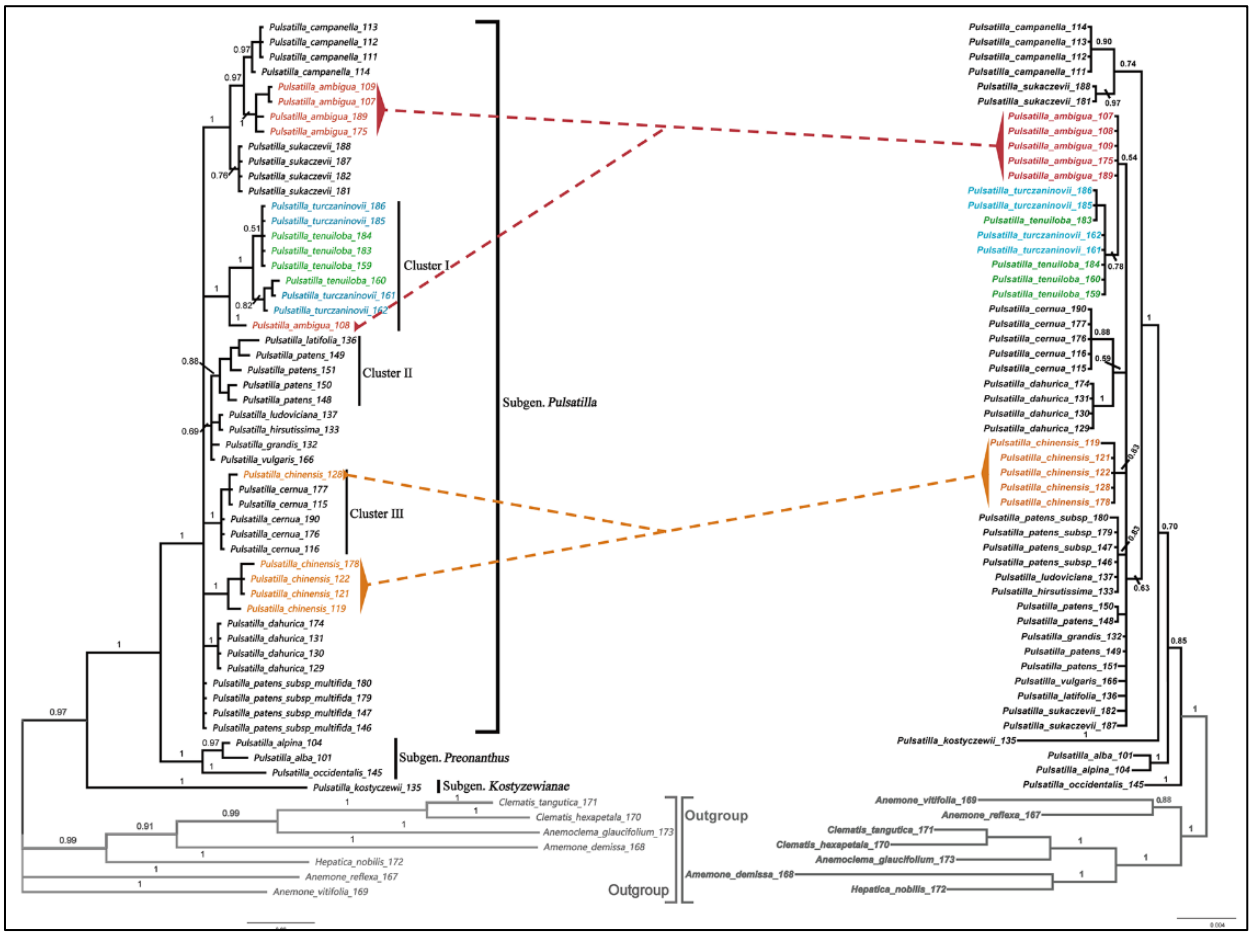


Obrázek 2 – Nově vytvořený fylogenetický strom rodu *Pulsatilla*, který zahrnuje i rozšíření druhů sestavený na základě kombinace jaderných (nrITS a MLH1) a chloroplastových (*rbc*L, *acc*D–*psa*I, *trn*L intron) sekvencí. Unikátní na této studii je, že jsou zahrnuty i 4 poddruhy *P. pratensis* a *P. patens* (převzato ze Sramkó et al., 2019)

S 31 druhy, 9 poddruhy a dvěma kultivary se jedná o nejrozsáhlejší molekulární výzkum v rodě *Pulsatilla*. Druhy byly přerozděleny do tří podrodů (*Kostyczewianae, Preonanthus, Pulsatilla*), v rámci kterých jsou rozlišovány další sekce a série. *Pulsatilla kostyczewii* se ukázala jako sesterská skupina všem ostatním druhům a potvrdil se tak bazální původ jak morfologicky, tak geneticky. Dále se druhy rozdělily do dvou skupin; *Preonanthus* a *Pulsatilla*. Bazálnější podrod *Preonanthus* obsahuje pouze sedm druhů, např. endemický *P. taraoi* z Kurilských ostrovů, *P. sachalinensis* vyskytující se pouze na jediné lokalitě nebo *P. occidentalis* ze severní Ameriky. Mimo jiné se tak potvrdilo osídlení amerického kontinentu přes Beringovu úžinu následované speciací. Všechny ostatní druhy patří do podrodu *Pulsatilla*. Z pohledu českého výzkumu konikleců by mohlo být zajímavé odhalení chromozomové přestavby mezi *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*. U prvně jmenovaného druhu došlo zcela ke ztrátě 5S lokusu, kdežto u druhého k duplikaci a translokaci na akrocentrický chromozom (Sramkó et al., 2019).

Ve stejném roce proběhl podobný výzkum na 19 druzích z rodu *Pulsatilla* (Li et al., 2019). Pro ITS a chloroplastové barkódy vyšly dva lehce odlišné fylogenetické stromy. Někteří jedinci se dokonce zařadili do odlišných větví oproti zbývajícím zástupcům svého druhu (viz. Obrázek 3). Dokazuje to

velice složité a nevyjasněné vztahy mezi jednotlivými druhy konikleců způsobené zřejmě mezidruhovou hybridizací. Bylo určeno 8 variabilních regionů v chloroplastové DNA, čehož by se mohlo využít při dalších studiích genetické diverzity rodu *Pulsatilla* (Li et al., 2019).



Obrázek 3 – Fylogenetické stromy založené na ITS (vlevo) a kombinaci rbcL+matK+trnH-psbA sekvencích (vpravo) pro rod *Pulsatilla*. Je jasně patrné, že stromy se neshodují, a navíc se někteří jedinci shodného druhu oddělily a zařadily se na jiná místa v rámci fylogenetického stromu (převzato z Li et al., 2019).

Základním chromozomovým číslem v rodu *Pulsatilla* je x=8 (Tamura, 1993). Na území České republiky se vyskytují z naprosté většiny diploidní druhy, tedy se somatickou sadou x=16 chromozomů, včetně *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica* (Skalický; 1988; Kaplan et al., 2019). Jediný původní tetraploidní druh s chromozomovým číslem 32 na našem území je *P. grandis* subsp. *grandis* (Skalický, 1998; Kaplan et al., 2019).

2.3.2. Morfologie rodu *Pulsatilla*

Koniklece se řadí mezi vytrvalé rostliny s celým tělem pokrytým chlupy (Tamura, 1993). Živiny a zásobní látky jsou ukládány do vícečetného šupinatého oddenku (Aichele & Schwegler, 1957). Přízemní listová růžice se většinou skládá z vícero složených listů (až z dvanácti). Na stonku je vždy pouze jeden květ, pod kterým se nachází listenový útvar (Skalický, 1988). Květ má zvonkovitý tvar, který může být

široce otevřený a většinou se skládá z šesti okvětních lístků. Okvětí může mít od bílé, přes žlutou až po fialovou barvu (Tamura, 1993). Květ je oboupohlavný a obsahuje velký počet pestíků a tyčinek. Přeměnou vnějších tyčinek vznikla staminodiální nektaria (Aichele & Schwegler, 1957). Po opylení vznikají nažky s chlupatým přívěskem (Skalický, 1988). Koniklece obsahují glykosid ranunkulin, podobně jako ostatní druhy z čeledi *Ranunculaceae*. Štěpí se na jedovatý protoanemonin, který se ale po usušení rostlin stává neškodným (Skalický, 1988).

2.4. *Pulsatilla patens*

2.4.1. Morfologie

Pulsatilla patens (L.) Mill. (koniklec otevřený) je jednodomá dlouhověká rostlina, přežívající i několik desítek let. Průměrně dorůstá zhruba deset centimetrů, ale za plodu může být výrazně vyšší, někdy až ke 40 cm (viz Obrázek 4; Skalický, 1988). Jelikož má vertikální oddenek, vyskytuje se zde vegetativní rozmnožování jen ve velmi malém množství (Wildeman & Steeves, 1982). Přízemní růžice se skládá většinou ze 2-5 trojsečných případně trojčetných listů s úkrojky dlanitodílnými až dlanitosečnými. K plnému rozvinutí dochází až po odkvětu (Wildeman & Steeves, 1982; Skalický, 1988). *P. patens* disponuje zajímavým přizpůsobením stepním podmínkám v podobě dvou druhů pupenů. Jedna část vykvete, zatímco druhá zůstává dormantní. Mohou tak zastoupit funkci terminálních pupenů v případě poškození a zvýšit tak šanci na rozmnožení i ve ztížených podmínkách (Wildeman & Steeves, 1982). Hustě chlupatý stonek nese jediný velký světle fialový květ (Skalický, 1988). Od stáří jedince se odvíjí i počet jednotlivých květů. Průměrně jsou vytvořeny tři, ale staré velké trsy jich mohou vytvořit až 12 (Juśkiewicz-Swaczyna, 2010). Vykvétá brzy na jaře koncem března s optimem v dubnu a může vytrvávat až do první poloviny května. Po opylení se stonek prodlužuje a vytváří se ochmýřené nažky (Skalický, 1988). Předpokládalo se, že chmýr slouží k rozšiřování pomocí větru, ale výzkumy u *P. vulgaris* ukázaly šíření v radiusu pouhých dvaceti centimetrů (Wells & Barling, 1971). Pravděpodobnější je tedy zoochorie. Semena v příznivých podmínkách klíčí již ve stejný rok, případně ten následující. Semenná banka je velice krátkodobá, v rámci jednotek let (Pilt & Kukk, 2002).

Obrázek 4- *Pulsatilla patens*

2.4.2. Ekologie

Pulsatilla patens roste na různorodých typech stanovišť, které ale musí splňovat kombinaci podmínek; sucho, teplo a částečné zastínění. Ve střední Evropě to jsou většinou louky orientované na severozápad (Kubát, 1997), ve Finsku a v Estonsku rozvolněné borovicové lesy (Uotila, 1969; Kalliovirta et al., 2006; Pilt & Kukk, 2002). V současné době se stahuje na okraje lesů, mýtiny a okolí cest a jiná společenstva s rozvolněným stromovým patrem (Uotila, 1969; Pilt & Kukk, 2002). Zřejmě ideálním prostředím je polozastíněná lokalita s nízkou a přerušovanou vrstvou mechu (Uotila, 1969; Pilt & Kukk, 2002; Kalamees *et al.*, 2005). Což je esenciální zejména pro semena, jelikož dokáží vyklíčit pouze na holé půdě (Uotila, 1969).

2.4.3. Rozšíření a výskyt v České republice

Pro *Pulsatilla patens* je typické euroasijské rozšíření. Roste od střední Evropy až po západočínskou provincii Sin-tiang (Tamura, 1993). Ve střední, severní a východní Evropě se rozlišuje druh *Pulsatilla patens* subsp. *patens* (Skalický, 1989). V současné době zbývá v České republice jen kolem 20 lokalit, s centrem rozšíření v Doupovských horách. Největší lokality jsou na Humnickém a Dubovém vrchu (Kubát, 1997). Menší a často sterilní populace jsou v Českém středohoří, Bělé pod Bezdězem a na Hradčanských stěnách (Turoňová et al., 2012). Izolovaná a zřejmě vysazená populace se nachází u obce Líšnice jižně od Prahy (Skalický, 1988; Turoňová et al., 2012).

2.5. *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica*

2.5.1. Morfologie

Pulsatilla pratensis subsp. *bohemica* Skalický (koniklec luční český) je hustě bíle chlupatá vytrvalá rostlina. Dorůstá zhruba do velikosti osmi až patnácti centimetrů (viz. Obrázek 5; Skalický, 1988). Černý oddenek umožňuje ojedinělé vegetativní rozmnožování (Aichele & Schwegler, 1957). Přízemní listy se v průměrném počtu čtyř vyvíjí většinou již za květu. Jsou 1-2 x lichozpeřené s třemi až pěti jařmy s peřenosečnými lístky. Vytvářejí se tak jemné úkrojky, kterých může být až ke dvěma stovkám (Skalický, 1988). Malé, tmavě fialové květy jsou nicí. Okvětní lístky se často během odkvétání otevírají do zvonkovitého tvaru (Skalický, 1988). Začíná kvést na počátku dubna (Kaplan et al., 2019). Plodem jsou asi čtyřcentimetrové nažky s přívěskem, které se vytvářejí po opylení během května (Skalický, 1988).

Obrázek 5 – *Pulsatilla pratensis* subs. *bohemica*

2.5.2. Ekologie

Pulsatilla pratensis subs. *bohemica* se nejčastěji vyskytuje na stráních, skalkách a lesních mýtinách (Skalický, 1988), v rozvolněných lesích, kolem lesních cest a občas se může šířit i na písčiny (Pilt & Kukk, 2002). Jelikož se jedná o brzkou jarní rostlinu jako opylovači převažují čmeláci (Bombus sp. div.) (Torvik et al., 1998).

Semena se vykazují velice nízkou klíčivostí, při pokusu v přírodních podmínkách vyklíčila pouhá tři procenta (Bochenková et al., 2012). Byl zkoumán vliv zvýšené koncentrace dusíku, vyšší hustoty houbového mycelia a odstranění nažky, ale výsledky se téměř nijak nepozměnily. Zřejmě největší negativní dopad má hromadění stařiny a přerůstání konkurenceschopnějšími druhy (Bochenková et al., 2015). Jedná se tedy o druh s velice nízkou kompetiční schopností a pro případnou reintrodukci zřejmě vysazování semen nebude správnou volbou (Buchenková et al., 2012). Naopak se prokázal lehce pozitivní vliv požáru a rychlejší růst semenáčků po přimíchání dřevěných uhlíků do substrátu (Kalamees et al., 2012). Na některých lokalitách byla objevena arbuskulární mykorhiza, která by také mohla mít pozitivní efekt na růst a vývoj rostlin (Moora et al., 2004)

2.5.3. Rozšíření a výskyt v České republice

Pro *P. pratensis* subsb. *bohemica* je typický středoevropský výskyt. V České republice se jeho výskyt soustředí do termofytika a přilehlého mezofytika. Nejvýše stoupá zhruba do 700 m.n.m. (Skalický, 1988). V rámci České republiky má *P. pratensis* značně disjunktní areál výskytu. Většina významných lokalit se nachází v severních, středních a východních Čechách, druhá část populací se vyskytuje na jižní Moravě (www.pladias.cz). Na jižní Moravě se výskyt soustředí do oblastí kolem Mohelna, Třebíče a Brna (www.prirodavysociny.cz). V rámci středních Čech se nachází několik významných a bohatých populací. Mezi největší populace se může řadit například podbrdská lokalita

Na horách u Křešína (Hlaváček & Karlík, 2010). Několik hojných populací se nachází v Českém krasu a v okolí Prahy, jež jsou předmětem ochrany, např. NPR Koda, PP Tetínské skály či PP Kobyla nebo NPP Zlatý kůň (www.portal.nature.cz, Horáčková & Tichý, 2014). V severních Čechách bylo na Ústecku potvrzeno na 60 lokalit (Bultas & Kroufek, 2011). Dále se nachází v Doupovských horách, ve středním Poohří a v podhůří Krušných hor (www.kvmuz.cz).

2.6. *Pulsatilla grandis*

2.6.1. Morfologie

Pulsatilla grandis Wenderoth (koniklec velkokvětý) je vytrvalá hustě bíle či rezavě chlupatá rostlina (viz. Obrázek 6; Skalický, 1988). Řapík na bázi bývá pochvovitě rozšířený. Čepel se 2-3 jařmy, 2-3 x zpeřené s krátkými širokými úkrojky. Listy jsou vzpřímené, většinou po 2 až 5, plně se vyvíjejí až dlouho po odkvětu. Stonek je přímý, krátký (zhruba do 15 cm), nese jeden vzpřímený květ (Futák, 1982). Pod květem se nachází listenový útvar většinou s drobnými úkrojky přitisknutý ke stonku. Eliptické okvětní lístky tvoří nálevkovitý případně zvonkovitý tvar. Barva okvětí je světle fialová, vzácně do modra či bíla, z vnější strany hustě chlupaté (Futák, 1982). Kvete od března do dubna (Kaplan et al., 2019).

Obrázek 6- *Pulsatilla grandis*

2.6.2. Ekologie

Pulsatilla grandis roste na slunných stepích, travnatých plochách, světlých okrajích lesů, případně se objevuje v opuštěných vinicích a sadech (Skalický, 1988). Dokáže tolerovat jak zásadité, tak mírně kyselé substráty, vzácně písčiny (Skalický, 1988). Většinou se vyskytuje v nížinách, ale může vystoupat až do 1000 m.n.m. (Futák, 1982). Jedná se o jeden z diagnostických druhů svazu *Festucion valesiacae*, dále se může vyskytovat ve společenstvech *Seslerio-Festucion glaucae*, *Alysso-Festucion pallentis*,

Alysso alyssoidis-Sedion albi, Geranion sanguinei, *Prunion-fruticosae,* případně v Bílých Karpatech *Bromion erecti* (Skalický, 1988).

2.6.3.Rozšíření a výskyt v České republice

Jedná se o druh s panonským typem rozšíření. Vyskytuje se zejména na Slovensku, v Maďarsku, Rakousku, Slovinsku, Srbsku a na Ukrajině. V České republice se jeho výskyt soustředí pouze na jih Moravy. Nejzápadněji zasahuje do kraje Vysočina, kde má zhruba 16 lokalit, nejvíce v okolí Třebíče (www.kr-vysocina.cz). Nejvíce populací se nachází zejména v panonské části Moravy, např. Pavlovské kopce či Hustopečská pahorkatina. Velký počet lokalit se vyskytuje v okolí Brna a Znojma. V současné době je na území ČR zhruba 200 lokalit, z nichž většina má více než 10 jedinců (www.portal.nature.cz).

2.7. Ohrožení a ochrana vybraných druhů konikleců

V rámci IUCN se *Pulsatilla grandis* a *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* řadí mezi zranitelné druhy, zatímco *P. patens* spadá již pod kriticky ohrožené druhy. Podle Červeného seznamu ohrožených druhů České republiky patří *P. grandis* a *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* mezi silně ohrožené druhy, *P. patens* se řadí do kategorie C1t, tedy kriticky ohrožené (Grulich, 2017). Všechny druhy z rodu *Pulsatilla* jsou chráněny vyhláškou Ministerstva životního prostředí 395/1992 Sb. Zřejmě největšímu zájmu ochránců přírody se těší *Pulsatilla patens*. Byl zařazen do soustavy Natura 2000 pro Českou republiku (Rybka et al., 2004) a zároveň pro něj Ondráček & Blažejová (2020) vypracovali záchranný plán v rámci Agentury ochrany přírody a krajiny ČR. Dále je v rámci Evropy chráněn Přílohou I. Bernské úmluvy a směrnicí o stanovištích 92/43/EHS, v příloze II.

Pro *Pulsatilla patens* představuje největší riziko zarůstání lokalit a hromadění stařiny, způsobené změnami v managementu krajiny, zejména ukončení pastvy a pravidelného sečení (Ondráček & Blažejová, 2020). Může to být problém zejména pro klíčení semen a uchycení semenáčků, které vyžadují holou půdu (Ondráček & Blažejová, 2020). Důležitým prvkem, který by mohl významně přispět k obnově populací, se zdá být vypalování (Kalamees et al., 2005). Požáry v minulosti zajišťovaly pravidelné disturbance, a tím umožnily udržení i kompetičně slabších druhů (Kalamees et al., 2005). Zároveň nejvyšší počet kvetoucích jedinců byl zaznamenám na lokalitách po nedávných požárech (Wildeman & Steeves, 1982). Velké nebezpečí představuje také přemnožená lesní zvěř. I když se jedná o jedovatou rostlinu, jsou zaznamenány případy okusu, zejména od spárkaté zvěře, ale například i od bažantů (Kubát, 1997; Juśkiewicz-Swaczyna, 2010). Jelikož se jedná o výraznou a dekorativní rostlinu, představují riziko i nadšení zahrádkáři, kteří rostliny vyrýpávají. Pro malé populace může ztráta i pár jedinců znamenat velké riziko, případně i zánik (Kubát, 1997; Pilt & Kukk 2002). Velká část lokalit čítá pouze několik málo jedinců a byla u nich pozorována nízká fitness (Szczecińska *et al.*, 2016). Na vině

může být tzv. inbreeding a snížený podíl heterozygotů. Studie na 29 populacích, kterou provedli Reed & Frankham (2003) odhalila velmi nízkou genetickou diverzitu a vysoké procento homozygotů.

V rámci České republiky se *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* může řadit mezi hojnější zástupce rodu *Pulsatilla*. Přestože některé lokality zanikly a jinde jedinců ubývá, stále existuje dostatek relativně stabilních populací (www.portal.nature.cz). Nicméně se jedná o druh s velice slabou schopností konkurence, takže se musí vypořádávat s přerůstáním a vytlačováním agresivnějšími druhy (Bochenková et al., 2015). V současné době probíhají snahy o zlepšení stavu populací, a proto se v rámci Českého krasu obnovila pastva pomocí stáda koz a ovcí. Na pasených plochách postupně narůstá počet kvetoucích jedinců a vzrostla i celková druhová diverzita (Mayerová et al., 2014, *vlastní pozorování*). Dalším přínosem pastvy je vyšší odolnost rostlin proti houbě *Puccinia pulsatillae*, která na koniklecích parazituje. Na spásaných územích klesl počet napadených jedinců a zpomalilo se šíření houby (Wennström & Ericson, 1991).

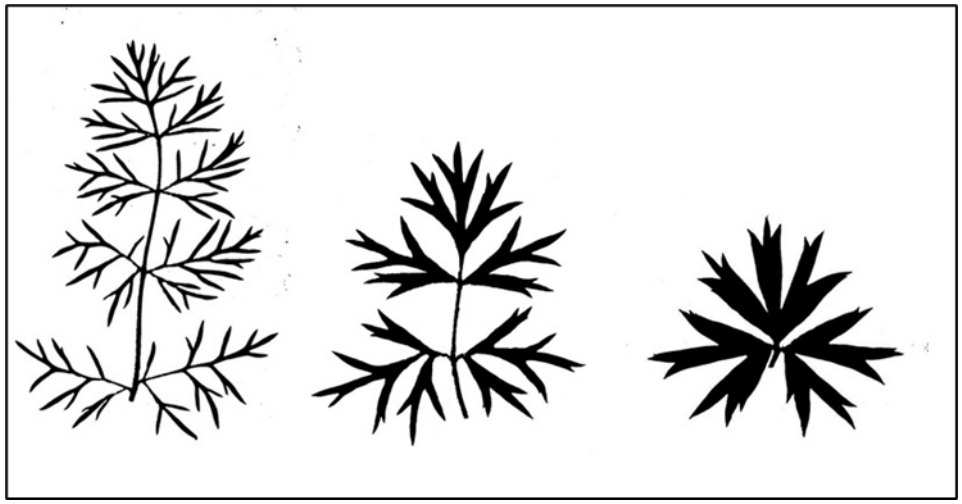
Potíže se zarůstáním lokalit má i *Pulsatilla grandis*. Na lokalitách se šíří invazní druhy a hromadí se stařina, což eutrofizuje půdu. Při experimentech dokázali dospělý jedinci *P. grandis* tolerovat koncentraci až 848 mg N l^{-1}, nicméně nižší koncentrace měli podpůrný účinek na klíčení semen (Bochenková et al., 2017). Specifickým ohrožením pro *P. grandis* je nadměrný sešlap turisty. Nejvíce ohrožená je lokalita PR Kamenný vrch v Brně. Každoročně zde kvetou tisíce květů, což láká k návštěvě stovky lidí denně (Komárek & Podhorský, 2023). Podobná situace se odehrává i na Slovinsku na hoře Boč. Již padesát let nadměrný sešlap, eutrofizace a vyrýpávání rostlin turisty ohrožuje místní populaci. V kombinaci s naprosto nevhodným managementem zbývají na lokalitě poslední desítky jedinců (Kaligaric et al., 2006). Ukazuje se, že pro zachování a stabilizaci populace je zapotřebí, aby se na lokalitě nacházelo alespoň 20 kvetoucích jedinců. Při nižších počtech zřejmě nedochází k dostatečnému opylení a populace je tak odsouzena k pomalému zániku (Komárek & Podhorský, 2023).

2.8. Mezidruhová hybridizace v rámci rodu *Pulsatilla*

Hybridizace je v rostlinné říši rozšířený fenomén. Výjimkou nejsou ani druhy z rodu *Pulsatilla*. Mezidruhové křížení je běžné, jelikož mezi druhy téměř neexistují reprodukční bariéry (Lindell, 1998). Proto lze předpokládat, že téměř všude, kde se objeví společně dva druhy konikleců, se postupem času budou vytvářet hybridi (Aichele & Schwegler, 1957). Předpokládá se, že častěji dochází ke křížení mezi diploidními druhy než mezi tetraploidními. Nicméně při experimentálním křížení bylo pozorováno relativně běžně i mezi vyššími ploidiemi (Lindel, 1998). Na Slovensku se uvádí 6 hybridních taxonů, ale většinou se jedná o sporné a staré záznamy (Futák, 1982). Potvrzené křížení probíhá ve Finsku mezi *P. patens* a *P. vernalis*, kde byli hybridi potvrzeni z pěti lokalit (Jutila et al. 2024). V čínské provincii

Jilin byl nově objeven hybridní taxon *P.* x *yanbianensis*, vzniklý z křížení mezi *P. cernua* a *P. dahurica* (Lv et al., 2011).

Mezidruhová hybridizace v rámci rodu *Pulsatilla* probíhá i v České republice. Z našeho území jsou popsány tři hybridní taxony, konkrétně *Pulsatilla* × *celakovskyana Domin*, *P.* × *mixta* Halácsy a *P*. × *hackelii* Pohl (Skalický, 1988; Danihelka et al., 2012; Kaplan et al., 2019). První uvedený hybrid byl uváděn z Bělé pod Bezdězem a jako rodičovské druhy figurovali *Pulsatilla pratenis* subsp. *bohemica* a *P. vernalis* var. *vernalis.* Nicméně již od roku 1979 nebyl znovu potvrzen (Skalický, 1988), a vzhledem k nízkému počtu kvetoucích jedinců je jeho výskyt na lokalitě velice nepravděpodobný. *Pulsatilla* × *mixta* měla vzniknout křížením *Pulsatilla grandis a P. pratensis* subsp. *bohemica.* Jelikož se jedná o hybridizaci mezi tetraploidem a diploidem, předpokládá se, že vzniklý hybrid bude sterilní triploid. V současnosti není potvrzen z žádných původně uváděných lokalit z okolí Brna a Vyškova (Skalický, 1988). Nejpočetnějším a na rozdíl od předchozích dvou skutečně potvrzeným i ze současnosti, je hybridní taxon *P*. × *hackelii*, jehož rodičovské druhy jsou *P. pratensis* subsp. *bohemica* a *P. patens.* Byl popsán na základě intermediárního vzhledu vůči oběma rodičům. Jelikož i rodičovské druhy jsou variabilní, tak i hybridní znaky mohou být proměnlivé (Čelakovský, 1865). Nejsnáze se dá *P*. × *hackelii* rozlišit pomocí listů (viz. Obrázek 7).



Obrázek 7– Porovnání tvaru listů *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* (vlevo), *P. patens* (vpravo) a jejich hybrida *P*. x *hackelii* (uprostřed) (převzato z Krejčová, 2014)

Při morfometrickém měření se jako nejlepší znaky pro rozlišení jevily počet jařem, délka řapíku lístku a počet úkrojků lístku (Krejčová, 2014). Proměnlivé znaky, které ale lze také použít, jsou červenofialová barva okvětních lístků a jen mírný sklon květu (Čelakovský, 1865; Skalický, 1988; Krejčová, 2014). Starší prameny uvádějí možnou fertilitu hybrida, a tedy i schopnost se šířit a zpětně se křížit s rodiči (Uotila, 1969). Jelikož se na sympatrických populacích kříženci vyskytují spíše zřídka, pravděpodobně budou spíše sterilní (Skalický, 1988). V minulosti se zřejmě vyskytoval na zhruba 15 společných lokalitách *P. patens* a *Pulsatilla pratenis* subsp. *bohemica* (Skalický, 1988). Dále je udáván

ze Záhorskej nížiny na Slovensku (Futák, 1988). V Polsku se výskyt *P.* × *hackelii* potvrdil na 4 lokalitách, ale na třech z nich se nacházel pouze jeden jedinec (Torzewski, 2018).

2.9. Použité metody

Studium vzácných druhů má své limitace. Při plánování výzkumu je potřeba promyslet postup a metody, které se budou využívat, aby experimenty nepředstavovaly příliš velké riziko pro zvolené taxony. Populační sběr se musí přizpůsobit velikosti lokality. Zvolené metody by neměly být příliš destruktivní pro zbylé přežívající jedince, aby paradoxně nepřispěly k jejich dalšímu ohrožení (Guisan et al., 2006). Při studiu mezidruhové hybridizace nelze vždy spoléhat na přechodnou morfologii. Někteří kříženci se vyznačují směsicí rodičovských znaků, ale může se jednat i o kryptické formy, které je velmi těžké rozlišit (Riesenberg, 1995). S postupným rozvojem v oblasti genetiky je možné využívat stále lepší, přesnější a rychlejší metody. Jednou z prvních hojně využívaných metodik byla karyologie, zejm. počítání chromozomů. V současné době se počítání chromozomů nejčastěji využívá pro stanovení aneuploidie (např. Koo et al., 2018) chromozomových přestaveb (např. Nicolas et al., 2012), ale zejména pro kalibraci dat průtokové cytometrie (Garnatje et al., 2004; Carvalho et al., 2017; Vít et al., 2017). Jedná se o relativně složitou a časově náročnou metodu (citace). K výzkumu vzácných druhů jsou čím dál více využívány molekulární markery. Jejich rozvoj postupuje stále vpřed, takže prvotní isozymy postupně nahrazovaly AFLP a RFLP markery, poté mikrosatelity a jednonukleotidové polymorfismy (SNP) až po Rad-seq či Hyb-seq sekvenování. V posledních desetiletích je stále dostupnější celogenomové sekvenování, např. Illumina (Semagn et al., 2006; Agarwal et al., 2008; Garrido-Cardenas et al., 2018). Výzkum a zlepšování metod stále pokračuje a následující roky jistě přinesou nové přístupy.

2.9.1. Průtoková cytometrie

Velmi oblíbenou metodou posledních dekád se stala průtoková cytometrie (Vrána et al., 2014). Dá se využít zejména při studiu ohrožených druhů, jelikož je k úspěšné analýze potřeba pouze malá část rostlinných pletiv (Loureiro et al., 2007). Velkou výhodou je rychlost a přesnost měření, což umožňuje analyzovat velké množství jedinců v relativně krátkém časovém úseku. Důležitou předností je také cena, protože se jedná o velice levnou a dostupnou metodu (Suda, 2005). Téměř jediným kritériem pro využití průtokové cytometrie je, aby se druhy dostatečně lišily ve velikosti genomu. Pro analýzu lze využít nejrůznější typ pletiv od kořenů, přes stonky a listy až po květy a semena (Suda, 2005). Má širokou škálu využití v systematice, populační biologii rostlin či ekologii (Loureiro et al., 2010).

Jedním z rodů, kde byla využita průtoková cytometrie pro studium hybridizace je koniklec (*Pulsatilla*), ve kterém dochází ke křížení i na našem území (Krejčová, 2014). Jelikož v morfologických znacích může být jak hybridní taxon *P.* × *hackelii*, tak rodičovské druhy dosti variabilní, je vhodné pro

přesné určení využít genetické metody. Velikost genomu rodičů se liší o přibližně 14,63 % (Krejčová, 2014; Szczecińska et al., 2017), což je dostatečně velká odlišnost pro využití průtokové cytometrie.

2.9.2. Experimentální křížení

Experimentální křížení se využívalo již od počátků zemědělství. Například u datlových palem panovalo povědomí o dvou typech (pohlavích) jedinců, kteří jsou nezbytní pro vznik plodů. Nicméně se myšlenka sexuality u rostlin nijak dál příliš nerozvíjela (Zirkle, 1935). Dlouho se mezidruhovému křížení nepřikládal žádný význam. Teprve až v osmnáctém století začal postupně mezi botaniky narůstat zájem o hybridy. Nejsnazší cesta, jak hybridizaci studovat bylo provádět experimentální křížení. Jeden z prvních, kdo se pokusil uměle vytvořit hybrida a uspěl, byl zřejmě Thomas Fairchild s rodem *Dianthus* spp. (Zirkle, 1935). I samotný Linné popsal několik hybridních taxonů na základě přechodné morfologie rodičovských druhů. Zároveň prováděl experimentální křížení na rodu *Tragopogon* (Roberts, 1929). Velký pokrok v úvahách o mezidruhové hybridizaci učinil Kölreuter (1761) díky svým pokusům s rodem *Nicotiana*. Stále ale byli hybridi považováni za sterilní (Kölreuter, 1761). Teprve až v devatenáctém století se začala objevovat myšlenka, že křížením mohou vzniknout i fertilní jedinci. Herbert (1847) rozeznával kontinuum mezi druhy a varietami, takže předpokládal plodnost a schopnost rozmnožování i u hybridů. Stejně tak Naudin (1863) potvrdil fertilní křížence díky experimentálnímu křížení v rodě *Datura*. Teprve až znovuobjevení prací Gregora Mendela odstartovalo skutečný zájem o genetiku a postupně zformovalo dnešní pohled na studium nejen mezidruhové hybridizace.

Experimentální křížení se využilo i pro studium rodu *Pulsatilla*. Lindell (1998) prováděl pokusy na čtyřech druzích a ze všech kombinací vznikla semena. Což poukazuje na to, že reprodukční bariéry v tomto rodě jsou velmi slabé. Všechny druhy koniklecůse vykazují protogynii, nicméně i tak dochází k překryvu receptivního období blizen a dozrávání prašníků (Jonsson et al., 1991). Může tedy docházet i k samoopylení. Výnos semen byl ale vždy vyšší při cizosprášení (Jonsson et al., 1991; Lindel 1998; Torvik et al. 1998).

3. Materiál a Metody

3.1. Sběry a rostlinný materiál

Pro výzkum mezidruhové hybridizace v rámci rodu *Pulsatilla* byla přednostně vybrána jedna velká lokalita v Doupovských horách, kterou lze rozdělit na dvě subpopulace, konkrétně vrch Havran a Humnický vrch. Jedná se o největší sympatrickou lokalitu *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica* v České republice. Pro *P. patens* to je zároveň jedna z posledních velkých lokalit s kvetoucími jedinci na našem území. Sběry listů probíhaly opakovaně v letech 2022 a 2023. Rok 2022 byl brán pouze jako pilotní experiment a bylo náhodně sebráno 30 rostlin (15 *P. patens* a 15 *P. pratensis* subsp. *bohemica*). Sběr v roce 2023 proběhl plošně se snahou pokrýt co největší počet jedinců. Na Humnickém vrchu byly odebrány vzorky ze 131 rostlin (52 *P. patens*, 66 *P. pratensis* subsp. *bohemica*, 13 jedinců předběžně morfologicky určených jako hybridi), na subpopulaci Havran 29 rostlin (18 *P. patens*, 9 *P. pratensis* subsp. *bohemica*, 2 jedinci předběžně morfologicky určeni jako hybridi). Pro zjednodušení a lepší čitelnost textu budou dále v práci subpopulace Humnický vrch a Havran označeny souhrnným názvem; lokalita Humnický vrch.

Jako referenční populace byly vybrány dvě lokality *P. pratensis* subsp. *bohemica* z Českého krasu, konkrétně populace v Přírodní rezervaci Kobyla a Zlatý Kůň. Z prvně jmenované lokality bylo analyzováno 22 jedinců, z druhé dvacet tři. Jako referenční populace pro *P. patens* byla vybrána izolovaná lokalita na Dubovém vrchu. Náhodným výběrem bylo sebráno 39 jedinců.

U všech jedinců byl vždy odebrán jeden list pro analýzy průtokovou cytometrií, který byl uložen do sáčků a popsán. Pro všechny jedince z lokality Humnický vrch se zaznamenávaly i souřadnice GPS.

V roce 2023 byla u náhodných fertilních jedinců sbírána i semena. Vždy se z jednotlivých rostlin odebralo pouze několik semen, aby ztráta neohrozila životaschopnost lokality. S příslušným označením jedince, ze kterého pocházela, se uložila do papírových sáčků. Poté následoval klíčící pokus (viz. Obrázek 8). Pro klíčení byly vybrány průhledné plastové nádoby, které prošly důkladným vymývacím a dezinfekčním procesem (horká voda, Savo). Jako substrát byla zvolena kombinace substrátu pro klíčení a substrátu pro kaktusy v poměru 1:2. Před vložením do misek prošly substráty sterilizačním procesem v pečicí troubě, který trval 45 minut při teplotě 90°C. Pro eliminaci houbových patogenů byl použit přípravek Previcur rozpustný ve vodě. Do každé misky bylo zasazeno větší množství semen, a poté se překryla potravinovou folií s otvory, pro lepší udržení vlhkosti. Klíčení probíhalo v klíčidle Panasonic nastaveném na 21/18 °C den/noc a 16hodinový interval světla. Případně poté ve venkovních chráněných podmínkách bez přímého slunce, aby mohlo klíčení probíhat ve větším množství. Výsevy probíhaly opakovaně.

V případě, že semena vyklíčila a vytvořila pravé lístky mohla být zanalyzována. Pro analýzu na průtokovém cytometru byl užit stejný postup jako u listů. Jelikož měla semena velmi nízkou klíčivost, přistoupilo se k analýzám samotných semen. Byla vždy použita celá semena a následován stejný postup jako pro cytometrii listů (Otto, 1990).

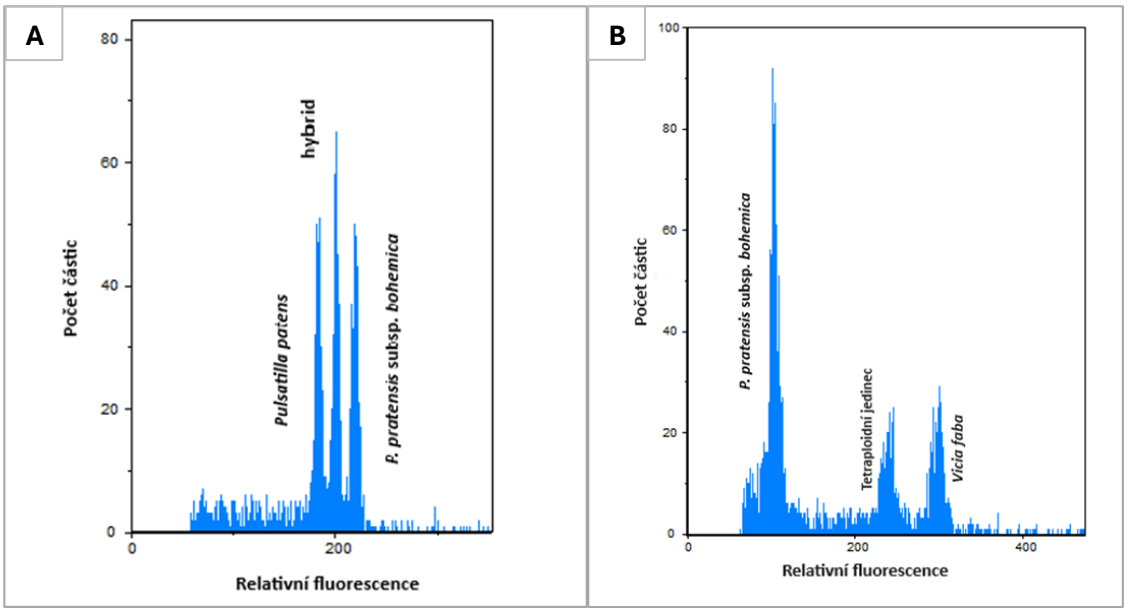
Obrázek 8- Klíčící semena sebraná z lokality Humnický vrch.

3.2. Průtoková cytometrie

Většina cytometrických analýz se uskutečnila v laboratoři průtokové cytometrie BÚ AVČR v Průhonicích.

Pro izolaci jader byla využita dvoustupňová metodika (Otto, 1990) a následován protokol podle Doležel et al., (2007). Měřil se vždy buď každý jedinec zvlášť, případně po dvojicích, tak aby byly v každém vzorku zastoupeny oba druhy. Z jednotlivých vzorků byla použita jen malá část, průměrně půl čtverečního centimetru listu. V případě, že pro vzorek vycházely špatné analýzy byl použit stonek. Za interní standart byla zvolena *Vicia faba* L. ´Inovec´ jelikož vůči její velikosti genomu 2C=26,9 pg (Doležel et al., 1992) se daly bezpečně rozlišit jak diploidní, tak tetraploidní druhy (viz. Obrázek 9).

Byla snaha držet variační koeficient neboli CV pod hranicí tří procent, jak je doporučováno v Doležel et al., (2007). Variační koeficient určuje přesnost měření a jedná se o podíl směrodatné odchylky ku střední pozici píku. Vyšší CV se akceptovalo v případě, že ani po opakované analýze vzorek nevyšel lépe a nebyla vhodná alternativa. Pro analýzu histogramů byl využit program Partec FloMax v2.4.



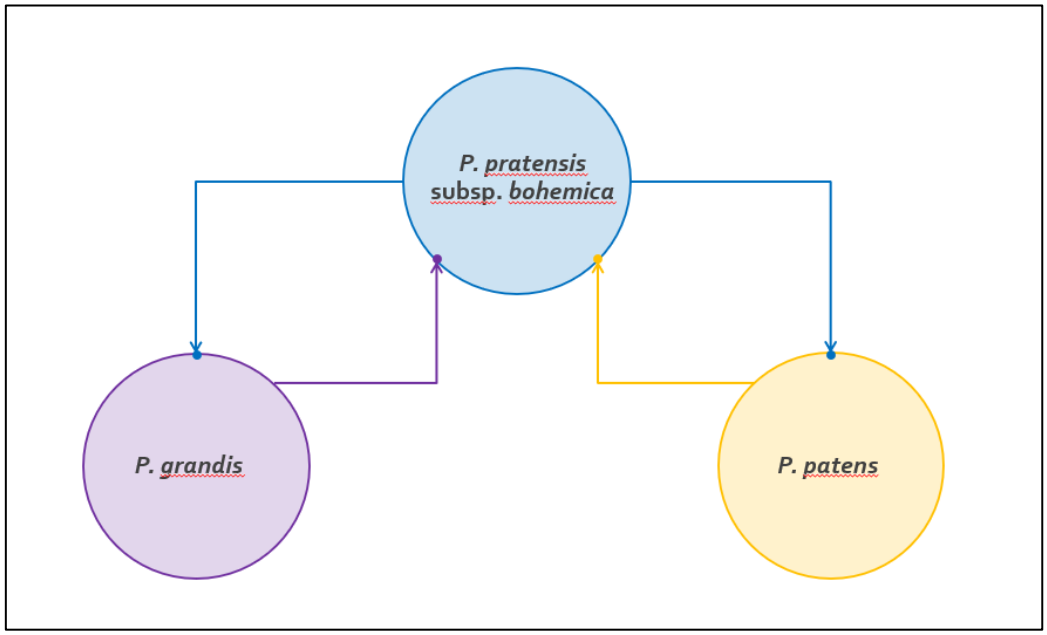
Obrázek 9 – Histogram A znázorňující relativní fluorescenci pro jednotlivé taxony s fluorescenčním barvivem DAPI. První pík odpovídá *P. patens*, druhý pík zobrazuje hybrida a třetí pík připadá *P. pratensis* subsp. *bohemica*.
Histogram B znázorňující *P. pratensis* subsp. *bohemica* (první pík) a tetraploidního jedince (druhý pík). Třetí pík odpovídá standardu, kterým byla, stejně jako pro všechny ostatní vzorky, *Vicia faba*.

3.3. Experimentální křížení

Všechny druhy konikleců na našem území patří mezi ohrožené druhy (Grulich, 2017), proto pro experimentální křížení nebylo možné využít přímo jedince z lokalit. Podařilo se získat kvetoucí jedince konikleců od „květinového hospodářství“ Planta naturalis. Bylo zakoupeno 30 jedinců *P. patens*, 30 jedinců *P. pratensis* subsp. *bohemica* a 10 jedinců *P. grandis*. Bohužel při vlně veder následující rok některé rostliny uschly, takže byly zakoupeny nové (20 *P. patens*, 10 *P. pratensis* subsp. *bohemica*). Ke všem jedincům jsou známy lokality, ze kterých byly ve formě semen původně odebrány, a to Hradčanské stěny pro *P. patens*, Bělá pod Bezdězem pro *P. pratensis* subsp. *bohemica* a Kamenný vrch v Brně pro *P. grandis*.

Rostliny byly rozděleny podle druhů a očíslovány. Na jaře se jednotlivé rostliny přenášely na slunce a teplo či do stínu a chladu tak, aby se co nejvíce synchronizovalo kvetení a pokus byl co nejúspěšnější. Pyl se z jednotlivých kvetoucích rostlin přenášel pomocí štětců na bliznu opačného druhu (viz. Obrázek 10). Pro každou kombinaci byla zvolena jiná velikost štětce. Štětce byly uchovávány separátně podle velikostí a pravidelně měněny, tak aby se co nejvíce zamezilo případné kontaminaci. Každá jednotlivá kombinace křížení se zaznamenala a květ se obalil monofylovým pytlíčkem, aby se zabránilo kontaminaci opylovači (viz. Obrázek 11). Naprostá většina rostlin kvetla dvěma a více květy, proto mohly sloužit jako donor a zároveň i akceptor pylu. Zároveň ale nikdy nebyl stejný květ použit pro opylení cizím pylem a zároveň po dozrání pylových prašníků jako dárce pylu. Pokud došlo k opylení receptivních blizen, takový květ byl označen zastřižením listenového útvaru pod květem a vše bylo

zaneseno do tabulky. Každá jednotlivá kombinace přenesení pylu se opakovala minimálně dvakrát, při dostatku pylu i vícekrát.



Obrázek 10 – Znázornění směrů experimentálního křížení. Modré šipky znázorňují směr přenosu pylu z *P. pratensis* subsp. *bohemica* na *P. patens* a *P. grandis*. Žlutá šipka zobrazuje směr přenosu pylu z *P. patens* na *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Fialová šipka znázorňuje směr přenosu pylu z *P. grandis* na *P. pratensis* subsp. *bohemica.*

Rostliny byly monofylovými pytlíčky obaleny do té doby, dokud se nezačaly prodlužovat blizny a usychat okvětní lístky v reakci na ukončení fertilní fáze. U konikleců se při tvorbě semen začíná stonek prodlužovat (v případě *P. pratensis* subsp. *bohemica* i narovnávat), a proto se jevilo jako kontraproduktivní ponechávat rostliny obalené.

Obrázek 11 – Rostliny z experimentálního křížení zabalené v monofylových pytlíčcích

V případě, že rostliny vytvořily semena byly připraveny a nadepsány papírové pytlíčky, do kterých se zralé nažky sbíraly. Zralá semena byla určena tak, že se uvolňovala již pod jemným tlakem ruky. V papírových sáčcích se semena uchovávala v lednici pro další analýzy.

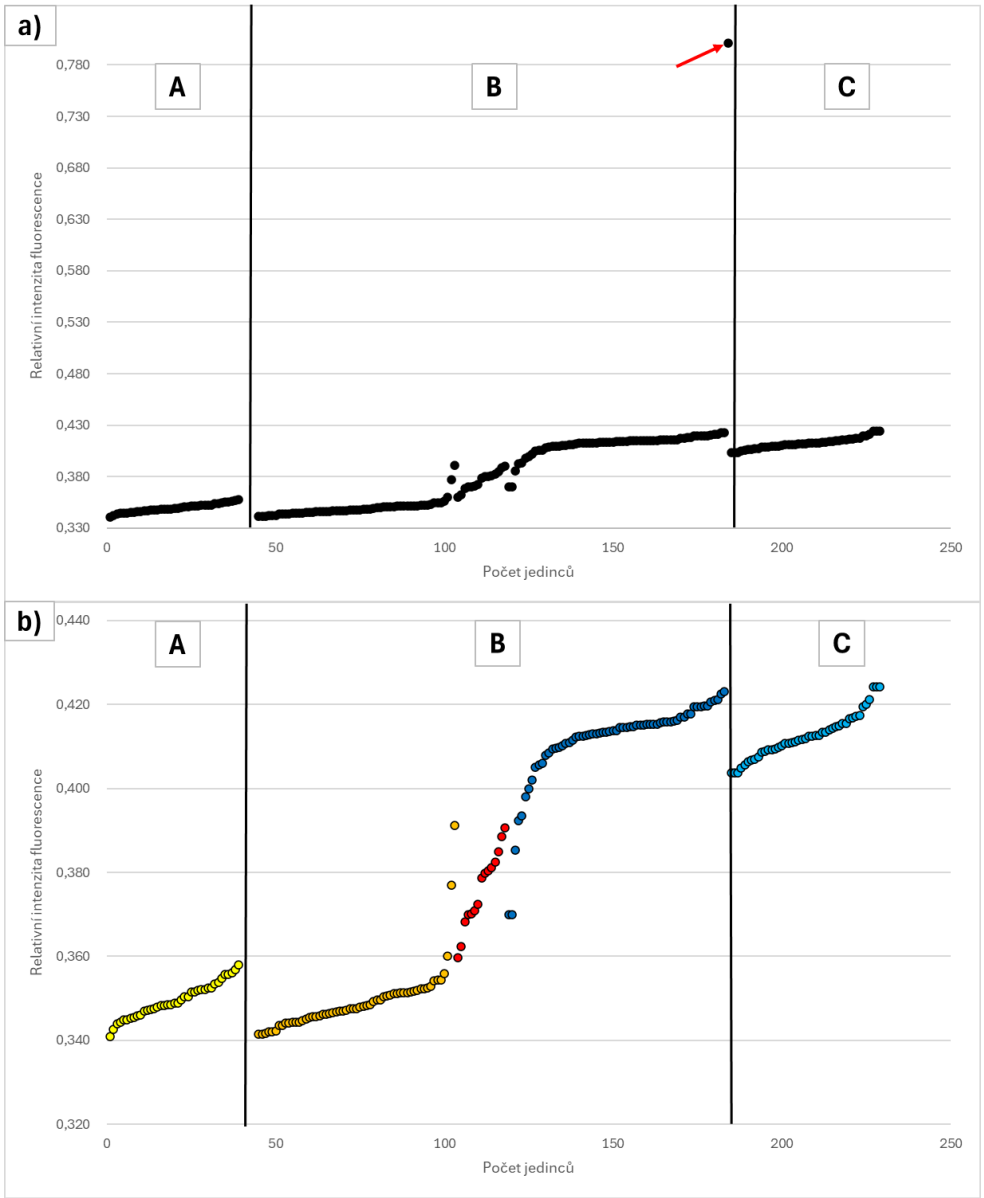
Sebraná semena z experimentálních pokusů byla prohlédnuta a rozdělena na prázdná (na pohled sterilní) a plná (na pohled fertilní). Následně byl spočítán, případně při velkém množství semen odhadnut, počet náležející do jednotlivých kategorií. Semena vždy nesou označení podle mateřské rostliny a v závorkách záznam o původci pylu. Dále následoval klíčící pokus, který probíhal za stejných podmínek jako pro semena z lokality. I u semen z pokusu se ukázala velmi nízká klíčivost, a proto bylo i zde přistoupeno k analýzám semen, přičemž byl následován stejným postup jako pro semena sebraná v subpopulacích.

Obrázek 12 – Porovnání vzhledu plných a prázdných semen. Vlevo dvě plná (na pohled fertilní), vpravo prázdná (na pohled sterilní)

4. Výsledky

4.1. Hybridizace in-situ

Celkem bylo ze sběru z lokality Humnický vrch v roce 2023 analyzováno 140 rostlin. Sběry referenčních populací proběhly v roce 2024. Z lokalit *P. pratensis* subsp. *bohemica* v Českém krasu bylo analyzováno 45 vzorků. Z populace *P. patens* v Doupovských horách se analýza uskutečnila na 39 vzorcích (viz. Obrázek 13).

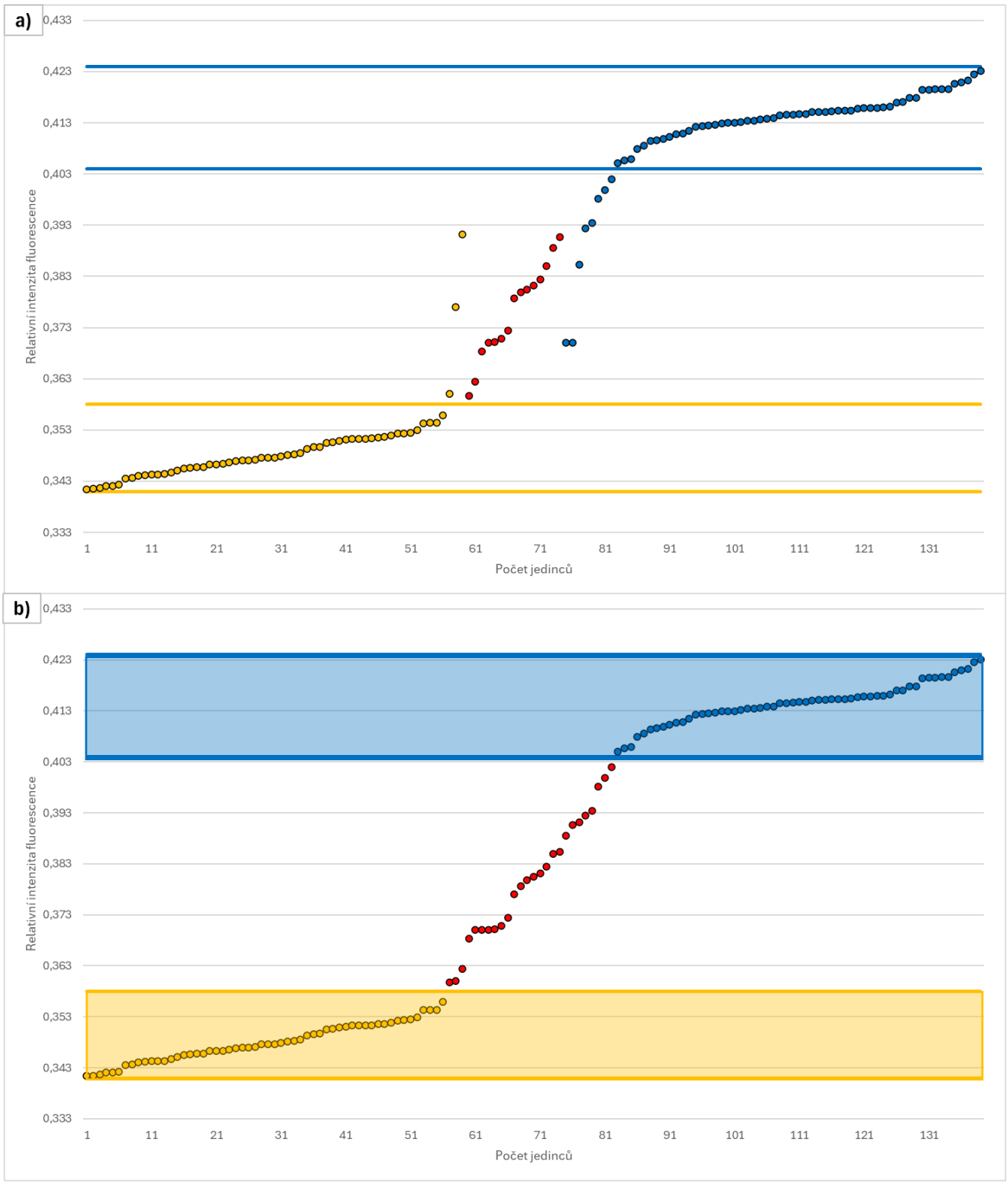


Obrázek 13 – Bodový graf a) znázorňuje čistou populaci *P. patens* (sektor A), čistou populaci *P. pratensis* subsp. *bohemica* (sektor C) a jedince ze smíšené populace z Humnického vrchu (sektor B). Červená šipka označuje tetraploidního jedince nalezeného na lokalitě Humnický vrch.
Bodový graf b) znázorňuje stejné vzorky jako graf a), tentokrát bez tetraploida pro větší přehlednost. Jednotlivé vzorky jsou barevně odlišeny podle populací a morfologického určení – čistá populace *P. patens* (sektor A-světle žlutě), čistá populace *P. pratensis* subsp. *bohemica* (sektor C-světle modře) a jedinci ze smíšené populace z Humnického vrchu (sektor B-*P. patens* tmavě žlutě, hybridi červeně, *P. pratensis* subsp. *bohemica*-tmavě modře).

Ze smíšené lokality na Humnickém vrchu bylo analyzováno 59 vzorků *P. patens*, 66 vzorků *P. pratensis* subsp. *bohemica* a 15 jedinců předběžně podle morfologie určených jako hybridi. Průtoková cytometrie odhalila dvě hlavní hladiny relativní intenzity fluorescence a jednu přechodnou. Nižší hladina odpovídá *P. patens*, vyšší pak *P. pratensis* subsp. *bohemica*.

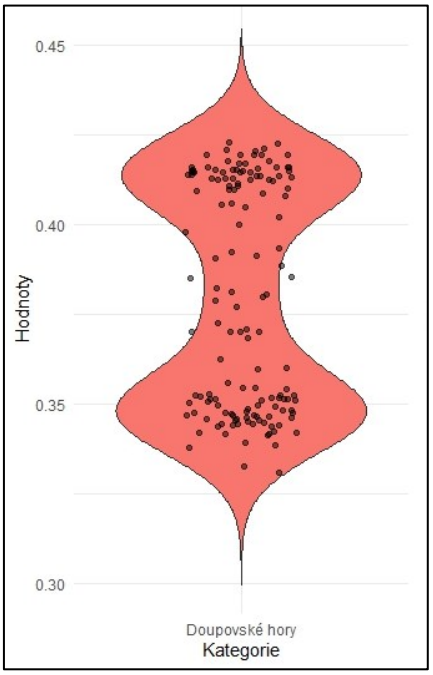
Po vyhodnocení analýz se ukázalo, že určení podle morfologie nebude dostačující. Několik vzorků určených jako rodičovské druhy evidentně svou hladinou relativní intenzity fluorescence spadlo do intermediární hladiny. Proto byly do grafu promítnuty minimální a maximální hodnoty z čistých populací (viz. Obrázek 14a).

Na základě porovnání vyhodnocených analýz a hodnot z referenčních populací spadla u tří jedinců určených dle morfologie jako *P. patens* jejich hladiny relativní intenzity fluorescence do intermediární. Pro *P. pratensis* subsp. *bohemica* se jednalo dokonce o 8 jedinců. Rozpětí hodnot čistých populací bylo určeno jako kritérium pro rozlišování hybridních jedinců. Po uplatnění tohoto měřítka se do hybridního taxonu zařadilo celkem 26 vzorků (viz. Obrázek 14b). Nakonec takto definovaní hybridi tvořili 18,5 % z celkového počtu analyzovaných jedinců ze smíšené populace.



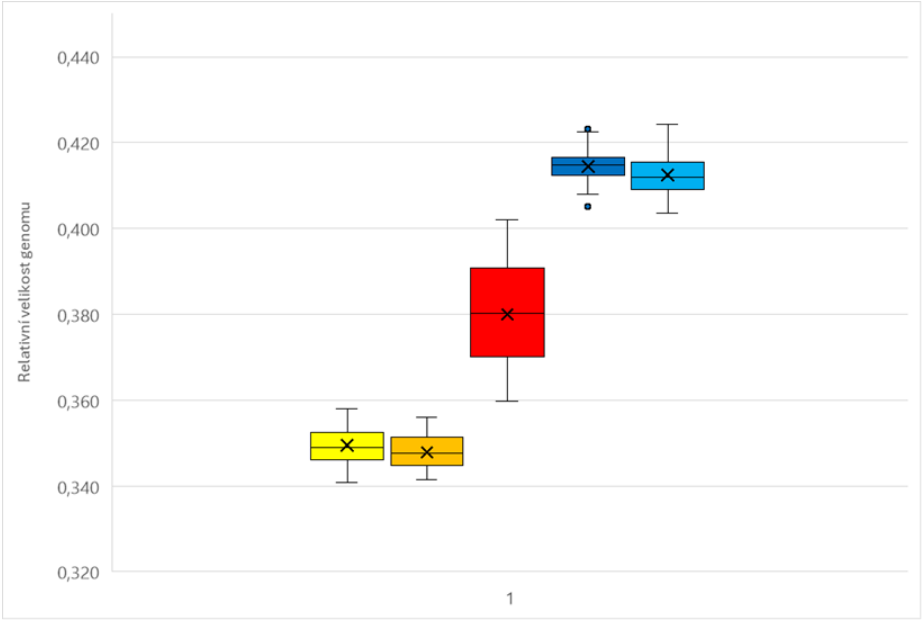
Obrázek 14 – Bodový graf a) znázorňující jedince morfologicky určené a rozdělené do tří kategorií (žlutá *P. patens*, červená hybridi, modrá *P. pratensis* subsp. *bohemica*), kterými jsou proloženy minimální a maximální hodnoty čistých populací (žlutá *P. patens*, modrá *P. pratensis* subsp. *bohemica*).
Bodový graf b) znázorňující jedince rozřazené do jednotlivých kategorií (žlutá *P. patens*, červená hybridi, modrá *P. pratensis* subsp. *bohemica*) s finálně určenými hybridními jedinci na základě rozpětí hodnot z čistých populací. Oblast hodnot čistých populací je podbarvena pro odpovídající taxon; žlutě *P. patens*, modře *P. pratensis* subsp. *bohemica*.

Z grafů vyplývá, že největší rozptyl hodnot má hybridní taxon (viz. Obrázek 15). Rodičovské druhy se dají dobře rozeznat a prostor mezi nimi vyplňují pravděpodobně hybridní jedinci.



Obrázek 15 – Body s nižší hodnotou odpovídají *P. patens*, s vyšší hodnotou *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Mezi nimi se nacházejí pravděpodobně hybridi.

Hodnoty medianu rodičovských druhů jsou 0,345 pro *P. patens* a 0,41 pro *P. pratensis* subsp. *bohemica*, s intermediární hodnotou 0,38 pro hybridní taxon (viz. Obrázek 16). Což podporuje myšlenku přechodných znaků u hybridů.

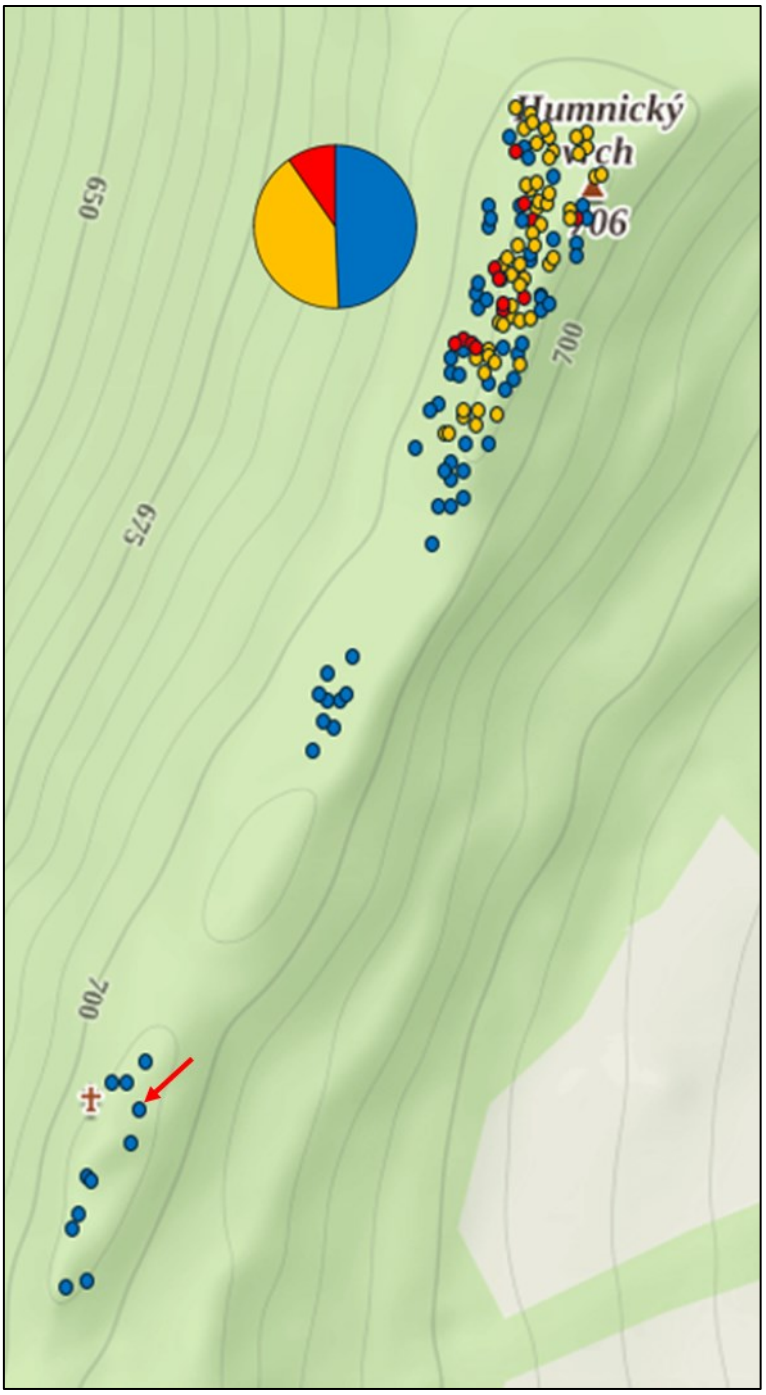


Obrázek 16 – Krabicové diagramy znázorňující rozpětí hodnot jednotlivých taxonů ze smíšené populace na Humnickém vrchu (tmavě žlutá – smíšená populace *P. patens*, červená – hybridi, tmavě modrá – smíšená populace *P. pratensis* subsp. *bohemica*). Pro srovnání jsou vloženy krabicové diagramy znázorňující hodnoty jedinců z čistých populací (světle žlutá-čistá populace *P. patens*, světle modrá – čistá populace *P. pratensis* subsp. *bohemica*)

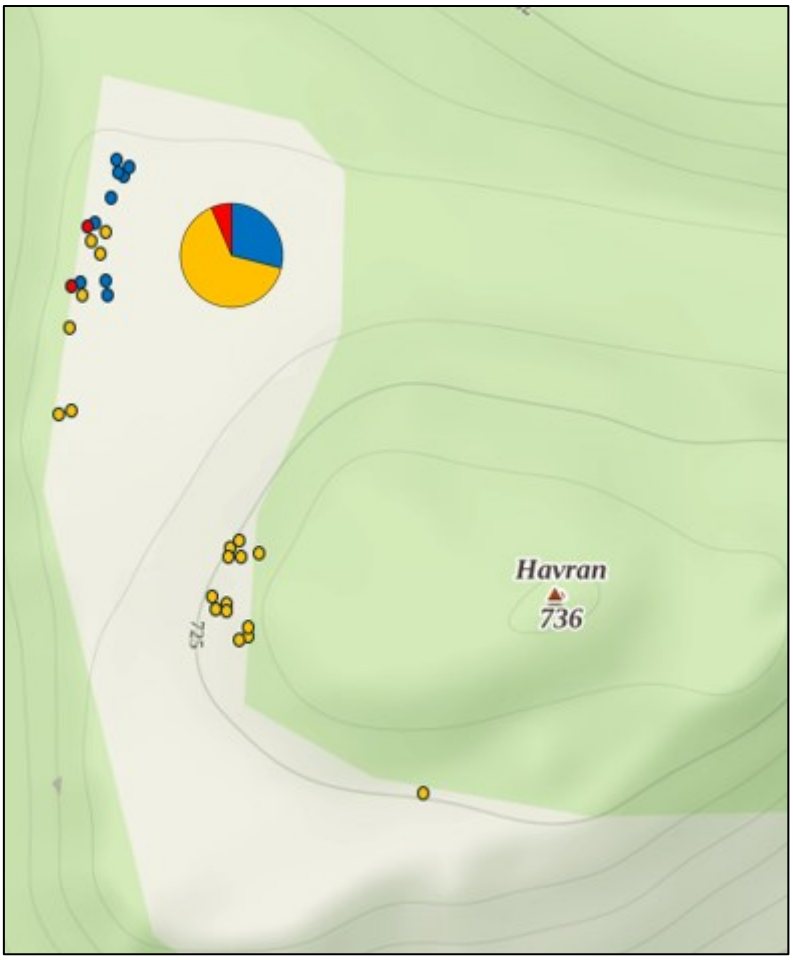
Potvrdilo se, že použití průtokové cytometrie pro rozlišení rodičovských druhů je dostačující. *Pulsatilla patens* má vždy nižší hodnoty, *P. pratensis* subsp. *bohemica* vždy vyšší. Naopak hybridi mezi nimi vytvářejí spíše kontinuum. Při simultánních analýzách lze jednotlivé taxony většinou velice dobře rozeznat (viz. Obrázek 9A).

Velkým překvapením byl objev tetraploidního jedince (viz. Obrázek 9B). Nacházel se poblíž odhalené čedičové skalky zhruba v polovině vzdálenosti mezi vrchem Havran a Humnickým vrchem. Svou velikostí relativní fluorescence (0,801) odpovídá dvojnásobné krajní hodnotě hybridního jedince (0,401). Byl nalezen na stejném místě a potvrzen pomocí průtokové cytometrie dva roky po sobě.

Při populačním sběru v roce 2023 byly u jednotlivých sebraných rostlin zaznamenávány GPS souřadnice. Na základě stanovení hybridů byli jednotlivé body obarveny a rozlišeny do tří kategorií. Z map je patrné, že kříženci nejsou distribuováni nahodile, ale odpovídají svým rozšířením místům, kde se setkávají rodičovské druhy. Dále byl do map doplněn výsečový graf zobrazující zastoupení jednotlivých taxonů na jednotlivých subpopulacích. Subpopulace na Humnickém vrchu je jednoznačně větší a převažují zde jedinci *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Zároveň zde bylo nalezeno 24 z 26 hybridů (viz. Obrázek 17). Naproti tomu v subpopulaci rostoucí na vrchu Havran se nachází více jedinců *P. patens*. Hybridi zde byli nalezeni pouze dva (viz. Obrázek 18)



Obrázek 17 – Obrázek mapy subpopulace na Humnickém vrchu se zobrazením jedinců na základě GPS souřadnic, které byly zaznamenávány při populačním sběru. Body jsou obarveny na základě rozlišení hybridů a rodičovských taxonů (žlutě *P. patens*, červeně hybridi, modře *P. pratensis* subsp. *bohemica*). Dále je zobrazen výsečový graf znázorňující zastoupení jednotlivých taxonů. Červenou šipkou je označená poloha tetraploidního jedince.



Obrázek 18 – Obrázek mapy subpopulace na vrchu Havran se zobrazením jedinců na základě GPS souřadnic, které byly zaznamenávány při populačním sběru. Body jsou obarveny na základě rozlišení hybridů a rodičovských taxonů (žlutě *P. patens*, červeně hybridi, modře *P. pratensis* subsp. *bohemica*). Dále je zobrazen výsečový graf znázorňující zastoupení jednotlivých taxonů.

4.1.1. Analýza semen

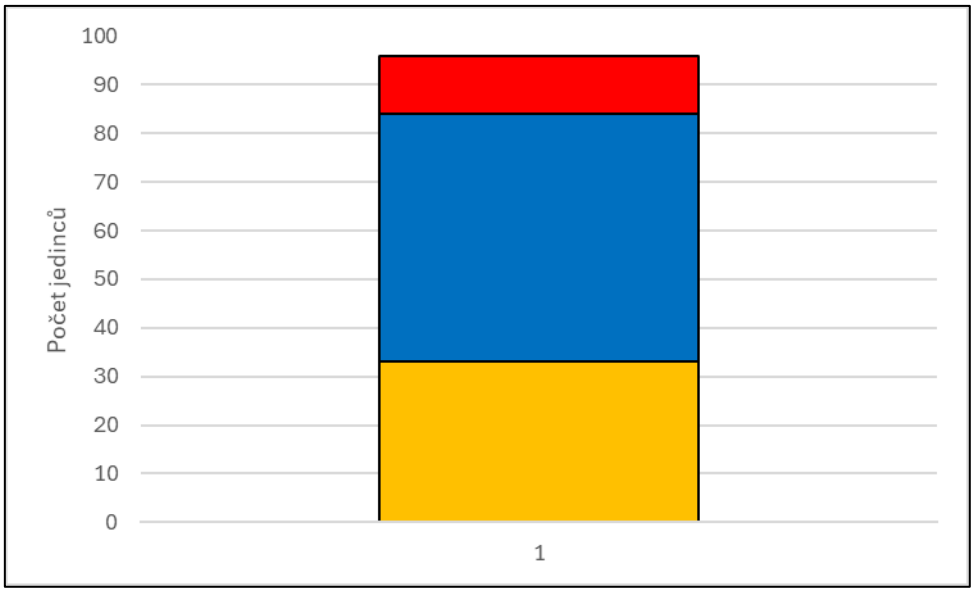
V rámci populačního sběru byla na lokalitě Humnický vrch u náhodných jedinců odebrána i semena vzniklá volným sprášením. Následně proběhlo několik výsevů a klíčících pokusů. Bylo vyseto 350 semen *P. pratensis* subsp. *bohemica* a 240 semen *P. patens*. Dále proběhl pokus vyklíčit 80 semen od hybridů, i když se semena na první pohled jevila jako sterilní. Semena měla překvapivě velice nízkou klíčivost. Navíc velká část semenáčků uschla ve stadiu prvních děložních lístků a nebylo je tak možné analyzovat. Nakonec bylo pomocí průtokové cytometrie analyzováno 41 prvních pravých lístků *P. pratensis* subsp. *bohemica*, z čehož 6 z nich svou hladinou relativní fluorescence spadlo do hybridního taxonu. Pocházeli od třech rozdílných mateřských rostlin. Hybridi tak tvořili 14,6 % z analyzovaného souboru semen *P. pratensis* subsp. *bohemica*.

Pro *P. patens* byla bilance klíčivosti ještě nižší. Vyklíčilo pouze 43 semenáčků, ale dvacet tři z nich uschlo ve stadiu děložních lístků. Z dvaceti zbylých zanalyzovaných všechny odpovídaly rodičovskému taxonu. Z vysetých semen od hybridních jedinců nevyklíčilo žádné.

Jelikož byla klíčivost celkově nízká, přistoupilo se přímo k analýzám semen pomocí průtokové cytometrie. Bylo náhodně zvoleno vždy šest jedinců od každého rodičovského druhu. Ukázalo se, že velká část semen je sterilních, i když se jeví jako plná, tedy fertilní. Navíc častokrát průtoková cytometrie odhalila pouze endosperm. U takových vzorků byla hodnota embrya dopočítána, aby se využilo co nejvíce dat. Opět se prokázala vyšší fertilita *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Z celkového počtu třiceti jedna analyzovaných semen bylo dvacet dva fertilních. Z toho se u 6 odhalil hybridní původ, což znamená 27,3 %.

Pro *P. patens* bylo provedeno 32 analýz z toho bylo devatenáct semen sterilních. Všech třináct úspěšně analyzovaných semen odpovídalo rodičovskému taxonu. Pro semena od hybridních jedinců analýzy provedeny nebyly, jelikož se jevila jako sterilní.

Celkově bylo analyzováno 124 semenáčků a semen sebraných od jedinců na lokalitě na Humnickém vrchu. Z toho dvacet osm z nich bylo sterilních, to znamená 96 úspěšných analýz. Pro rozlišení hybridních jedinců v semenech se použil stejný rozptyl hodnot jako u vzorků listů ze smíšené populace. Bylo odhaleno celkem 12 hybridních jedinců, vždy pouze v semenech sebraných od *P. pratensis* subsp. *bohemica* (viz. Obrázek 19*)*. Kříženci tak tvořili 12,5 % z celkového počtu 96 úspěšně analyzovaných semen rodičovských druhů. Konkrétně pro *P. pratensis* subsp. *bohemica* se jednalo o 19 %.



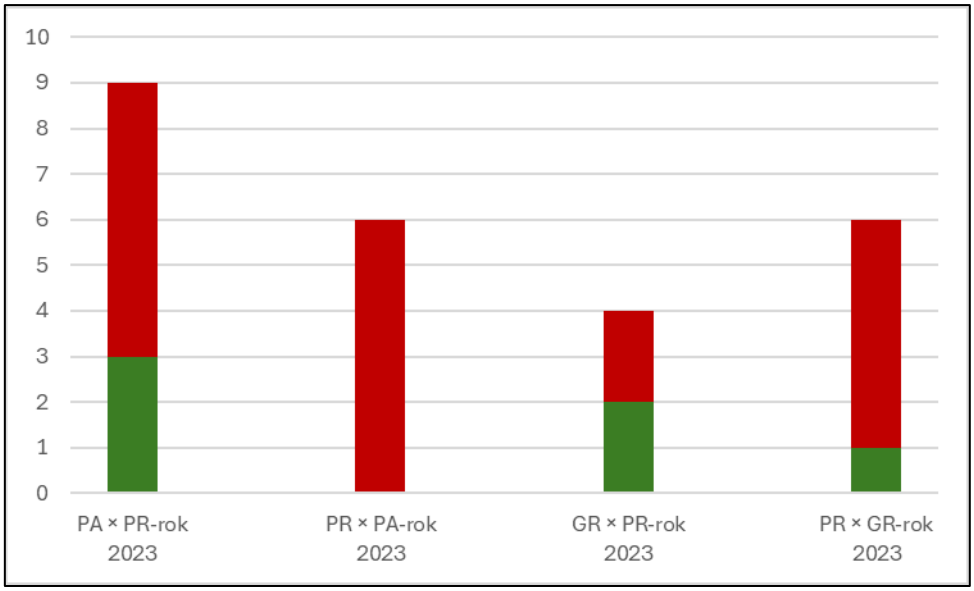
Obrázek 19 – Sloupcový graf znázorňující počty jedinců v jednotlivých taxonech zastoupených v semenáčcích a semen z lokality na Humnickém vrchu. Z celkového počtu 96 úspěšně analyzovaných jedinců bylo 33 *P. patens* (žlutá), 51 *P. pratensis* subsp. *bohemica* (modřá), a 12 hybridů (červená).

4.2. Hybridizace ex-situ

Experimentální křížení probíhalo tři roky po sobě. Bohužel z prvního roku 2022 nevzešla žádná semena, jelikož většina rostlin uschla během vlny veder. Následující rok byl pro křížení velice

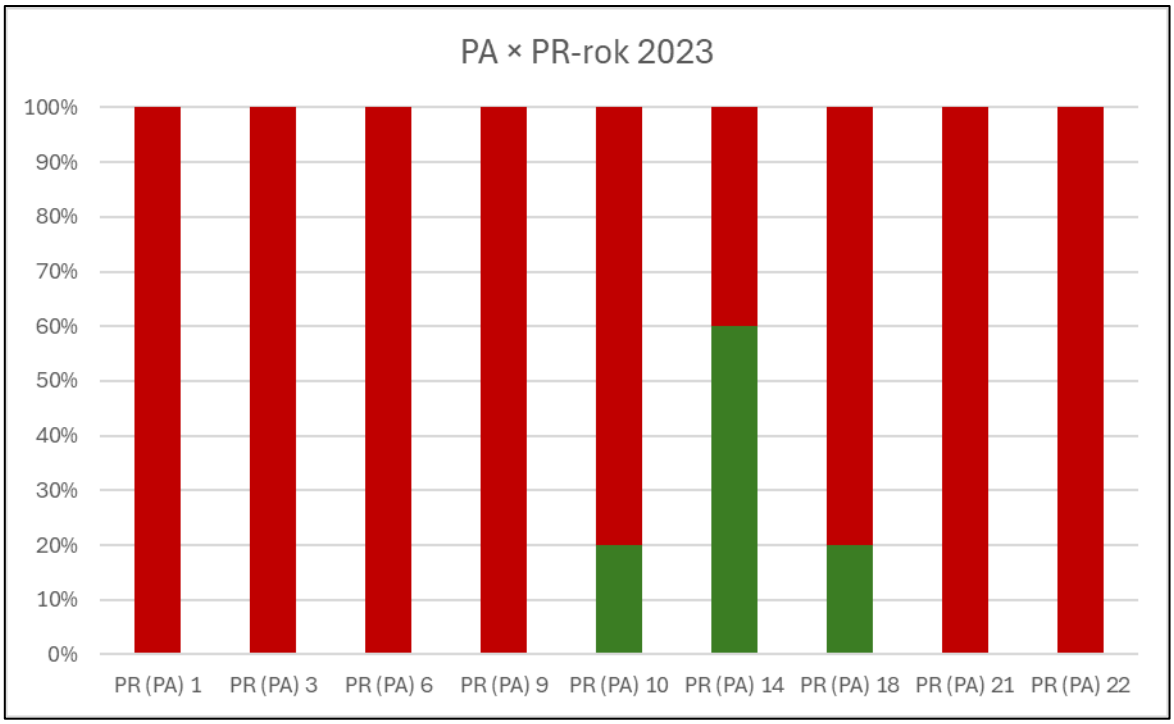
nepříznivý, jelikož kvetla jen část rostlin. Konkrétně pouze šest jedinců *P. patens*, 20 jedinců *P. pratensis* subsp. *bohemica* a 6 jedinců *P. grandis*.

V roce 2023 se uskutečnilo 9 křížení ve směru přenosu pylu z *P. patens* na *P. pratensis* subsp. *bohemica* a 6 křížení v opačném směru. Na heteroploidní úrovni proběhla 4 křížení kde donorem pylu byl *P. grandis* a 6 křížení s diploidním dárcem pyl *P. pratensis* subsp. *bohemica* (viz. Obrázek 20). Z recipročních křížení nebyla všechna úspěšná. Z kombinace devíti křížení *P. patens* x *P. pratensis* subsp. *bohemica* vytvořily částečně fertilní semena pouze 3 rostliny (PR (PA) 10, 14, 18). Zbytek rostlin vytvořil pouze sterilní semena, případně žádná (viz. Obrázek 21). Rostliny *P. patens*, na které byl přenesen cizí pyl nevytvořily semena vůbec. Křížení na heteroploidní úrovni bylo úspěšnější ve směru přenosu pylu z tetraploida (*P. grandis*) na diploida (*P. pratensis* subsp. *bohemica*), jelikož dvě mateřské rostliny vytvořily semena, i když jen pouhá část se jevila jako fertilní (viz. Obrázek 22). V opačném směru pouze jedna rostlina (GR7) vytvořila pár zdánlivě fertilních semen (viz. Obrázek 23).



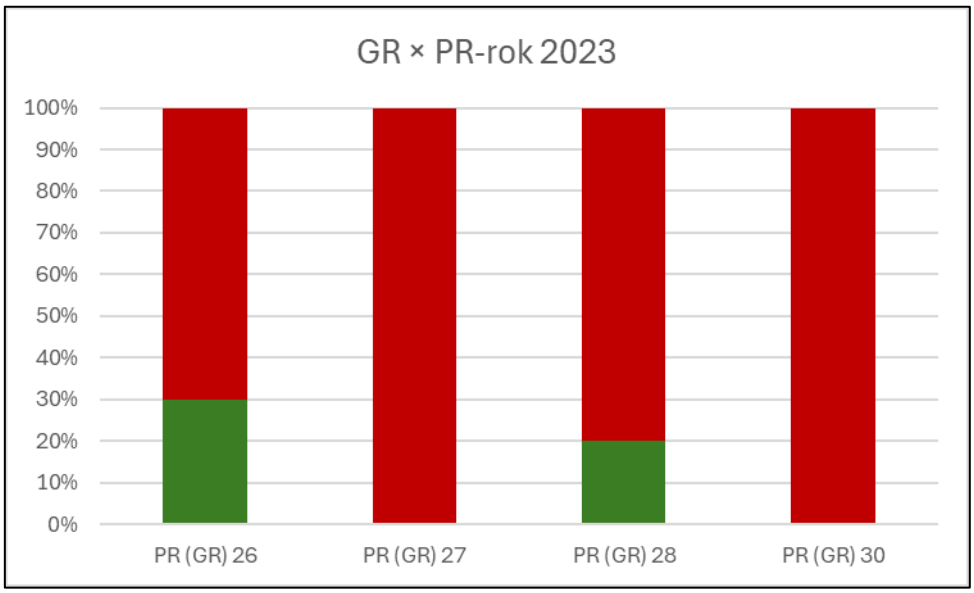
Obrázek 20 – Sloupcové grafy zobrazující počty jednotlivých recipročních křížení a jejich úspěšnost v roce 2023. Zelenou barvou jsou označeny rostliny, které vytvořily alespoň část fertilních semen, červeně jsou označeny rostliny, které nevytvořily žádná semena, případně pouze sterilní. PA je označení pro *P. patens*, PR pro *P. pratensis* subsp. *bohemica* a GR pro *P. grandis*. Vždy první uvedená zkratka označuje dárce pylu, druhá uvedená zkratka označuje mateřské rostliny.

Semen celkově nevzniklo mnoho, proto byla vyseta všechna, která alespoň částečně vypadala fertilní. Od mateřských rostlin *P. pratensis* subsp. *bohemica* z křížení s *P. patens* se vyselo 80 semen. Jelikož mateřské rostliny *P. patens* nevytvořily žádná semena, nemohlo být nic vyseto.

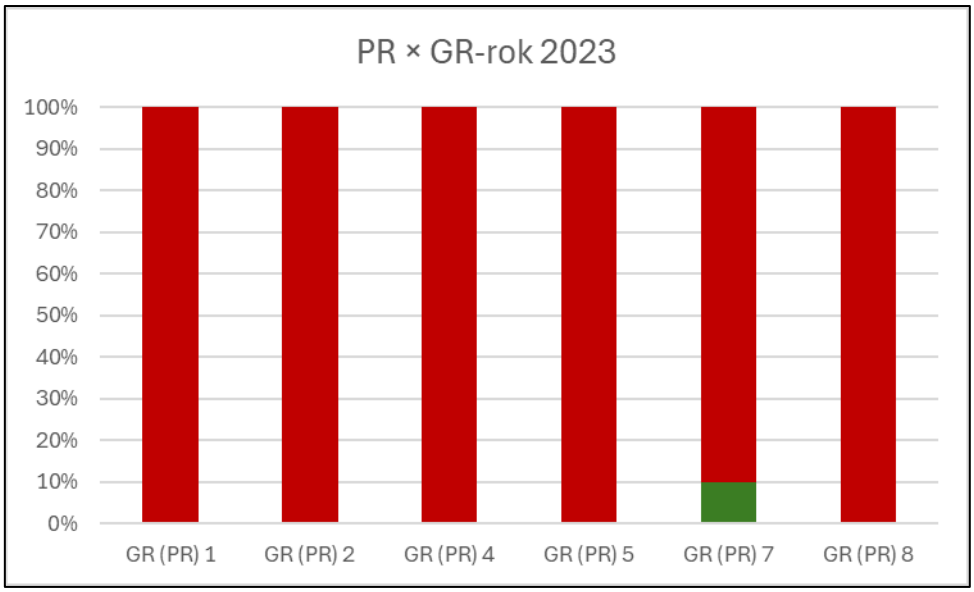


Obrázek 21 – Sloupcové grafy znázorňující procentuální zastoupení plných (zdánlivě fertilních-zeleně) a prázdných (sterilních-červeně) semen mateřských rostlin *P. pratensis* subsp. *bohemica* z křížení s *P. patens*.

Z heteroploidního křížení *P. pratensis* subsp. *bohemica* s *P. grandis* bylo vyseto čtyřicet semen, po dvaceti od každé mateřské rostliny. Nakonec bylo vysazeno 15 semen sebraných z tetraploidní *P. grandis*.

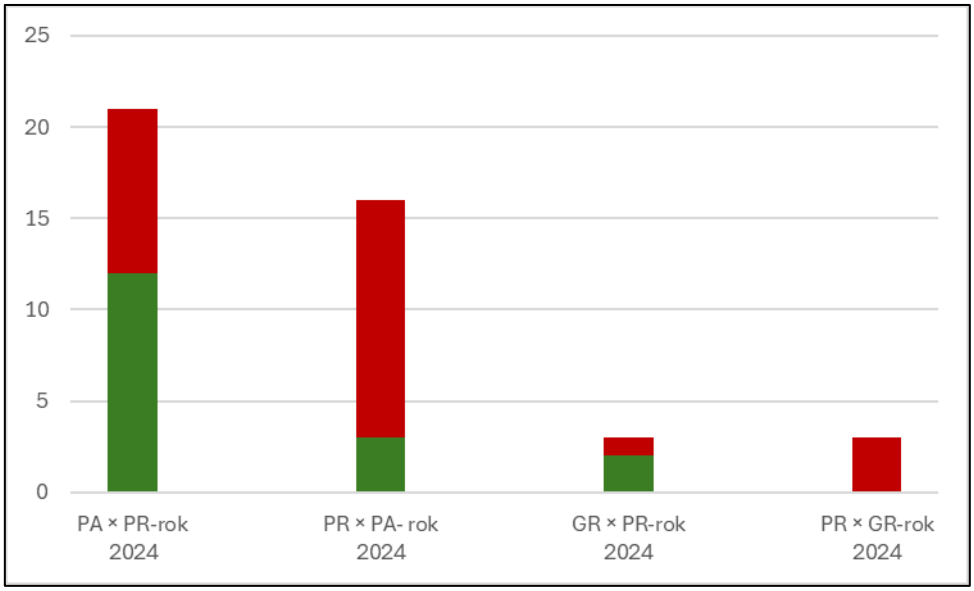


Obrázek 22 – Sloupcové grafy znázorňující procentuální zastoupení plných (zdánlivě fertilních-zeleně) a prázdných (sterilních-červeně) semen mateřských rostlin *P. pratensis* subsp. *bohemica* z křížení s *P. grandis*.



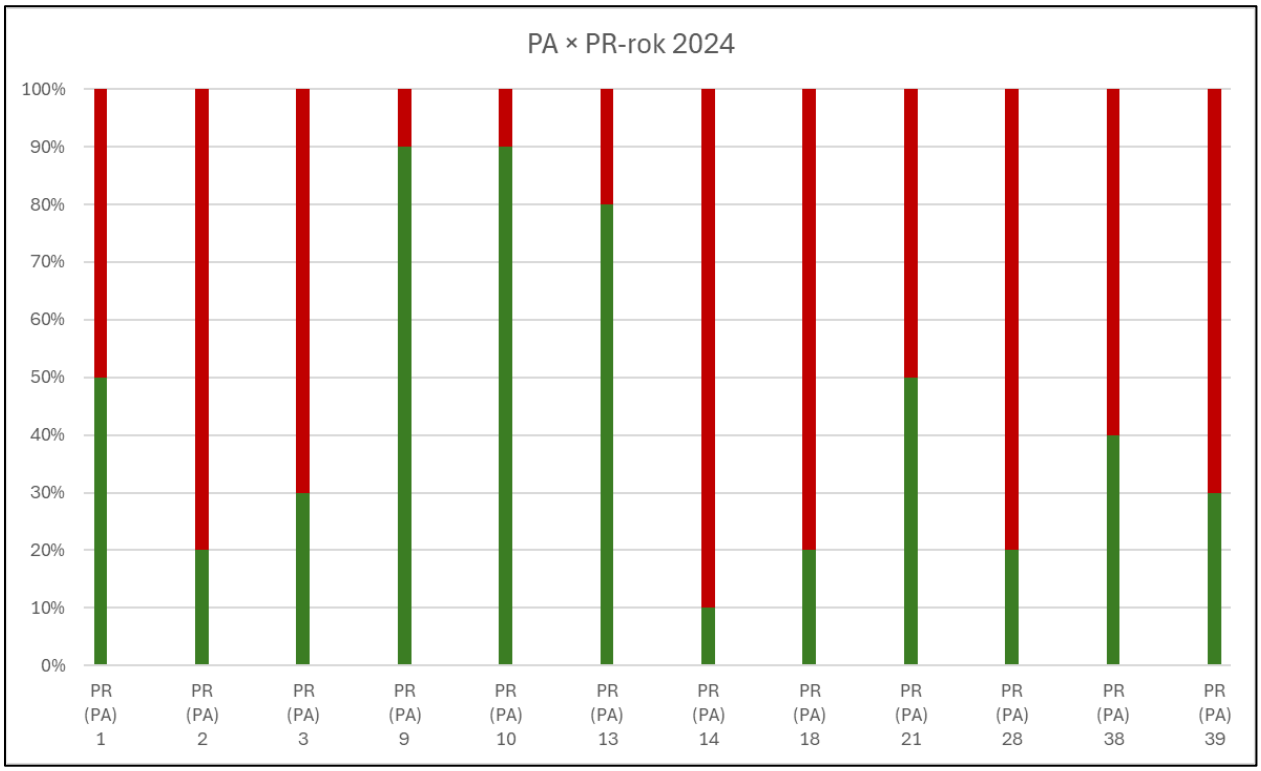
Obrázek 23– Sloupcové grafy znázorňující procentuální zastoupení plných (zdánlivě fertilních-zeleně) a prázdných (sterilních-červeně) semen mateřských rostlin *P. grandis* z křížení s *P. pratensis* subsp. *bohemica*.

Rok 2024 byl pro experimentální křížení příznivější, jelikož přežilo a kvetlo mnohonásobně více rostlin *P. patens*. Díky tomu se mohlo uskutečnit 21 křížení s donorem pylu *P. patens* a 16 křížení v opačném směru. Bohužel pro *P. grandis* to byl velmi špatný rok. Z šesti zbývajících rostlin přežily a kvetly pouhé 3 rostliny. Proto se křížení na heteroploidní úrovni mohlo uskutečnit pouze velice málo, a to konkrétně po třech kříženích v obou kombinacích (viz Obrázek 24).



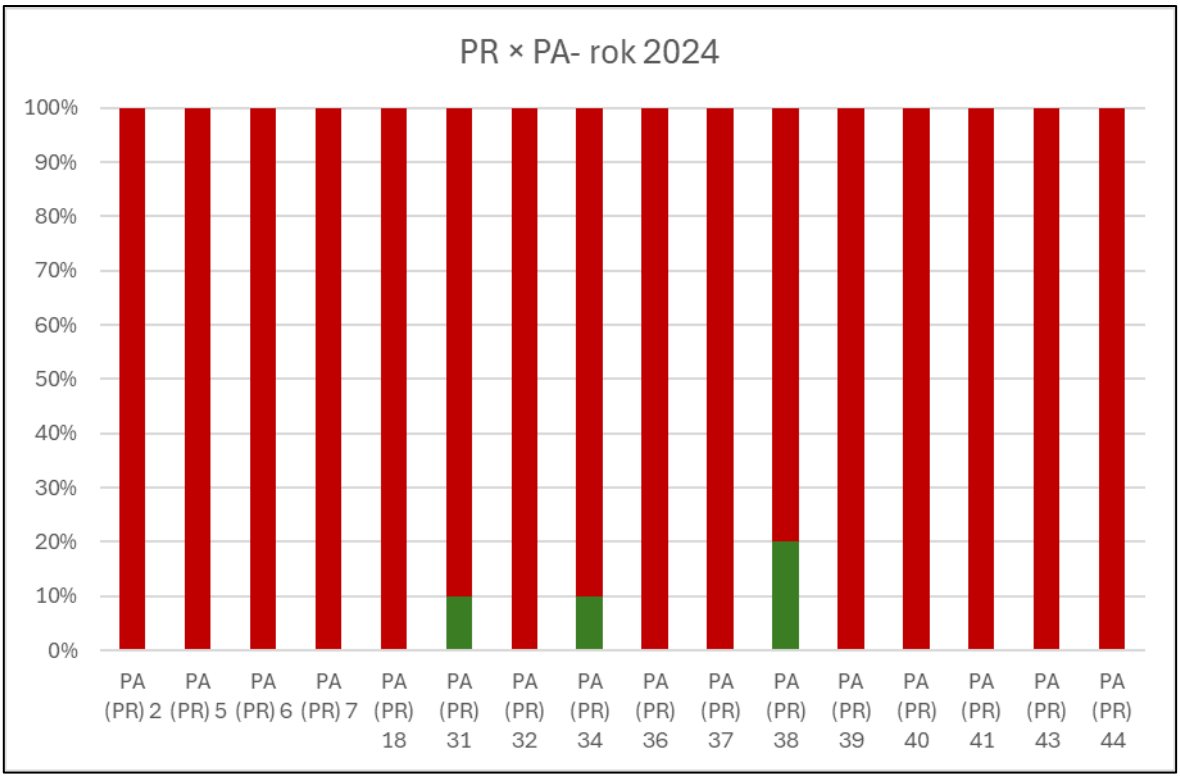
Obrázek 24- Sloupcové grafy zobrazující počty jednotlivých recipročních křížení a jejich úspěšnost v roce 2024. Zelenou barvou jsou označeny rostliny, které vytvořily alespoň část fertilních semen, červeně jsou označeny rostliny, které nevytvořily žádná semena, případně pouze sterilní. PA je označení pro *P. patens*, PR pro *P. pratensis* subsp. *bohemica* a GR pro *P. grandis*. Vždy první uvedená zkratka označuje dárce pylu, druhá uvedená zkratka označuje mateřské rostliny.

Z 21 rostlin *P. pratensis* subsp. *bohemica* vytvořilo zdánlivě fertilní semena 12 rostlin, 5 pouze sterilní a 3 žádná. Rostliny s označením PR (PA) 9 a 10 vytvořily semena druhý rok po sobě a byl u nich pozorován výrazný nárůst v počtu plných semen (viz Obrázek 25).



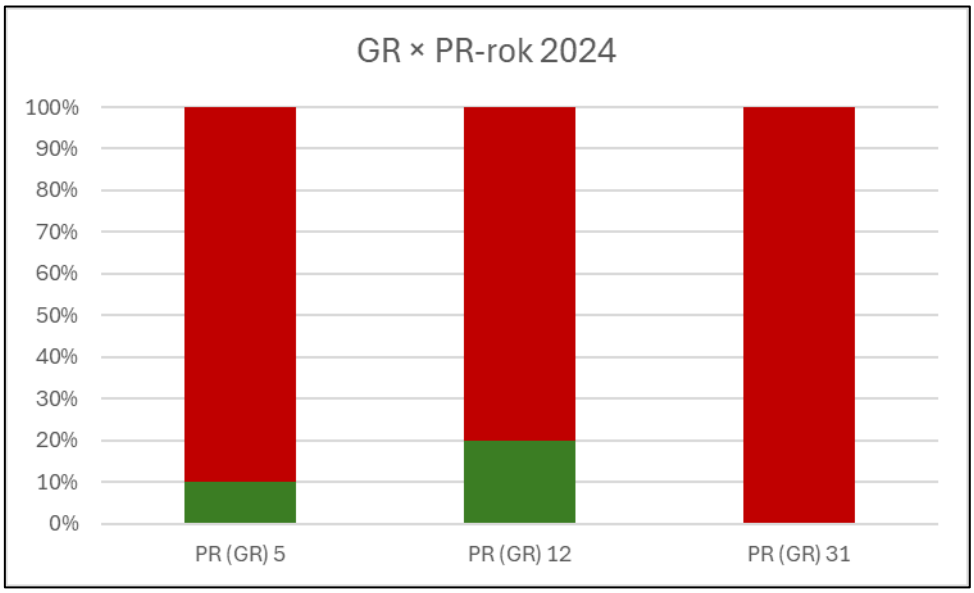
Obrázek 25- Sloupcové grafy zobrazující procentuální zastoupení plných (zdánlivě fertilních-zeleně) a prázdných (sterilních-červeně) semen 12 mateřských rostlin *P. pratensis* subsp. *bohemica* z křížení s *P. patens*. Zbylých 9 rostlin vytvořilo pouze sterilní či žádná semena a nejsou zde zobrazeny.

Kombinace, kde mateřskou rostlinou byla *P. patens*, byla mnohem méně úspěšná, jelikož alespoň částečně fertilní semena vytvořily pouze 3 rostliny (PA (PR) 31,34,38), zbylých 9 jen sterilní (viz. Obrázek 26).



Obrázek 26 – Sloupcové grafy zobrazující procentuální zastoupení plných (zdánlivě fertilních-zeleně) a prázdných (sterilních-červeně) semen mateřských rostlin *P. patens* z křížení s *P. pratensis* subsp. *bohemica*.

V případě křížení s přenosem pylu z *P. grandis* na *P. pratensis* subsp. *bohemica* 2 rostliny vytvořily semena (5, 12), ale naprostá většina byla sterilních (viz. Obrázek 27). V kombinaci, kde byly mateřské rostliny tetraploidní, nevznikla semena žádná.



Obrázek 27- Sloupcové grafy zobrazující procentuální zastoupení plných (zdánlivě fertilních-zeleně) a prázdných (sterilních-červeně) semen mateřských rostlin *P. pratensis* subsp. *bohemica* z křížení s *P. grandis*.

4.2.1. Analýza semen z experimentálních křížení

Z osmdesáti semen vysetých v roce 2023 od mateřských rostlin *P. pratensis* subsp. *bohemica* vyrostlo 14 semenáčků. Po provedení průtokové cytometrie vyšlo najevo, že odpovídají velikostí genomu rodičovskému druhu. Z kombinace *P. pratensis* subsp. *bohemica* × *P. grandis* nevyklíčila žádná semena.

Rok 2024 byl úspěšnější jak pro křížení, tak pro tvorbu semen. Byla zasazena semena sebraná z 12 mateřských rostlin *P. pratensis* subsp. *bohemica*, celkem 405. Naprostá většina semen ale byla zřejmě i tak málo životaschopných, jelikož nakonec vyklíčilo pouze 31 z nich. Z nich se podařilo u všech sebrat a zanalyzovat první pravé lístky pomocí průtokové cytometrie, přičemž u jedenácti z nich velikost genomu odpovídala hybridnímu taxonu. Největší počet hybridů vzniklo ze semen rostliny označené PR (PA) 39, jelikož z padesáti vysetých semen jich vyklíčilo devatenáct, a z toho 8 z nich mělo hybridní velikost genomu. Dále z osmi semenáčků od mateřské rostliny PR (PA) 1, odpovídaly 2 hybridnímu taxonu a 1 ze čtyř semen rostliny PR (PA) 3.

Dále bylo vyseto 30 semen *P. patens*, po deseti od každé mateřské rostliny PA (PR) 31, PA (PR) 34 a PA (PR) 38. Bohužel nevyklíčilo žádné z nich. Z kombinace, kde donorem pylu byly rostliny *P. grandis* bylo vyseto pouze 25 semen, zbytek se na první pohled jevil jako sterilní. Ani z jednoho z nich nevzešly semenáčky.

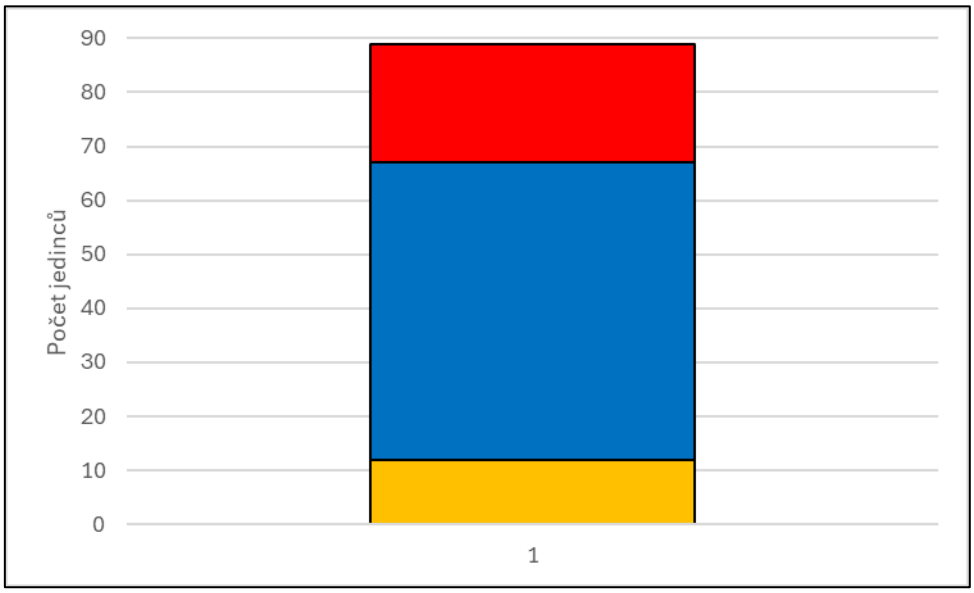
Analýza semen pomocí průtokové cytometrie byla vyzkoušena i na několika semenech vzniklých z experimentálního křížení. Bylo vybráno zbývajících devět mateřských rostlin *P. pratensis* subsp. *bohemica* křížených s *P. patens*, u kterých nevyklíčila žádná semena. Od každé rostliny bylo náhodně zvoleno pět semen. Ze 45 analýz se podařilo prokázat embryo i endosperm u dvanácti. Endosperm se podařilo změřit u dvaceti semen a bylo přistoupeno k dopočítání embrya. Z tohoto počtu třiceti dvou semen se 11 zařadilo pod hybridní taxon. Třináct semen bylo sterilních.

Z analýz vyplývá, že 10 z dvanácti mateřských rostlin *P. pratensis* subsp. *bohemica*, které vytvořily semena, vytvořily zároveň i hybridní semena. Nejvíce kříženců bylo nalezeno v semenech rostliny s označením PR (PA) 38, a to 8, což tvoří polovinu jejích analyzovaných semen. Zároveň je patrné, že i když rostliny vytvoří vysoké procento zdánlivě fertilních semen, neznamená to, že budou skutečně životaschopná. Například z rostlin označených PR (PA) 9 a 10 bylo sebráno a zasazeno velké množství semen, ale nakonec nevyklíčilo žádné. Naopak výše zmíněná rostlina PR (PA) 38 vytvořila relativně malé množství semen (zhruba 30 %), ale nakonec jich vyklíčilo 19, což je největší počet vyklíčených semen na jednu rostlinu.

Semen od mateřských rostlin *P. patens* vzniklo celkově výrazně méně, a tak byla snaha jich co nejvíce zasadit. Po prohlédnutí zbytku semen bylo vybráno dvanáct, po šesti od každé z rostlin označených PA (PR) 31 a PA (PR) 38. U všech se podařilo změřit pouze endosperm, takže se přistoupilo

k dopočítání embrya. Všechna semena odpovídala hladinou relativní fluorescence rodičovskému taxonu.

Hybridi byli opět vždy odhaleni pouze u mateřských rostlin *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Celkově se v semenech podařilo odhalit 22 hybridních jedinců, což představuje 28,6 % ze semenáčků a semen *P. pratensis* subsp. *bohemica* (viz. Obrázek 28). Kříženci tak tvořili 24,7 % z analyzovaných vzorků v obou letech (2023 a 2024) z experimentálního křížení.



Obrázek 28 – Počty jedinců v jednotlivých taxonech zastoupených v semenáčcích a semenech z experimentálního křížení v letech 2023 a 2024. Z celkového počtu analyzovaných jedinců bylo 12 *P. patens* (žlutá), 55 *P. pratensis* subsp. *bohemica* (modrá) a 22 hybridů (červená).

5. Diskuze

Jedním z hlavních cílů práce bylo zjištění stavu mezidruhové hybridizace *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica* na lokalitě v Doupovských horách. Proto byl uskutečněn populační sběr a analyzováno 140 jedinců ze smíšené populace. Ukázalo se, že určení na základě morfologie není jednoznačné, jelikož 11 vzorků původně označených jako rodičovské druhy, svou intenzitou relativní fluorescence připadlo pod hybridní taxon. Navíc kříženci tvoří mezi rodičovskými druhy relativní kontinuum. Bylo proto přistoupeno k porovnání s čistými populacemi, jejichž hodnoty byly proloženy výsledky ze smíšené lokality. Na základě tohoto kritéria bylo pod hybridní taxon zařazeno 26 jedinců, což je více než se očekávalo. Navíc v semenech sebraných na lokalitě bylo odhaleno 12 dalších kříženců, takže k mezidruhové hybridizaci stále aktivně dochází.

Druhým hlavním cílem bylo zjištění směru mezidruhové hybridizace pomocí experimentálního křížení. Tři roky po sobě bylo uskutečněno reciproční křížení mezi *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*, a zároveň mezi *P. grandis* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*, aby se prozkoumala možnost heteroploidní hybridizace. Podařilo se vyklíčit a zanalyzovat celkem 89 semen. Bylo odhaleno 22 hybridních jedinců, přičemž všichni byli z mateřských rostlin *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Mezidruhová hybridizace bude zřejmě silně jednostranná, a to ve směru přenosu pylu z *P. patens* na *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Zbytek zanalyzovaných semen odpovídalo rodičovským taxonům, což znamená, že druhy *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica* jsou schopny autogamie. Na heteroploidní úrovni vzniklo semen jen velice málo a žádná nevyklíčila. Mezidruhová hybridizace *P. pratensis* subsp. *bohemica* × *P. grandis* je proto velmi nepravděpodobná.

5.1. Mezidruhová hybridizace in-situ

Na subpopulacích Havran a Humnický vrch roste v současné chvíli zhruba ke dvou stovkám rostlin *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*, přičemž druhý jmenovaný výrazně převažuje. Z toho bylo sebráno a změřeno 140 rostlin. Jedinci byli na lokalitě podle morfologie rozděleni do tří kategorií; *P. patens*, *P. pratensis* subsp. *bohemica* a hybridi. Později se po vyhodnocení analýz ukázalo, že tři jedinci určení původně jako *P. patens* a osm jedinců *P. pratensis* subsp. *bohemica* se dle výsledků z průtokové cytometrie zařadili pod hybridní taxon. Naopak všichni jedinci předběžně určeni jako hybridi pak skutečně svou intenzitou relativní fluorescence odpovídali.

Kříženci se vyznačují přechodnou barvou a lehkým sklonem květu (Čelakovský, 1865; Skalický, 1988). Nicméně morfometrické analýzy ukázaly, že je pro rozlišení taxonů lepší využívat znaky na listech (Krejčová, 2014). Přesto i listy mohou vytvářet více forem a odlišení *P. pratensis* subsp. *bohemica* a hybrida není často jednoznačné (viz. Obrázek 29). Jelikož se jedná o velmi variabilní

rostliny (Čelakovský, 1865; Krejčová, 2014), je pro rozlišení taxonů potřeba využít alespoň kombinaci morfologie a průtokové cytometrie.

Obrázek 29 – Fotografie porovnání listů jedinců sebraných na lokalitě Humnický vrch. Dva jedinci vlevo jsou listy *P. patens*, dva listy uprostřed patří hybridům a dva listy vpravo jsou listy *P. pratensis* subsp. *bohemica*.

Z výsledných grafů (viz. Výsledky) analýz průtokové cytometrie je patrné, že hybridi vytvářejí mezi rodičovskými druhy kontinuum, což by mohlo poukazovat na zpětné křížení. Fertilitu hybridů zmiňuje už Uotila (1969) a Krejčová (2014) potvrdila až 60 % viabilitu pylu. Nicméně všechna semena sebraná z kříženců na lokalitě se jevila jako sterilní a žádná nevyklíčila. Přesto by hybridi mohli fungovat jako dárci pylu, a tím se zařadit do reprodukčního procesu.

Jedním z důležitých poznatků této práce je skutečnost, že zřejmě došlo k nárůstu počtu hybridů na lokalitě na Humnickém vrchu. Krejčová (2014) odhalila 14 kříženců, kdežto nyní jich bylo nalezeno dvacet šest. V obou případech byly využity obdobné postupy při sběru rostlin, a i metodika byla srovnatelná. Vyšší počet hybridních jedinců může být způsoben především rozdílem ve velikosti datasetu, jelikož tentokrát byl analyzován téměř dvojnásobek vzorků. Čemuž odpovídá i počet nalezených hybridů. Nicméně dva kříženci byli nalezeni v subpopulaci Havran, kde z předchozí studie žádný uveden nebyl.

Další faktor, který mohl ovlivnit vyšší počet kříženců oproti poslední studii je samotné stanovení kritéria pro rozlišení hybridního taxonu. V této práci bylo přistoupeno k definici hybridů na základě proložení hodnot z čistých populací výslednými analýzami ze smíšené populace. Limitací v tomto případě bylo nalezení a určení dostatečně velké čisté populace *P. patens*. Byla zvolena jedna z největších lokalit na Dubovém vrchu, kde vytváří několik subpopulací (Kubát 1997; Turoňová et al., 2012). Alternativou bylo sebrat jedince z jednotlivých izolovaných lokalit, kde se nachází většinou pouze několik málo rostlin, často sterilních (Turoňová et al., 2012).

Na dvou subpopulacích na Dubovém vrchu se zároveň nachází i *P. pratensis* subsp. *bohemica,* ale pouze v několika ojedinělých exemplářích. Přesto zde zatím nebyli potvrzeni hybridní jedinci. Z populačního sběru na Humnickém vrchu i z experimentálního křížení vychází jako mateřská rostlina *P. pratensis* subsp. *bohemica.* Proto k případnému vzniku hybridů může docházet jen velmi sporadicky, jelikož na lokalitě je pouze velice omezený počet potencionálních mateřských rostlin. Nicméně je možné, že při větším populačním sběru na těchto konkrétních subpopulacích by hybridní jedinci mohly být odhaleni. Avšak i „sampling" Krejčové (2014) byl přednostně zaměřen na hybridy.

Identifikace hybridů je často obtížná, a ne vždy se lze spolehnout na přechodnou morfologii. V současné době lze využít nejrůznější moderní přístupy. Nabízí se celá řada molekulárních markerů (Rieseberg & Ellstrand, 1993; Turchetto et al., 2015) či statistické metody (Kong & Kubatko 2021), případně kombinace obojího. Pro další případné studie hybridů *P. patens* × *P. pratensis* subsp. *bohemica* by bylo dobré využít molekulární metody pro prohloubení poznatků o mezidruhovém křížení.

Velkým překvapením bylo odhalení tetraploidního jedince na Humnickém vrchu. Nebyl hlášen zde ani na jiných lokalitách v České republice. Svou velikostí relativní fluorescence (0,801) odpovídá dvojnásobné krajní hodnotě hybridního jedince (0,401). Polyploidizace by pro jedince mohla znamenat několik výhod, např. snížení inbrední deprese či zvýšení heterozygotnosti (Comai 2005; Madlung 2013). Tetraploid s největší pravděpodobností mohl vzniknout přes triploidní blok (Ramsey & Schemske, 1998; Schinkel et al., 2017).

Pro analýzy semen vzniklých ze samovolného sprášení se ukázala limitující jejich velice nízká klíčivost. Konkrétně byla klíčivost 20,6 % pro *P. pratensis* subsp. *bohemica* a 17,9 % pro *P. patens*. Například z přírodních populací Křešín a Pání hora byla uvedena průměrná klíčivost 38 % (Bochenková et al., 2015). Pro *P. patens* se zřejmě jedná o obecnější trend, jelikož Żabicka et al., (2022) uvádí klíčivost z přírodních populací v Polsku 17 % a z několika litevských populací se prokázala viabilita semen mezi 2,1-53,8 % (Osvalde et al., 2022). Celkově nízká klíčivost semen by mohla souviset s vysokou mírou příbuzenského křížení. Studie ukazují, že hodnoty inbreedingu v přírodních populacích dosahují 0,9 napříč druhy (Szczecińska et al., 2016; Gargiulo et al., 2019; Chen & Pannell 2024).

5.2. Mezidruhová hybridizace ex-situ

Pro experimentální hybridizaci v rodě *Pulsatilla* se ukázalo několik limitujících faktorů. První komplikace nastala s obstaráním dostatečně starých kvetoucích jedinců, u kterých by byla známa původní lokalita. Jelikož se jedná o kriticky ohrožené druhy, nebylo možné jedince odebrat přímo z populací. Nakonec se podařilo rostliny zakoupit, čímž ale vyvstaly další problémy. Jedná se o velice sensitivní druhy, které není snadné pěstovat. Zároveň se ukázalo, že na kvetení a úspěšnost hybridizace bude mít velký vliv typ sezony, i když jde o rostliny v květináčích, jelikož byly umístěny na venkovním záhonu. Každá ze tří sezon, kdy probíhalo křížení, se lišila podmínkami počasí v jarních měsících.

Zároveň jsou tyto druhy dlouhověké, a proto nemusí vykvést každý rok, pokud sezona není přívětivá. Což ovšem velmi znesnadňuje pokus s experimentálním křížením.

Dále bylo potřeba jednotlivé druhy sjednotit ve fenologii. Nejdříve začíná kvést *P. patens*, takže tu bylo nutné zprvu udržovat více v chladu a temnu, aby se kvetení zpomalilo. Naopak *P. pratensis* subsp. *bohemica* byla umístěna na teplé a slunečné místo, aby se proces kvetení urychlil. Naprostou většinu rostlin se tak podařilo sjednotit, čímž bylo možné provést experimentální křížení v několika opakováních. Jedinci druhu *P. grandis* se od počátku chovali nestandartně, jelikož kvetli většinou pozdě, i když byli udržovány na teplém slunném místě. Přesazení do květníku pro ně zřejmě představovalo stresové podmínky, a přes veškerou snahu jich naprostá většina uhynula. Velice pravděpodobně to mohlo ovlivnit i neúspěchy v křížení.

Důležitým odhalením experimentálního křížení je skutečnost, že mezidruhová hybridizace P. patens × *P. pratensis* subsp. *bohemica* je pravděpodobně výrazně jednosměrná. Jak z křížících pokusů, tak z analýzy semen z lokality vyplývá, že mateřskou rostlinou je *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Ke stejnému výsledku došli i (Szczecińska et al., 2017) na základě porovnání chloroplastového genomu rodičovských druhů a jejich hybrida.

Po samotném křížení se ukázalo, že ani klíčení semen se neobejde bez komplikací. Semena konikleců mají obecně nižší klíčivost a vytvářejí jen velice krátkodobou semennou banku. Což se potvrdilo jak u semen z volného sprášení, tak z experimentálního křížení. Semena *P. patens* vzniklá z experimentálního křížení nevyklíčila žádná. Pro rostliny *P. patens* zřejmě přesazení a pěstování v květnících nepředstavovalo optimální podmínky a kvetly z počátku jen velice neochotně. Nicméně třetí rok se pravděpodobně již více přizpůsobily, jelikož počet kvetoucích jedinců vzrostl. Přesto semena tvořily jen velmi neochotně a naprostá většina z nich byla sterilních. Rostliny *P. pratensis* subsp. *bohemica* prokázaly celkově vyšší fitnes. Meziročně přežila a kvetla naprostá většina jedinců, a i zde byl pozorován vzrůstající trend. V posledním roce křížení většina rostlin z kombinace křížení s *P. patens* vytvořila semena, ale i tak byla velká část sterilních. Klíčivost v posledním roce křížení byla pouhých 7,7 %, nicméně to byl jediný druh, který z experimentálního křížení vytvořil alespoň částečně životaschopná semena. Semena *P. grandis* z experimentálního křížení nevyklíčila vůbec, ale zde mohl velkou roli hrát fakt, že rodičovské rostliny byly spíše slabé, což mohlo negativně ovlivnit i klíčivost semen.

Pro další případné studie by bylo potřeba vyladit podmínky klíčení semen. Zatím je metodika vypracována pro *P. alpina* subsp. *austriaca* (Zahradníková & Harčariková, 2010). Pro zvýšení úspěšnosti klíčení se ukázalo jako nezbytné vystavit semena chladné periodě, případně i dvěma. Po tomto „treatmentu“ byla uvedená průměrná klíčivost 62 % (Zahradníková & Harčariková, 2010). Je možné, že by chladná perioda pomohla zvýšit klíčivost i u *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*.

Zajímavé výsledky přinesla studie Zabicka et al. (2022), jelikož při klíčení na Petriho miskách měla semena *P. patens* klíčivost 73 %, ale v zahradní zemině pouze 17 %.

Při analýzách semen se ukázalo, že i ta která vypadají na první fertilní, mohou být ve skutečnosti sterilní. Některé studie uvádějí, že lze životaschopná semena dobře rozpoznat a určit na základě vzhledu (Hensen et al., 2005; Bochenková et al., 2012). Naopak Zielińska et al., (2021) ve své studii uvádějí podobný problém s mylně určenými semeny *P. vernalis*, u kterých se po provedení analýz ukázalo abortovné embryo. Může se jednat o důsledek kolísání přírodních podmínek a dostupnosti živin na lokalitě (Osvalde et al., 2022). Zároveň se v případě *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica* jedná o dlouhověké druhy, a tak může produkce fertilních semen meziročně velmi fluktuovat, jelikož rostliny více investují do kořenového systému (Vico et al., 2016). Dalším vysvětlením by mohla být obrana proti predátorům semen (Ghazoul & Satake 2009). Například pro *P. pratensis* subsp. *bohemica* jsou skutečně uvedeni hmyzí škůdci, kteří v některých rostlinách zničili více než 20 % semen (Skalická et al., 2013). Může se tedy jednat o adaptaci proti predaci semen.

Pro analýzu semen na průtokovém cytometru je zároveň problematické velice malé embryo čeledi Ranunculaceae oproti robustnímu endospermu (Mottier, 1895; Tamura, 1993). Což znamená, že pík endospermu je mnohonásobně vyšší a pík embrya tak lze při vyhodnocování analýz snadněji přehlédnout. Proto bylo přistoupeno k dopočítání analýz na základě konzistentního poměru mezi endospermem a standardem. Takto byly vyhodnoceny pouze vzorky, u kterých se prokazatelně objevil endosperm. Takové vyhodnocení může být zatíženo velkou nejistotou, ale byla snaha využít co nejvíce dat, aby tak měla větší výpovědní hodnotu.

Jedním z důležitých výsledků experimentálního křížení je zjištění schopnosti autogamie u *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Při analýzách semen z experimentálního křížení 78,4 % se svou hladinou relativní fluorescence shodovalo s rodičovskými druhy. Jelikož byly rostliny po celou dobu kvetení udržovány zabalené v pytlíčcích, je možnost cizosprášení velmi nepravděpodobná. U rodu *Pulsatilla* se všeobecně uvádí protogynie, která by měla zabraňovat samosprášení (Aichele & Schwegler, 1957; Tamura, 1993). Přesto byla prokázána schopnost samoopylení, i když pak rostliny tvoří méně semen (Lindell, 1998; Harčariková & Zahradníková, 2010; Chen & Pannel, 2024). Případně mohl hrát roli i efekt mentora, což je situace, kdy rostlina raději přijme svůj pyl než pyl cizího druhu(Richards 1997; Lynn et al. 2023). U těchto druhů nikdy mentor efekt nebyl zkoumán, ale případná studie by jistě mohla přinést zajímavé výsledky. U *P. grandis* žádná semena analyzována nebyla, jelikož byla snaha vysít všechna, která vypadala alespoň částečně fertilní. Přestože je i u tohoto druhu uvedena možnost samoopylení (Lindell, 1998) žádná semena nevyklíčila a rostliny celkově tvořily pouze velice málo semen.

5.3. Význam pro ochranu přírody

Všechny druhy koniklecův rostoucí v České republice jsou uvedeny v Červeném seznamu ohrožených druhů (Grulich, 2017). Zároveň dochází k poklesu populací napříč druhy i Evropou. Je proto potřeba věnovat velkou pozornost jejich studiu a snažit se zjistit důvody úbytku lokalit a odhalování rizik. Jedním z nich může být mezidruhové křížení, pokud se na jedné lokalitě vyskytuje více druhů. Koniklece mají jen slabě vyvinuté reprodukční bariéry, a proto se vzájemně ochotně kříží (Aichele & Schwegler, 1957; Lindel, 1998).

Jednou z kombinací druhů, u kterých byla prokázána hybridizace je *P. patens* × *P. pratensis* subsp. *bohemica* (Krejčová, 2014). Výsledky této práce křížení opět po deseti letech potvrdily. Navíc se ukázalo, že hybridizace probíhá aktivně dál, jelikož byla nalezena hybridní semena na *P. pratensis* subsp. *bohemica.*

Pro *P. patens* znamená hybridizace zejména nebezpečí demografického „swampingu“. Pro *P. patens* je typická spíše krátkodobá exprese pylu, oproti *P. pratensis*, u kterých dochází k otevírání zralých pylových váčků postupně (Jonsson et al., 1991). Znamená to, že jednotlivé květy produkují pyl pouze v řádu jednotek dní, což s nízkou denzitou opylovačů v brzkých jarních měsících omezuje možnost přenosu pylu. Pokud navíc část pylu vyčerpají na vznik hybridů, může to významně snížit úspěšnost opylení v rámci druhu.

Mezidruhové křížení představuje zřejmě vyšší riziko pro *P. pratensis* subsp. *bohemica*. Jedná se mateřskou rostlinu, takže při tvorbě semen investuje část zdrojů do tvorby hybridních semen. Navíc se ukázalo, že velká část semen zřejmě ve skutečnosti není fertilní. Zároveň z experimentálního křížení vyplývá, že hybridi mohou vzniknout relativně často. Jelikož z devíti analyzovaných rostlin bylo u sedmi z nich nalezeno v pěti náhodně vybraných semenech alespoň jedno hybridní.

Celkově se zdá, že rostliny trpí nízkou životaschopností. Prokázala se velmi nízká klíčivost semen, což samozřejmě omezuje vznik nových jedinců. Po tři roky opakovaných návštěv lokality na Humnickém vrchu nebyly pozorovány téměř žádné semenáčky *P. patens*. Pro *P. pratensis* subsp. *bohemica* je situace lepší, jelikož se na lokalitě vyskytují mladé rostlinky. V naprosté většině se ale populace skládá ze starých trsů. Pro udržení zdravé populace by bylo potřeba zaměřit management na vytváření vhodných podmínek pro klíčení a udržení semenáčků. Případně reintrodukovat mladé rostlinky, což ale vyžaduje pečlivý výběr mateřských rostlin a výsledek nemusí být vždy uspokojivý (Zahradníková & Harčariková, 2012; Zabicka et al., 2022).

Záchranný program pro *P. patens* vytvořený v rámci Agentury ochrany přírody a krajiny České republiky, se zabývá jak kultivací ex-situ, tak uchováním semen v Genové bance Výzkumného ústavu rostlinné výroby Praha Ruzyně. Prozatím jsou rostliny pěstovány v Zoologické a botanické zahradě města Plzně (BZ Plzeň) a ve Výzkumném ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné

zahradnictví (VÚKOZ) Průhonice. Jedná se o rostliny z lokality Líšnice u Prahy (Ondráček & Blažejová, 2020). V budoucnosti je plánováno pěstování *P. patens* ve více botanických zahradách tak, aby se v každé nacházely jedinci z jiné populace. Velice zajímavým způsobem uchování potřebné genetické variability by mohla být kryokonzervace. Zabicka et al. (2022) dokázaly z takto uchovaných vzorků vypěstovat a reintrodukovat jedince *P. patens*. Kryokonzervace by mohla být alternativou k uchovávání semen, která rychle ztrácí svou klíčivost, takže je zřejmě bude potřeba v genové bance pravidelně obměňovat.

Další snahy o záchranu ohrožených druhů konikleců by měly brát v úvahu možnost mezidruhového křížení. Jak se ukázalo, křížení mezi *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica* aktivně a relativně snadno probíhá. Což je potřeba brát v potaz při provádění managementových úprav. Vzhledem k jednosměrnosti křížení zřejmě bude postačovat odstraňovat semena *P. pratensis* subsp. *bohemica* v případě, že jsou pěstovány pospolu, například v rámci botanických zahrad. Je potřeba provádět další studie a výzkumy v rámci snahy o uchování a zlepšení stavů populací druhů z rodu *Pulsatilla* na našem území.

6. Závěr

Tato práce se zabývala fenoménem mezidruhové hybridizace v rámci rodu *Pulsatilla* se zvláštním zaměřením na procesy in-situ a ex-situ a jejich důsledky pro ochranu přírody.

Experimentální křížení se provádělo jak na homoploidní, tak heteroploidní úrovni. Heteroploidní hybridizace se ukázala jako neúspěšná. Pravděpodobně ke křížení mezi *P. pratensis* subsp. *bohemica* × *P. grandis* nedochází, a pokud ano, tak jen velice sporadicky. Naproti tomu homoploidní kombinace křížení *P. patens* × *P. pratensis* subsp. *bohemica* se prokázala jako úspěšná.

Hybridizace mezi *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica* se pomocí průtokové cytometrie potvrdila i na lokalitě Humnický vrch v Doupovských horách. Oproti studii provedené před deseti lety byli navíc hybridi nalezeni ve vyšším počtu. Znamená to, že se na lokalitě nejen udržují, ale zároveň jich zřejmě přibývá. Současně byla jak na lokalitě, tak v rámci opylovacího experimentu odhalena hybridní semena, která poukazují na skutečnost aktivního procesu křížení mezi rodičovskými druhy. Tyto výsledky ale zřejmě nelze aplikovat na všechny smíšené populace *P. patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica*, jelikož na lokalitě Dubový vrch hybridi dosud nalezeni nebyli.

Na základě analýz semen vzniklých z experimentálního křížení i semen z volného sprášení z lokality byla odhalena jednosměrnost křížení *P. patens* × *P. pratensis* subsp. *bohemica.* Jako mateřská rostlina figuruje *P. pratensis* subsp. *bohemica*, zatímco *P. patens* je dárce pylu. Dalším důležitým poznatkem je prokazatelná schopnost autogamie jak u *P. patens*, tak u *P. pratensis* subsp. *bohemica*.

Z této práce jednoznačně vyplývá, že je potřeba brát v potaz mezidruhové křížení i v rámci ochrany přírody. Přestože hybridní jedinci zřejmě nepředstavují bezprostřední riziko pro rodičovské druhy, je nutné hybridizaci dále sledovat.

7. Literatura

ABBOTT, J., IRWIN, J.A. & COMES, H.P. (2000) Hybrid origin of the Oxford Ragwort, *Senecio squalidus* L. *Watsonia* **23**, 123–138.

ABBOTT, R.J., HEGARTY, M.J., HISCOCK, S.J. & BRENNAN, A.C. (2010) Homoploid hybrid speciation in action. *Taxon* **59**, 1375–1386.

ADAMS, J., Ernita WYK, E. & RIDDIN T., (2016) First record of *Spartina alterniflora* in southern Africa indicates adaptive potential of this saline grass. *Biological Invasions* **18**, 2153–2158.

AERTS, R., BERECHA, G., GIJBELS, P., HUNDERA, K., GLABEKE, S.V., VANDEPITTE, K., MUYS, B., ROLDÁN-RUIZ, I. & HONNAY, O. (2013) Genetic variation and risks of introgression in the wild *Coffea arabica* gene pool in south-western Ethiopian montane rainforests. *Evolutionary Applications* **6**, 243–252.

AGARWAL, Milee, Neeta SHRIVASTAVA a Harish PADH, 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* **27**, 617–631.

AICHELE, D. & SCHWEGLER, H.-W. (1957) Die Taxonomie der Gattung *Pulsatilla*. *Repertorium novarum specierum regni vegetabilis* **60**, 1–230.

ANDERSON, E. & HUBRICHT, L. (1938) Hybridization in *Tradescantia.* III. The evidence for introgressive hybridization. *American Journal of Botany* **25**, 396–402.

ANDERSON, E. & STEBBINS, G.L. (1954) Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* **8**, 378–388.

ANTHONY, F., COMBES, M., ASTORGA, C., BERTRAND, B., GRAZIOSI, G. & LASHERMES, P. (2002) The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 894–900.

ARRIGO, N., GUADAGNUOLO, R., LAPPE, S., PASCHE, S., PARISOD, C. & FELBER, F. (2011) Gene flow between wheat and wild relatives: empirical evidence from *Aegilops geniculata*, *Ae. neglecta* and *Ae. triuncialis*. *Evolutionary Applications* **4**, 685–695.

AYRES, Debra, Dino GARCIA-ROSSI, Heather DAVIS a Donald STRONG, (2002) Extent and degree of hybridization between exotic (*Spartina alterniflora*) and native (*S. foliosa*) cordgrass (*Poaceae*) in California, USA determined by random amplified polymorphic DNA (RAPDs). *Molecular Ecology* **8**, 1179–1186.

BALAO, Francisco, Ramón CASIMIRO-SORIGUER, Juan Luis GARCÍA-CASTAÑO, Anass TERRAB a Salvador TALAVERA, (2015) Big thistle eats the little thistle: does unidirectional introgressive hybridization endanger the conservation of Onopordum hinojense? *New Phytologist* **206**, 448-458.

BARAĆ, G., OGNJANOV, V., VIDAKOVIĆ, D.O., DORIĆ, D., LJUBOJEVIĆ, M., DULIĆ, J., MIODRAGOVIĆ, M. & GAŠIĆ, K. (2017) Genetic diversity and population structure of European ground cherry (*Prunus fruticosa* Pall.) using SSR markers. *Scientia Horticulturae* **224**, 374–383.

BARTON, N.H. & HEWITT, G.M. (1985) Analysis of Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**, 113–148.

BARTSCH, D. (2010) Gene Flow in Sugar Beet. *Sugar Tech* **12**, 201–206.

BAUMEL, A., M. L. AINOUCHE, M. T. MISSET, J-P. GOURRET a R. J. BAYER, 2003. Genetic evidence for hybridization between the native *Spartina maritima* and the introduced *Spartina alterniflora* (*Poaceae*) in South-West France: *Spartina* × *neyrautii* re-examined. *Plant Systematics and Evolution*. **237**, 87–97.

BETZ, C., SCHEUERER, M. & REISCH, C. (2013) Population reinforcement – A glimmer of hope for the conservation of the highly endangered Spring Pasque flower (*Pulsatilla vernalis*). *Biological Conservation* **168**, 161–167.

BOCHENKOVÁ, M., HEJCMAN, M. & KARLÍK, P. (2012) Effect of plant community on recruitment of *Pulsatilla pratensis* in dry grassland. *Scientia Agriculturae Bohemica* **43**, 127–133.

BOCHENKOVÁ, M., HEJCMAN, M. & KARLÍK, P. (2015) Effect of nitrogen, appendage removal, locality, and year on seed germination of the endangered dry grassland species *Pulsatilla pratensis* (L.) Mill. *Propagation of Ornamental Plants* **15**, 154–162.

BOLTE, Constance E., Tommy PHANNARETH, Michelle ZAVALA-PAEZ, Brianna N. SUTARA, Muhammed F. CAN, Matthew C. FITZPATRICK, Jason A. HOLLIDAY, Stephen R. KELLER a Jill A. HAMILTON, (2024). Genomic insights into hybrid zone formation: The role of climate, landscape, and demography in the emergence of a novel hybrid lineage. *Molecular Ecology* **33**, e17430

BORSCH, T., HILU, K.W., WIERSEMA, J.H., LÖHNE, C., BARTHLOTT, W. & WILDE, V. (2007) Phylogeny of *Nymphaea* (*Nymphaeaceae*): Evidence from substitutions and microstructural changes in the chloroplast *trnT - trnF* region. *International Journal of Plant Sciences* **168**, 639–671.

BROCHMANN, C., BRYSTING, A. & ALSOS, I. (2004) Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**, 521-536.

BUERKLE, C.A. & RIESEBERG, L.H. (2008) The rate of genome stabilization in homoploid hybrid species. *Evolution* **62**, 266–275.

BULTAS, P. & KROUFEK, R. (2011) Aktuální rozšíření koniklece lučního českého (*Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* Skalický) na Ústecku. *Severočeskou Přírodou* **42,** 1-5

BUREŠ, L. (2018) Fenomén Velká kotlina 5. Cévnaté rostliny. *Živa* **6**, 302–306.

BUXÓ I CAPVEVILA, R., (1997) Presence of „*Olea europaea*" and „*Vitis vinifera*" in archaeological sites from the Iberian Peninsula. *Lagascalia*. **19**, 271–282.

CARVALHO, G.M.A., CARVALHO C. R & SOARES F.A.F., (2017). Flow cytometry and cytogenetic tools in eucalypts: genome size variation × karyotype stability. *Tree Genetics & Genomes* **13**, 1-11.

COART, E. VEKEMANS, X., SMULDERS, M. J. M., WAGNER, I., HUYLENBROECK. J V., BOCKSTAELE E. V. & ROLDÁN-RUIZ, I. (2003) Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Molecular Ecology* **12**, 845–857.

COMAI, L., (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* **6**, 836–846.

CORNILLE, Amandine, Pierre GLADIEUX a Tatiana GIRAUD, 2013. Crop-to-wild gene flow and spatial genetic structure in the closest wild relatives of the cultivated apple. *Evolutionary Applications* [online]. **6**(5), 737–748. ISSN 1752-4571. Dostupné z: doi:10.1111/eva.12059

CHAPMAN, M.A. & BURKE, J.M. (2006) Letting the gene out of the bottle: the population genetics of genetically modified crops. *New Phytologist* **170**, 429–443.

CHAPMAN, M.A. & BURKE, J.M. (2007) Genetic divergence and hybrid speciation. *Evolution* **61**, 1773–1780.

CHEN, L.J. (2004) Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. *Annals of Botany* **93**, 67–73.

CHEN, K.-H. & PANNELL J. R., (2024) Effects of floral sex allocation and phenology on the within-flower selfing rate and female reproductive success in *Pulsatilla alpina,* a perennial herb with strong inbreeding depression 2024

CHRISTIE, K., FRASER L. S. & LOWRY D. B., (2022). The strength of reproductive isolating barriers in seed plants: Insights from studies quantifying premating and postmating reproductive barriers over the past 15 years. *Evolution* **76**, 2228–2243.

CHUNG, Ch.-H., (2006) Forty years of ecological engineering with *Spartina* plantations in China. *Ecological Engineering* **27**, 49–57. ISSN 0925-8574.

CRUTZEN, P.J. (2006) The "Anthropocene". In *Earth System Science in the Anthropocene* (ed E. EHLERS & T. KRAFFT), str. 13–18. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.

ČECH, L., EKRT, L., EKRTOVÁ, E., JELÍNKOVÁ, J. & JUŘIČKA J. [ed.] (2017) *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* Skalický-koniklec luční český v Kraji Vysočina. [online] *Pobočka ČSO na Vysočině* [Cit. 11. prosince 2024]
Dostupné z: http://www.prirodavysociny.cz/cs/druhy/957/koniklec-lucni-cesky

ČELAKOVSKÝ, L.J. (1865) Ist *Pulsatilla hackelii* Pohl ein bastard? *Lotos* **15**, 8–11.

DAÏNOU, K., FLOT, J.-F., DEGEN, B., BLANC-JOLIVET, C., DOUCET, J.-L., LASSOIS, L. & HARDY, O.J. (2017) DNA taxonomy in the timber genus *Milicia*: evidence of unidirectional introgression in the West African contact zone. *Tree Genetics & Genomes* **13**, 90-101.

DANIHELKA, J., CHRTEK JR., J. & KAPLAN, Z. (2012) Checklist of vascular plants of the Czech Republic. *Preslia* **84**, 647–811.

DE ANDRÉS, M. T., BENITO A., PÉREZ-RIVERA G., OCETE R., LOPEZ M. A., GAFORIO L., MUÑOZ G., CABELLO F., MARTÍNEZ ZAPATER J. M. & ARROYO-GARCÍA R., (2012) Genetic diversity of wild grapevine populations in Spain and their genetic relationships with cultivated grapevines. *Molecular Ecology* **21**, 800–816.

DING, J., HUA D., WEI Y., YAO L. & WANG N., (2024) Widespread gene flow from *Betula tianshanica* and *Betula pendula* to *Betula microphylla:* a rare species from Northwest China. *Botanical Journal of the Linnean Society*

DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J. & SUDA, J. (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* **2**, 2233–2244.

EJANKOWSKI, W. & MAŁYSZ, B. (2011) Morphological variability of the water lily (*Nymphaea*) in the Polesie Zachodnie region, Eastern Poland. *Biologia* **66**, 604-609.

ELLSTRAND, N.C. & ELAM, D.R. (1993) Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**, 217–242.

ELLSTRAND, N.C., MEIRMANS, P., RONG, J., BARTSCH, D., GHOSH, A., DE JONG, T.J., HACCOU, P., LU, B.-R., SNOW, A.A., NEAL STEWART, C., STRASBURG, J.L., VAN TIENDEREN, P.H., VRIELING, K. & HOOFTMAN, D. (2013) Introgression of crop alleles into wild or weedy populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **44**, 325–345.

ELLSTRAND, N.C., PRENTICE, H.C. & HANCOCK, J.F. (1999) Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics* **30**, 539–563.

ELLSTRAND, N.C., WHITKUS, R. & RIESEBERG, L.H. (1996) Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 5090–5093.

EVROPSKÉ SPOLEČENSTVÍ (2004) Směrnice Rady 92/43/EHS ze dne 21. května 1992 o ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (Příloha II) [online].
[Cit. 25. dubna 2021] Dostupné z:
https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1992:206:0007:0050:EN:PDF

FEHRER, J., KRAK, K. & CHRTEK, J. (2009) Intra-individual polymorphism in diploid and apomictic polyploid hawkweeds (*Hieracium*, *Lactuceae*, *Asteraceae*): disentangling phylogenetic signal, reticulation, and noise. *BMC Evolutionary Biology* **9**, 239-262.

FELDMAN, Moshe & A LEVY A., (2012) Genome Evolution Due to Allopolyploidization in Wheat. *Genetics* **192**, 763–774.

FIELD, D.L., AYRE, D.J., WHELAN, R.J. & YOUNG, A.G. (2011) Patterns of hybridization and asymmetrical gene flow in hybrid zones of the rare *Eucalyptus aggregata* and common *E. rubida*. *Heredity* **106**, 841–853.

FUTÁK, J. (1982) *Pulsatilla* Mill – poniklec – In: BERTOVÁ, L., FUTÁK, J., HLAVAČEK, A., HOSTIČKA, M., CHRTEK, J., JASIČOVÁ, M., KMEŤOVÁ, E., KŘÍSA, B., OSVAČILOVÁ, V., ZAHRADNÍKOVÁ, K., ZELENÝ, V. *Flóra Slovenska III*. [online] s. 110-138, Veda, Bratislava ISBN 71-060-82 Dostupné z: https://bibdigital.rjb.csic.es/viewer/15087/?offset=#page=2&viewer=picture&o=bookmark&n=0&q

GALLO-MEAGHER, M. & IRVINE J. E., (1996) Herbicide Resistant Transgenic Sugarcane Plants Containing the bar Gene. *Crop Science* **36**, 1367-1374.

GAO, B., CHEN M., LI X., LIANG Y., ZHU F., LIU T., ZHANG D., WOOD A. J., OLIVER M J. & ZHANG J., (2018) Evolution by duplication: paleopolyploidy events in plants reconstructed by deciphering the evolutionary history of VOZ transcription factors. *BMC Plant Biology* **18**, 1-19.

GARGIULO, R., WORSWICK G., ARNOLD C., PIKE L. J., COWAN R. S., HARDWICK K. A, CHAPMAN T. & FAY M. F., (2019) Conservation of the Threatened Species, *Pulsatilla vulgaris* Mill. (Pasqueflower), is Aided by Reproductive System and Polyploidy. *Journal of Heredity* **110**, 618–628.

GARNATJE, T., VALLÈS J., GARCIA S., HIDALGO O., SANZ M., CANELA M. Á. & SILJAK-YAKOVLEV S., (2004) Genome size in *Echinops* L. and related genera (*Asteraceae, Cardueae*): karyological, ecological and phylogenetic implications. *Biology of the Cell* **96**, 117–124.

GARRIDO-CARDENAS, J. A., MESA-VALLE C. & MANZANO-AGUGLIARO F., (2018) Trends in plant research using molecular markers. *Planta* **247**, 543–557.

GHAZOUL, J. & SATAKE A., (2009) Nonviable seed set enhances plant fitness: the sacrificial sibling hypothesis. *Ecology* **90**, 369–377.

GRIMM, G.W. & DENK, T. (2008) ITS Evolution in *Platanus* (*Platanaceae*): homoeologues, pseudogenes and ancient hybridization. *Annals of Botany* **101**, 403–419.

GRULICH, V. (2017) Červený seznam cévnatých rostlin ČR. *Příroda* **35**, 75-132.

GRZYL, A., KIEDRZYŃSKI, M., ZIELIŃSKA, K.M. & REWICZ, A. (2014) The relationship between climatic conditions and generative reproduction of a lowland population of *Pulsatilla vernalis*: the last breath of a relict plant or a fluctuating cycle of regeneration? *Plant Ecology* **215**, 457–466.

GRZYL, A., NIEWIADOMSKI, A. & WOZIWODA, B. (2013) Soil environment of *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. at selected sites in the Polish lowland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **82**, 267–273.

GRZYL, A. & RONIKIER, M. (2011) *Pulsatilla vernalis* (*Ranunculaceae*) in the polish lowlands: current population resources of a declining species. *Polish Botanical Journal*, **56**, 185-194.

GUISAN, A., BROENNIMANN O., ENGLER R., VUST M., YOCCOZ N. G., LEHMANN A. & ZIMMERMANN N. E., (2006) Using Niche-Based Models to Improve the Sampling of Rare Species. *Conservation Biology* **20**, 501–511.

HAJJAR, R. & HODGKIN, T. (2007) The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica* **156**, 1–13.

HAO, Y., WANG X.-F., GUO Y., LI T.-Y., YANG J., AINOUCHE M. L., SALMON A., JU R.-T., WU J.-H., LI L.-F. & LI B., (2024) Genomic and phenotypic signatures provide insights into the wide adaptation of a global plant invader. *Plant Communications* **5**

HANZL, M., KOLÁŘ, F., NOVÁKOVÁ, D., & SUDA, J. (2014). Nonadaptive processes governing early stages of polyploid evolution: Insights from a primary contact zone of relict serpentine *Knautia arvensis* (*Caprifoliaceae*). *American Journal of Botany*, **101**, 935–945.

HARDY, O.J., VANDERHOEVEN, S., LOOSE, M.D. & MEERTS, P. (2000) Ecological, morphological and allozymic differentiation between diploid and tetraploid knapweeds (*Centaurea jacea*) from a contact zone in the Belgian Ardennes. *New Phytologist* **146**, 281–290.

HARRISON, R.G. & LARSON, E.L. (2016) Heterogeneous genome divergence, differential introgression, and the origin and structure of hybrid zones. *Molecular ecology* **25**, 2454–2466.

HERBERT, W. (1847). *Amaryllidaceae: Preceded by an Attempt to Arrange the Monocotyledonous Orders and Followed by a Treatise on Cross-bred Vegetables, and Supplement*. London: Ridgway.

HENSEN, I., OBERPRIELER Ch. & WESCHE K., (2005) Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla vulgaris* Mill. (*Ranunculaceae*) in Central Germany. *Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **200** 3–14.

HLAVÁČEK, R. & KARLÍK, P. (2010) Příspěvek k poznání flóry a vegetace PP Na horách a poznámky k teplomilné květeně Podbrdska. *Bohemia centralis* **30**, 193–250.

HOEKSEMA, J., ROY, M., ŁASKA, G., SIENKIEWICZ, A., HORNING, A., ABBOTT, M.J., TRAN, C. & MATTOX, J. (2018) *Pulsatilla patens* (*Ranunculaceae*), a perennial herb, is ectomycorrhizal in northeastern Poland and likely shares ectomycorrhizal fungi with *Pinus sylvestris*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **87**, 3572-3585.

HOOT, S.B., MEYER, K.M. & MANNING, J.C. (2012) Phylogeny and reclassification of *Anemone* (*Ranunculaceae*), with an emphasis on austral species. *Systematic Botany* **37**, 139–152.

HORÁČKOVÁ, J. & TICHÝ, T. (2014) Květena a vegetace národní přírodní rezervace Koda v Českém krasu. *Bohemia centralis* **32**, 51–154.

JONES, D.F. (1917) Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis. *Genetics* **2**, 466–479.

JONSSON, O., ROSQUIST, G. & WIDEN, B. (1991) Operation of dichogamy and herkogamy in five taxa of *Pulsatilla*. *Ecography* **14**, 260–271.

JUŚKIEWICZ-SWACZYNA, B. (2010) Distribution and abundance of *Pulsatilla Patens* populations in nature reserves in north-eastern Poland. *Polish Journal of Natural Science* **25**, 376–386.

JUTILA, H., PARISY B. & LOEHR J., (2024) Influence of environmental and intrinsic factors on the flowering success and petal morphology of *Pulsatilla patens* and the hybrid *Pulsatilla patens* × *vernalis* in Finland. *Plant Ecology* **225**, 425–440.

KABÁTOVÁ, K., VÍT, P. & SUDA, J. (2014) Species boundaries and hybridization in central-European *Nymphaea* species inferred from genome size and morphometric data. *Preslia* **86**, 131–154.

KALAMEES, R., PÜSSA, K., TAMM, S. & ZOBEL, K. (2012) Adaptation to boreal forest wildfire in herbs: Responses to post-fire environmental cues in two *Pulsatilla* species. *Acta Oecologica* **38**, 1–7.

KALAMEES, R., PÜSSA, K., VANHA-MAJAMAA, I. & ZOBEL, K. (2005) The effects of fire and stand age on seedling establishment of *Pulsatilla patens* in a pine-dominated boreal forest. *Canadian Journal of Botany* **83**, 688–693.

KALLIOVIRTA, M., RYTTÄRI, T. & HEIKKINEN, R.K. (2006) Population structure of a threatened plant, *Pulsatilla patens*, in boreal forests: modelling relationships to overgrowth and site closure. *Biodiversity and Conservation* **15**, 3095–3108.

KAMEYAMA, Y, MORIWAKI H., SUZUKI Y. & FUJIYOSHI M., (2024) *Eclipta thermalis*; a previously common weed, threatened by the expansion of the exotic congener *E. alba* in Japanese rice paddies. *Ecological Research* **39**, 303–317.

KAPLAN, Z., DANIHELKA J., CHRTEK J. jun., KIRSCHNER J., KUBÁT K., ŠTECH M. & ŠTĚPÁNEK J. (ed) (2019): *Klíč ke květeně České republiky [Key to the flora of the Czech Republic]*. Ed. 2 – s. 1168, Academia, Praha. ISBN 978-80-200-2660-6

KARPECHENKO, G.D. (1927) The production of polyploid gametes in hybrids. *Hereditas* **9**, 349–368.

KAY, K.M. (2006) Reproductive isolation between two closely related hummingbird pollinated neotropical gingers. *Evolution* **60**, 538–552.

KELLER, L. F. & WALLER D. M., (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 230–241.

KNOBLOCH, I.W. (1972) Intergeneric hybridization in flowering plants. *Taxon* **21**, 97–103.

KÖHLER, C., DZIASEK K. & DEL TORO-DE LEÓN G., (2021) Postzygotic reproductive isolation established in the endosperm: mechanisms, drivers and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **376**

KÖLREUTER J.G. (1766): Vorläufige Nachricht von einigen das Geschlecht der pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen, nebst Fortsetzungen 1, 2 und 3 (1761–1766). Leipzig, Wilhelm Engelmann

KONG, S. & KUBATKO L. S., (2021) Comparative Performance of Popular Methods for Hybrid Detection using Genomic Data. *Systematic Biology* **70**, 891–907.

KOO, D.-H., JUGULAM, M., PUTTA, K., CUVACA, I.B., PETERSON, D.E., CURRIE, R.S., FRIEBE, B. & GILL, B.S. (2018) Gene duplication and aneuploidy trigger rapid evolution of herbicide resistance in common waterhemp. *Plant Physiology* **176**, 1932–1938.

KOROPACHINSKII, I. Y., (2013) Natural hybridization and taxonomy of birches in North Asia. *Contemporary Problems of Ecology* **6**, 350–369.

KRAHULCOVÁ, A., KRAHULEC, F. & KIRSCHNER, J. (1996) Introgressive hybridization between a native and an introduced species: *Viola lutea* subsp. *sudetica* versus *V. tricolor*. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* **31**, 219–244.

KREJČOVÁ, N. (2011) Mezidruhová hybridizace mezi *Pulsatilla patens* a *P. pratensis* – význam pro druhovou ochranu: bakalářská práce. Praha: UK 38 s., vedoucí práce Jan Suda

KREJČOVÁ, N. (2014) Hybridizace mezi *Pulsatilla pratensis* a *P. patens*? Skutečnost nebo mýtus?: diplomová práce. Praha: UK 106 s., vedoucí práce Jan Suda

KRON, P., SUDA, J. & HUSBAND, B.C. (2007) Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **38**, 847–876.

KUBÁT, K. (1997) *Pulsatilla patens* (L.) Mill. v České republice. *Severočeskou Přírodou* **30**, 5-10

LV, H.-Z., SO S. & KIM M., (2011) A New Hybrid Species of *Pulsatilla* (*Ranunculaceae*): *P.* × *yanbianensis* H.Z. Lv. *Korean Journal of Plant Taxonomy*. **41**, 365–369.

LATTA, R.G. & MITTON, J.B. (1999) Historical separation and present gene flow through a zone of secondary contact in ponderosa pine. *Evolution* **53**, 769-776.

LEVIN, D.A., FRANCISCO-ORTEGA, J. & JANSEN, R.K. (1996) Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology* **10**, 10–16.

LEVIN, D.A. (2002) Hybridization and extinction: in protecting rare species, conservationists should consider the dangers of interbreeding, which compound the more well-known threats to wildlife. *American Scientist* **90**, 254–261.

LI, Q.-J, WANG X., WANG J.-r., SU N., ZHANG L., MA Y.-p., CHANG Z.-y., ZHAO L. & POTTER D., (2019) Efficient Identification of *Pulsatilla* (*Ranunculaceae*) Using DNA Barcodes and Micro-Morphological Characters. *Frontiers in Plant Science* **10**

LI, Q., SU, N., ZHANG, L., TONG, R., ZHANG, X., WANG, J., CHANG, Z., ZHAO, L. & POTTER, D. (2020) Elucidate diversity, phylogeny, and taxonomy of *Pulsatilla* (*Ranunculaceae*). *Scientific Reports* **10**, 1–12.

LI, Z., MCKIBBEN M. T. W., FINCH G. S., BLISCHAK P. D., SUTHERLAND B. L. & BARKER M. S., (2021) Patterns and Processes of Diploidization in Land Plants. *Annual review of plant biology* **72**, 387–410.

LIAO, W.-J., ZHU, B.-R., LI, Y.-F., LI, X.-M., ZENG, Y.-F. & ZHANG, D.-Y. (2019) A comparison of reproductive isolation between two closely related oak species in zones of recent and ancient secondary contact. *BMC Evolutionary Biology* **19,** 70-80.

LIEBST, B. & SCHNELLER, J. (2005) How selfing and intra- and interspecific crossing influence seed set, morphology and ploidy level in *Euphrasia*: An experimental study of species occurring in the Alps of Switzerland. *Plant Systematics and Evolution* **255**, 193–214.

LINDELL, T. (1998) Breeding systems and crossing experiments in *Anemone patens* and in the *Anemome pulsatilla* group (*Ranunculaceae*). *Nordic Journal of Botany* **18**, 549–561.

LOUREIRO, J., TRÁVNÍČEK, P., RAUCHOVÁ, J., URFUS, T., VÍT, P., ŠTECH, M., CASTRO, S. & SUDA, J. (2010) The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia* **82**, 3–21.

LOWRY, D. B., MODLISZEWSKI J. L., WRIGHT K. M., WU C. A. & WILLIS J. H., (2008) The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **363**, 3009–3021.

LU, B., YANG, X. & ELLSTRAND, N.C. (2016) Fitness correlates of crop transgene flow into weedy populations: a case study of weedy rice in China and other examples. *Evolutionary Applications* **9**, 857–870.

LYNN, A. M., SULLIVAN L. L. & GALEN C., (2023) The cost of self-promotion: ecological and demographic implications of the mentor effect in natural plant populations. *New Phytologist* **23**, 1418–1431.

MACKOVÁ, L., VÍT, P. & URFUS, T. (2018) Crop-to-wild hybridization in cherries-Empirical evidence from *Prunus fruticosa*. *Evolutionary Applications* **11**, 1748–1759.

MADLUNG, A., (2013) Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity* **110**, 99–104.

MALLET, J. (2007) Hybrid speciation. *Nature* **446**, 279–283.

MANDÁKOVÁ, T., JOLY, S., KRZYWINSKI, M., MUMMENHOFF, K., & LYSAK, M. A, (2010) *Fast Diploidization in Close Mesopolyploid Relatives of Arabidopsis. The Plant Cell* **22**, 2277-2290.

MANDÁKOVÁ, T. & LYSAK M. A., (2018) Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes. *Current Opinion in Plant Biology* **42**, 55–65.

MARTINSEN, G.D., WHITHAM, T.G., TUREK, R.J. & KEIM, P. (2001) Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution* **55**, 1325–1335.

MATĚJŮ, K. Naše koniklece [online] *Muzeum Karlovy Vary* [cit. 14. dubna 2021]
Dostupné z: http://kvmuz.cz/typ/priroda-karlovarska/nase-koniklece

MAYEROVÁ, H., TICHÝ, T., HEŘMAN, P. & MÜNZBERGOVÁ, Z. (2014) Pastevní management suchých trávníků v CHKO Český kras – zachování a obnova druhově bohatých společenstev. *Bohemia centralis* **32**, 395–406.

MOORA, M., OPIK, M., SEN, R. & ZOBEL, M. (2004) Native arbuscular mycorrhizal fungal communities differentially influence the seedling performance of rare and common *Pulsatilla* species. *Functional Ecology* **18**, 554–562.

MÕTLEP, M., ILVES, A., TALI, K., SILD, E. & KULL, T. (2021) Artificial crossing and pollen tracking reveal new evidence of hybridization between sympatric *Platanthera* species. *Plant Systematics and Evolution* **307**, 25-40.

MOTTIER, D. M., (1895) Contributions to the Embryology of the *Ranunculaceæ*. *Botanical Gazette* **20**, 241–248.

MOYLE, L. C, JEWELL C. P. & KOSTYUN J. L., (2014) Fertile approaches to dissecting mechanisms of premating and postmating prezygotic reproductive isolation. *Current Opinion in Plant Biology* **18**, 16–23.

NAUDIN, C. (1863). NOUVELLES RECHERCHES SUR L'HYBRIDITÉ DANS LES VÉGÉTAUX. *ANNALES DES SCIENCES NATURELLES BOTANIQUE*, **19**, 180–203.

NICOLAS, S.D., MONOD, H., EBER, F., CHÈVRE, A.-M. & JENCZEWSKI, E. (2012) Non-random distribution of extensive chromosome rearrangements in *Brassica napus* depends on genome organization: Meiosis drives non random rearrangements. *The Plant Journal* **70**, 691–703.

NICOLÈ, F., TELLIER, F., VIVAT, A. & TILL-BOTTRAUD, I. (2007) Conservation unit status inferred for plants by combining interspecific crosses and AFLP. *Conservation Genetics* **8**, 1273–1285.

OARD, J., COHN, M.A., LINSCOMBE, S., GEALY, D. & GRAVOIS, K. (2000) Field evaluation of seed production, shattering, and dormancy in hybrid populations of transgenic rice (*Oryza sativa*) and the weed, red rice (*Oryza sativa*). *Plant Science* **157**, 13–22.

OAKLEY, Ch. G. & WINN A. A., (2012) Effects of population size and isolation on heterosis, mean fitness, and inbreeding depression in a perennial plant. *New Phytologist* **196**, 261–270.

O'CONNOR, K., POWELL M., NOCK C. & SHAPCOTT A., (2015) Crop to wild gene flow and genetic diversity in a vulnerable *Macadamia* (Proteaceae) species in New South Wales, Australia. *Biological Conservation* **191**, 504–511.

OLŠAVSKÁ, K. & LÖSER, C.J. (2013) Mating system and hybridization of the *Cyanus triumfetti* and *C. montanus* Groups (*Asteraceae*). *Folia Geobotanica* **48**, 537–554.

Ondráček, Č. & Blažejová, E. (2020) Záchranný program pro koniklec otevřený (*Pulsatilla patens*) v České republice [online]. *Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky* 1-51, [cit. 15. dubna 2021]. Dostupné z: https://www.zachranneprogramy.cz/koniklec-otevreny/

OSBORN, T.C., PIRES J. Ch., BIRCHLER J. A., AUGER D. L., CHEN Z. J., LEE H.-S., COMAI L., MADLUNG A., DOERGE R. W., COLOT V. & MARTIENSSEN R. A., (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* **19**, 141–147.

OSVALDE, Anita; KLAVINA, Dace; JAKOBSONE, Gunta. FACTORS POTENTIALLY CAUSING DIFFERENCES IN SEED VIABILITY OF PULSATILLA PATENS POPULATIONS IN LATVIA: A PILOT STUDY. (2022) *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*, **22**, 175-182.

PAULE, J., SCHERBANTIN, A. & DOBEŠ, C. (2012) Implications of hybridisation and cytotypic differentiation in speciation assessed by AFLP and plastid haplotypes - a case study of *Potentilla alpicola* La Soie. *BMC Evolutionary Biology* **12**, 132-144.

PFLUGBEIL, G., AFFENZELLER M., TRIBSCH A. & COMES H. P., (2021) Primary hybrid zone formation in *Tephroseris helenitis* (*Asteraceae*), following postglacial range expansion along the central Northern Alps. *Molecular Ecology* **30**, 1704–1720.

PICKUP, M., BRANDVAIN, Y., FRAÏSSE, C., YAKIMOWSKI, S., BARTON, N.H., DIXIT, T., LEXER, C., CEREGHETTI, E. & FIELD, D.L. (2019) Mating system variation in hybrid zones: facilitation, barriers and asymmetries to gene flow. *New Phytologist* **224**, 1035–1047.

PILT, I. & KUKK, Ü. (2002) *Pulsatilla patens* and *Pulsatilla pratensis*(Ranunculaceae) in Estonia: distribution and ecology. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Biology, Ecology* **51**, 242–256.

PLADIAS – databáze české flóry a vegetace [online]. © 2014-2021 Pladias [cit. 13. dubna 2021] Dostupné z: https://pladias.cz/taxon/distribution/Pulsatilla%20pratensis%20subsp.%20bohemica

PRACH, K., BLAHOVEC, J., IBERL, K., PRACH, J. & ŠLECHTOVÁ, A. (2020) Podaří se zachránit koniklec jarní (*Pulsatilla vernalis*) na Třeboňsku? *Botanika*, 29–31.

PRENTIS, P.J., WHITE, E.M., RADFORD, I.J., LOWE, A.J. & CLARKE, A.R. (2007) Can hybridization cause local extinction: a case for demographic swamping of the Australian native *Senecio pinnatifolius* by the invasive *Senecio madagascariensis*? *New Phytologist* **176**, 902–912.

PRUSKI, K. (2007) Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa* L.) and Nanking cherry (*Prunus Tomentosa* L.). In *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits* (ed S.M. JAIN & H. HÄGGMAN), s. 391–407. Springer Netherlands, Dordrecht.

PU, D., SHI, M., WU, Q., GAO, M., LIU, J.-F., REN, S., YANG, F., TANG, P., YE, G., SHEN, Z., HE, J., YANG, D., BU, W.-J., ZHANG, C., SONG, Q., ET AL. (2014) Flower-visiting insects and their potential impact on transgene flow in rice. *Journal of Applied Ecology* **51**, 1357–1365.

RADA EVROPY (1979) Úmluva o ochraně evropských planě rostoucích rostlin, volně žijících živočichů a přírodních stanovišť (Příloha I) [online]. Bern: Rada Evropy [Cit. 25. dubna 2021] Dostupné z: https://www.coe.int/en/web/conventions/full-list/-/conventions/treaty/104

RAMSEY, J., BRADSHAW, H.D. & SCHEMSKE, D.W. (2003) Components of reproductive isolation between the Monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution* **57,** 1520-1534.

RAMSEY, J. & SCHEMSKE, D.W. (1998) Pathways, mechanism, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 467–501.

RAO, A.N., JOHNSON, D.E., SIVAPRASAD, B., LADHA, J.K. & MORTIMER, A.M. (2007) Weed Management in Direct-Seeded Rice. *Advances in Agronomy* **93**, 153–255.

RATNASEKERA, D. (2015) Weedy rice: A threat to rice production in Sri Lanka. *Journal of the University of Ruhuna* **1**, 2-13.

REED, D.H. & FRANKHAM, R. (2003) Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* **17**, 230–237.

RHYMER, J.M. & SIMBERLOFF, D. (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 83–109.

RICHARDS A. J. (1997) Plant breeding systems. – CHAPMAN & HALL, LONDON

RIESEBERG, L.H. (1995) The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* **82**, 944–953.

RIESEBERG, L.H. (1997) Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **28**, 359–389.

ROBERTS, HERBERT FULLER. PLANT HYBRIDIZATION BEFORE MENDEL. 1929.

RONIKIER, M., COSTA, A., AGUILAR, J.F., FELINER, G.N., KÜPFER, P. & MIREK, Z. (2008) Phylogeography of *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. (*Ranunculaceae*): chloroplast DNA reveals two evolutionary lineages across central Europe and Scandinavia. *Journal of Biogeography* **35**, 1650–1664.

RUTHERFORD, S., VAN DER MERWE, M., WILSON, P.G., KOOYMAN, R.M. & ROSSETTO, M. (2019) Managing the risk of genetic swamping of a rare and restricted tree. *Conservation Genetics* **20**, 1113–1131.

RYBKA V., RYBKOVÁ R. & POHLOVÁ R. (2004) *Rostliny ve svitu evropských hvězd (Rostliny soustavy Natura 2000 v České republice)*. Ed. 1. s. 74-76 Sagittaria, Praha. ISBN 80-239-4177-1

SANCHEZ OLGUIN, E.R., ARRIETA-ESPINOZA, G., LOBO, J.A. & ESPINOZA-ESQUIVEL, A.M. (2009) Assessment of gene flow from a herbicide-resistant indica rice (*Oryza sativa* L.) to the Costa Rican weedy rice (*Oryza sativa*) in Tropical America: factors affecting hybridization rates and characterization of F1 hybrids. *Transgenic Research* **18**, 633–647.

SANDSTRÖM, A., SVENSSON, B.M. & MILBERG, P. (2017) An example of how to build conservation evidence from case studies: Fire and raking to enhance *Pulsatilla vernalis* populations. *Journal for Nature Conservation* **36**, 58–64.

SCHUMER, M., ROSENTHAL, G.G. & ANDOLFATTO, P. (2014) How common is homoploid hybrid speciation? *Evolution* **68**, 1553–1560.

SEMAGN, K., BJØRNSTAD Å. & NDJIONDJOP M. N., (2006) An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* **5**

SHANG, L., WANG, Y., CAI, S., WANG, X., LI, Y., ABDUWELI, A. & HUA, J. (2016) Partial dominance, overdominance, epistasis and QTL by environment interactions contribute to heterosis in two upland cotton hybrids. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **6**, 499–507.

SCHINKEL, Ch. C. F., KIRCHHEIMER B., DULLINGER S., GEELEN D., DE STORME N. & HÖRANDL E., (2017) Pathways to polyploidy: indications of a female triploid bridge in the alpine species *Ranunculus kuepferi* (*Ranunculaceae*). *Plant Systematics and Evolution* **303**, 1093–1108.

SKALICKÝ V. (1988): *Pulsatilla* Mill. – koniklec. – In: HEJNÝ S., SLAVÍK B., CHRTEK J., TOMŠOVIC P. & KOVANDA
M. (eds), *Květena České socialistické republiky* 1, s. 414–422, Academia, Praha.
Dostupné z: https://pladias.cz/taxon/flora/

SNOW, A.A. & CAMPBELL, L.G. (2005) Can feral radishes become weeds. In *Crop Ferality and Volunteerism* s. 193–208. CRC Press, Boca raton, FL.

SOLTIS, D.E. & SOLTIS, P.S. (1993) Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* **12**, 243–273.

SRAMKÓ, G., LACZKÓ, L., VOLKOVA, P.A., BATEMAN, R.M. & MLINAREC, J. (2019) Evolutionary history of the Pasque-flowers (*Pulsatilla, Ranunculaceae*): Molecular phylogenetics, systematics and rDNA evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **135**, 45–61.

STEBBINS, G.L. (1947) Types of polyploids: their classification and significance. *Advances in Genetics* **1**, 403–429.

STEWART, C.N., HALFHILL, M.D. & WARWICK, S.I. (2003) Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews Genetics* **4**, 806–817.

SUDA, J. (2005) Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa* **1**, 46–48.

SZCZECIŃSKA, M., ŁAZARSKI, G., BILSKA, K. & SAWICKI, J. (2017) The complete plastid genome and nuclear genome markers provide molecular evidence for the hybrid origin of *Pulsatilla* × *hackelii* Pohl. *Turkish Journal of Botany* **41**, 329–337.

SZCZECIŃSKA, M., SRAMKO, G., WOŁOSZ, K. & SAWICKI, J. (2016) Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe. *Plos one* **11**, e0151730.

TAMURA, M. (1993) *Ranunculaceae*. In *Flowering Plants · Dicotyledons* (ed. K. KUBITZKI, J.G. ROHWER & V. BITTRICH), s. 563–583. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

THOMPSON, J. D., GAUDEUL M. & DEBUSSCHE M., (2010) Conservation Value of Sites of Hybridization in Peripheral Populations of Rare Plant Species. *Conservation Biology* **24**, 236–245.

TODAKA, D., SHINOZAKI K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., (2015) Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. *Frontiers in Plant Science* **6**

TODESCO, M., PASCUAL, M.A., OWENS, G.L., OSTEVIK, K.L., MOYERS, B.T., HÜBNER, S., HEREDIA, S.M., HAHN, M.A., CASEYS, C., BOCK, D.G. & RIESEBERG, L.H. (2016) Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications* **9**, 892–908.

TORVIK, S.E., BORGEN, L. & BERG, R.Y. (1998) Aspects of reproduction in *Pulsatilla pratensis* in Norway. *Nordic Journal of Botany* **18**, 385–391.

TORZEWSKI, KAROL. OCCURRENCE OF PULSATILLA HYBRIDS IN THE POLISH FLORA. *STECIANA*, 2018, 22: 123-127.

TURCHETTO, C.e, A. L. SEGATTO A., BEDUSCHI J., BONATTO S. L. & Loreta B. FREITAS, 2015. Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB PLANTS* **7**

TUROŇOVÁ, D., HAMERSKÝ, R. & ONDRÁČEK, Č. (2012) Koniklec otevřený – mírně optimistická zpráva o stavu druhu [online]. *Ochrana přírody*. [Cit. 8. dubna 2021]. Dostupné z: https://www.casopis.ochranaprirody.cz/vyzkum-a-dokumentace/koniklec-otevreny-mirne-optimisticka-zprava-o-stavu-druhu/

UNGERER, M.C., BAIRD, S.J.E., PAN, J. & RIESEBERG, L.H. (1998) Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 11757–11762.

UOTILA, P. (1969) Ecology and area of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. in Finland. *Annales Botanici Fennici* **6**, 105–111.

VALERA, J., RIVERA D., MATILLA-SÉIQUER G., RIVERA-OBÓN D. J., C.-A. OCETE, R. OCETE, J. NAVARRO, P. JIMÉNEZ, R. GONZÁLEZ, J. A. RAMÍREZ, J. M. MORENO, J. J. MARTÍNEZ & C. OBÓN, (2024) Insights into Medieval Grape Cultivation in Al-Andalus: Morphometric, Domestication, and Multivariate Analysis of *Vitis vinifera* Seed Types. *Horticulturae* **10**,

VEGA, U. & FREY, K.J. (1980) Transgressive segregation in inter and intraspecific crosses of barley. *Euphytica* **29**, 585–594.

VERBERNE, M. C., VERPOORTE R., BOL J. F., MERCADO-BLANCO J. & M. LINTHORST H. J., (2000) Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology* **18**, 779–783.

VICO, G., MANZONI S., NKURUNZIZA L., MURPHY K. & WEIH M., (2016) Trade-offs between seed output and life span – a quantitative comparison of traits between annual and perennial congeneric species. *New Phytologist* **209**, 104–114.

VÍT, P., WOLFOVÁ, K., URFUS, T., TÁJEK, P. & SUDA, J. (2014) Interspecific hybridization between rare and common plant congeners inferred from genome size data: assessing the threat to the Czech serpentine endemic *Cerastium alsinifolium*. *Preslia* **86**, 95–117.

VÍT, P., DOUDA J., KRAK K., HAVRDOVÁ A. & MANDÁK B., (2017) Two new polyploid species closely related to *Alnus glutinosa* in Europe and North Africa – An analysis based on morphometry, karyology, flow cytometry and microsatellites. *TAXON* **66**, 567–583.

VÍTOVÁ, J., VÍT, P. & SUDA, J. (2015) Rare occurrence of reciprocal hybridization in a sympatric population of the Czech stenoendemic *Dianthus arenarius* subsp. *bohemicus* and widespread *D. carthusianorum*. *Preslia* **87**, 329–345.

VYHLÁŠKA č. 395/1992 Sb. Vyhláška ministerstva životního prostředí České republiky ze dne 11. června 1992, kterou se provádějí některá ustanovení zákona České národní rady č. 114/1992 Sb., ochraně přírody a krajiny [online]. [Cit. 25. dubna 2021]
Dostupné z: https://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/7698185C778DA46FC125654B0044DDBC/%24file/V%20395_1992.pdf

VRÁNA, J., CÁPAL P., BEDNÁŘOVÁ M. & DOLEŽEL J., (2014) Flow Cytometry in Plant Research: A Success Story *Applied Plant Cell Biology: Cellular Tools and Approaches for Plant Biotechnology* 395–430.

WAGNER, W.H. (1970) Biosystematics and evolutionary noise. *Taxon* **19**, 146–151.

WALKOWIAK, S., GAO L., MONAT C., HABERER G., KASSA M. T., BRINTON J., RAMIREZ-GONZALEZ R. H., KOLODZIEJ M. C., DELOREAN E., THAMBUGALA D., KLYMIUK V., BYRNS B., GUNDLACH H., BANDI V., SIRI J. N., NILSEN K., AQUINO C., HIMMELBACH A., COPETTI D., BAN T., VENTURINI L., BEVAN M., CLAVIJO B., KOO D.-H., ENS J., WIEBE K., N'DIAYE A., FRITZ A. K., GUTWIN C., FIEBIG A., FOSKER Ch. FU, B. X., ACCINELLI G. G., GARDNER K. A., FRADGLEY N., GUTIERREZ-GONZALEZ J., HALSTEAD-NUSSLOCH G., HATAKEYAMA M., KOH Ch. S., DEEK J., COSTAMAGNA A. C., FOBERT P., HEAVENS D., KANAMORI H., KAWAURA K., KOBAYASHI F., KRASILEVA K., KUO T., MCKENZIE N., MURATA K., NABEKA Y., PAAPE T., PADMARASU S., PERCIVAL-ALWYN L., KAGALE S., SCHOLZ U., SESE J., JULIANA P., SINGH R., SHIMIZU-INATSUGI R., SWARBRECK D., COCKRAM J., BUDAK H., TAMESHIGE T., TANAKA T., TSUJ H. I, WRIGHT J., WU J., STEUERNAGEL B., SMALL I., CLOUTIER S., KEEBLE-GAGNÈRE G., MUEHLBAUER G., TIBBETS J., NASUDA S., MELONEK J., HUCL P. J., SHARPE A. G., CLARK M., LEGG E., BHARTI A., LANGRIDGE P., HALL A., UAUY C., MASCHER M., KRATTINGER S. G., HANDA H., SHIMIZU K. K., DISTELFELD A., CHALMERS K., KELLER B., MAYER K. F. X., POLAND J., STEIN N., MCCARTNEY C. A., SPANNAGL M., WICKER T. & POZNIAK C. J., (2020) Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding. *Nature* **588**, 277–283.

WAN, S., QIN P., LIU J. & ZHOU H., (2009) The positive and negative effects of exotic *Spartina alterniflora* in China. *Ecological Engineering* **35**, 444–452.

WANG, X.-R., SZMIDT, A.E. & SAVOLAINEN, O. (2001) Genetic composition and diploid hybrid speciation of a high mountain pine, *Pinus densata*, native to the Tibetan Plateau. *Genetics* **159**, 337-346.

WANG, Z., JIANG, Y., BI, H., LU, Z., MA, Y., YANG, X., CHEN, N., TIAN, B., LIU, B., MAO, X., MA, T., DIFAZIO, S.P., HU, Q., ABBOTT, R.J. & LIU, J. (2021) Hybrid speciation via inheritance of alternate alleles of parental isolating genes. *Molecular Plant* **14**, 208–222.

WARSCHEFSKY, E., PENMETSA, R.V., COOK, D.R. & VON WETTBERG, E.J.B. (2014) Back to the wilds: Tapping evolutionary adaptations for resilient crops through systematic hybridization with crop wild relatives. *American Journal of Botany* **101**, 1791–1800.

WEISSMANN, S., FELDMAN, M. & GRESSEL, J. (2005) Sequence evidence for sporadic intergeneric DNA introgression from wheat into a wild *Aegilops* species. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 2055–2062.

WELLS, T.C.E. & BARLING, D.M. (1971) *Pulsatilla vulgaris* Mill. (*Anemone Pulsatilla* L.). *The Journal of Ecology* **59**, 275-292.

WENNSTRÖM, A. & ERICSON, L. (1991) Variation in disease incidence in grazed and ungrazed sites for the system *Pulsatilla pratensis* - *Puccinia pulsatillae*. *Oikos* **60**, 35–39.

WILDEMAN, A.G. & STEEVES, T.A. (1982) The morphology and growth cycle of *Anemone patens*. *Canadian Journal of Botany* **60**, 1126–1137.

WINGË, Ö. (1917) The chromosomes: their number and general importance. *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlesberg* **13**, 131–275.

WOLF, D.E., TAKEBAYASHI, N. & RIESEBERG, L.H. (2001) Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology* **15**, 1039–1053.

WOOD, T.E., TAKEBAYASHI, N., BARKER, M.S., MAYROSE, I., GREENSPOON, P.B. & RIESEBERG, L.H. (2009) The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13875–13879.

XIA, H.-B., WANG, W., XIA, H., ZHAO, W. & LU, B.-R. (2011) Conspecific crop-weed introgression influences evolution of weedy rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) across a geographical range. *Plos one* **6**, 1-11.

XING, G., QU, L., ZHANG, W., ZHANG, Y., YUAN, X. & LEI, J. (2020) Study on interspecific hybridization between tulip cultivars and wild species native to China. *Euphytica* **216**, 1-17.

YAKIMOWSKI, S.B. & RIESEBERG, L.H. (2014) The role of homoploid hybridization in evolution: A century of studies synthesizing genetics and ecology. *American Journal of Botany* **101**, 1247–1258.

ŻABICKA, J., ŻABICKI P. , SŁOMKA A., SLIWINSKA E., JĘDRZEJCZYK-KORYCIŃSKA M., NOWAK T., MIGDAŁEK G., KWIATKOWSKA M. & KUTA E., (2022) Re-introduction of an extinct population of Pulsatilla patens using different propagation techniques. *Scientific Reports* **12**,

ZAHRADNÍKOVÁ, J. & HARČARIKOVÁ, L. (2012) Výsadby a výsevy vzácných a ohrožených druhů rostlin in-situ v Krkonošském národním parku. *Opera Corcontica* **49**, 121–134.

ZHOU, G., CHEN, Y., YAO, W., ZHANG, C., XIE, W., HUA, J., XING, Y., XIAO, J. & ZHANG, Q. (2012) Genetic composition of yield heterosis in an elite rice hybrid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 15847–15852.

ZHOU, R., GONG, X., BOUFFORD, D., WU, C.-I. & SHI, S. (2008) Testing a hypothesis of unidirectional hybridization in plants: Observations on *Sonneratia*, *Bruguiera* and *Ligularia*. *BMC Evolutionary Biology* **8**, 149.

ZIELIŃSKA, K.M., KIEDRZYŃSKI, M., GRZYL, A. & REWICZ, A. (2016) Forest roadsides harbour less competitive habitats for a relict mountain plant (*Pulsatilla vernalis*) in lowlands. *Scientific Reports* **6**, 1-11.

ZIRKLE, C. (1935) *The beginnings of plant hybridization* [online]. University of Pennsylvania Press, Philadelphia. Dostupné z: www.jstor.org/stable/j.ctv4s7krg

ZHANG, L, LIU L., FANG Z., SHEN W., DAI Y,. JIALIANG J. R., & LIU B., (2023) Fitness changes in wild soybean caused by gene flow from genetically modified soybean. *BMC Plant Biology* **23**

ZHOU, L., YIN S., AN S., YANG W., DENG O., XIE D., JI H., OUYANG Y & CHENG X., (2014) *Spartina alterniflora* Invasion Alters Carbon Exchange and Soil Organic Carbon in Eastern Salt Marsh of China. *CLEAN - Soil Air Water* **43**, 569-576.

ZIELIŃSKA, K. M., KAŹMIERCZAK A. & MICHALSKA E., (2021) Short-term cell death in tissues of Pulsatilla vernalis seeds from natural and ex situ conserved populations. *Scientific Reports* **11**,