

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra Botaniky



**Vztah pylové viability, ploidie a velikosti genomu u
středoevropských zástupců rodu *Ornithogalum* (snědek)**

Diplomová práce

Autor: **Bc. Gabriela Pravcová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **RNDr. Michal Hroneš, Ph.D.**

Olomouc 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Michala Hroneše, Ph.D. a jen s použitím citovaných literárních zdrojů a vlastních dat.

V Olomouci

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především vedoucímu své diplomové práce RNDr. Michalu Hronešovi, Ph.D. za veškerou pomoc, cenné rady, velkou trpělivost a motivaci, kterou mi poskytoval nejen při vzniku této práce, ale i během celého studia. Také děkuji své rodině za to, že mi vždy byla a stále je velkou oporou.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Gabriela Pravcová

Název práce: Vztah pylové viability, ploidie a velikosti genomu u středoevropských zástupců rodu *Ornithogalum*

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc

Vedoucí práce: RNDr. Michal Hroneš, Ph.D., katedra botaniky

Rok obhajoby: 2021

Abstrakt:

Rod *Ornithogalum* představuje taxonomicky složitý a cytologicky velmi rozmanitý rod, ve kterém je běžným jevem polyploidie i hybridizace. Oba tyto jevy ovlivňují velikost genomu a schopnost tvořit viabilní pyl. Cílem práce bylo u středoevropských zástupců tohoto rodu stanovit velikost genomu a míru pylové viability. Testováno bylo, zda jsou mikroevoluční procesy, jako polyploidie a hybridizace, spojeny se změnami pylové viability. Velikost genomu byla zjišťována pomocí průtokové cytometrie a viabilita pylu byla odhadována za pomoci metody barvení pylových zrn modifikovaným Alexandrovým barvivem. Středoevropské zástupce tohoto rodu lze rozdělit do tří podrodů *Beryllis*, *Myogalum* a *Ornithogalum*. V rámci podrodu *Beryllis* byla zajímavým zjištěním menší velikost genomu u *O. brevistylum* oproti druhému taxonu z tohoto podrodu *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum*. U obou taxonů byly také prokázány na základě údajů z literatury odlišné počty chromozomů, ovšem zajímavostí je, že se nich uvádí stejná ploidní úroveň, a sice diploidní. Pravděpodobně se jedná o taxony náležící k odlišným skupinám v rámci podrodu *Beryllis* a je nezbytné jejich další studium. Stejná ploidní úroveň byla zjištěna také u taxonů *O. boucheanum* a *O. mutans* z podrodu *Myogalum*, a to tetraploidní. V podrodu *Ornithogalum* bylo rozlišeno šest ploidních úrovní od diploidní po heptaploidní. V rámci celého studovaného souboru jedinců v této práci byl prokázán vztah zmenšování monoploidní velikosti genomu s rostoucí ploidní úrovní, tzv. „genome downsizing“. V rámci celého studované souboru jedinců nebyla potvrzena významná závislost viability pylu na velikosti genomu ani na ploidní úrovni rostliny a nebyl prokázán obecně předpokládaný vztah snížení pylové viability u lichých ploidních stupňů a vysoká viabilita u sudých ploidí. Výjimkou je podrod *Ornithogalum*, u kterého se projevil statisticky signifikantní vztah, kdy viabilita klesala s rostoucí ploidí a se zmenšující se monoploidní velikostí genomu. Ploidní úroveň naopak hraje roli v pylové viabilitě u hybridních taxonů, kdy byla u triploidního *O. ×wildtii* prokázána velmi nízká viabilita a zároveň nízká schopnost tvořit

pyl, naopak u tetraploidního *O. ×degenianum* nebyl zaznamenán výrazný pokles viability pylu, ani pokles jeho tvorby. Obecně bylo také potvrzeno, že taxony, které v průměru vykazovaly sníženou viabilitu pylu byly často v těchto hodnotách mnohem variabilnější, nežli taxony s vyšší viabilitou a zároveň byly dosti variabilní ve zjištěných počtech pylových zrn.

Klíčová slova: *Asparagaceae*, hybridizace, polyploidie, průtoková cytometrie, pyl

Počet stran: 70

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Gabriela Pravcová

Title of thesis: Relationship of pollen viability, ploidy and genome size in central European representatives of the genus *Ornithogalum*

Type of thesis: Master's thesis

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc

Supervisor: RNDr. Michal Hroneš, Ph.D., Department of Botany

The year of presentation: 2021

Abstract:

Genus *Ornithogalum* is taxonomically and cytologically very complicated due to commonly occurring polyploidization and hybridization. Both phenomena are affecting genome size and pollen viability. Aim of this thesis was to assess the genome size and the degree of pollen viability of selected representatives of this genus from Central Europe. It further tested if the microevolutionary processes, such as polyploidization and hybridization, are associated with variation in pollen viability. Genome size was investigated by flow cytometry and estimates of degree of pollen viability was assessed by differential pollen staining using modified Alexander's stain. All representatives of genus *Ornithogalum* from Central Europe can be sorted to the three subgenera *Beryllis*, *Myogalum* and *Ornithogalum*. Within subgenus *Beryllis* an interesting find was that *O. brevistylum* has smaller genome size of than *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* despite former species has more chromosomes than the latter based on information from other studies. Moreover, both species the same ploidy level is indicated for both – a diploid. Therefore, these two species probably belong to different groups within subgenus *Beryllis*, and further study is needed. Same ploidy level – a tetraploid – was found also within *O. boucheanum* and *O. nutans* from subgenus *Myogalum*. Six ploidy levels from diploid to heptaploid was determined within subgenus *Ornithogalum*. The relationship of monoploid genome size downsizing with increasing ploidy level was discovered using whole set of analyzed taxa. No significant relationship has been found between pollen viability, genome size and ploidy level. Surprisingly, the generally assumed fact that odd ploidy levels have lowered pollen viability compared to even ploidy levels has not been confirmed. An exception is the subgenus *Ornithogalum* where pollen viability decreased with increasing ploidy level and decreasing monoploid genome size. Indeed, ploidy level play role in degree of pollen viability within hybrid species, where triploid *O. ×wildtii* is characterized by very low

degree of pollen viability and has a low ability to produce pollen grains at the same time, whereas in tetraploid *O. ×degenianum* has been observed no significant decrease of pollen viability and even no significant decrease of pollen grains production. Generally, using the whole set of taxa, it was proved that species with lower pollen viability were more variable in degrees of pollen viability and at the same time in number of pollen grains.

Keywords: *Asparagaceae*, flow cytometry, hybridization, pollen, polyploidy

Number of pages: 70

Number of appendices: 1

Language: Czech

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Velikost genomu.....	1
1.2	Polyploidie.....	3
1.3	Pylová viabilita.....	7
1.4	Rod <i>Ornithogalum</i>	9
1.4.1	<i>Ornithogalum umbellatum</i> agg.	10
1.4.2	Hybridní taxony.....	12
1.4.3	Velikost genomu a pylová viabilita – současný stav poznání	13
2	Cíle práce	14
3	Materiál a metody	15
3.1	Rostlinný materiál	15
3.2	Stanovení velikosti genomu a DNA-ploidní úrovně	16
3.3	Stanovení pylové viability a absolutního počtu pylových zrn.....	16
3.4	Statistické zpracování dat.....	17
4	Výsledky	18
4.1	Velikost genomu a DNA ploidní úroveň.....	18
4.1.1	Podrod <i>Beryllis</i>	23
4.1.2	Podrod <i>Myogalum</i>	24
4.1.3	Podrod <i>Ornithogalum</i>	25
4.1.4	Hybridní taxony.....	27
4.2	Pylová viabilita.....	29
4.2.1	Podrod <i>Beryllis</i>	30
4.2.2	Podrod <i>Myogalum</i>	30
4.2.3	Podrod <i>Ornithogalum</i>	31
4.2.4	Hybridní taxony.....	34
4.2.5	Srovnání pylové viability na jednotlivých ploidních úrovních.....	35
4.2.6	Absolutní počty pylových zrn	36
4.2.7	Vztah pylové viability, velikosti genomu a ploidní úrovně.....	38
5	Diskuse	43
5.1	Velikost genomu, DNA ploidní úroveň, pylová viabilita a jejich variabilita v taxonomických skupinách.....	43
5.2	Vztah mezi viabilitou, velikostí genomu a ploidí.....	51
5.3	Vliv hybridizace na viabilitu pylu	53
6	Závěr	55
7	Literatura	56

Seznam obrázku

Obrázek 1	Mapa lokalit studovaných populací	15
Obrázek 2	Příklady výstupů z průtokového cytometru	19
Obrázek 3	Velikost genomu u studovaného souboru taxonů zástupců rodu <i>Ornithogalum</i>	20
Obrázek 4	Korelace ploidního stupně a monoploidní velikosti genomu.....	21
Obrázek 5	Absolutní velikost genomu <i>O. brevistylum</i> a <i>O. pyrenaicum</i> subsp. <i>sphaerocarpum</i>	23
Obrázek 6	Absolutní velikost genomu <i>O. boucheanum</i> a <i>O. nutans</i>	24
Obrázek 7	Absolutní velikost genomu taxonů z podrodu <i>Ornithogalum</i>	26
Obrázek 8	Monoploidní velikost genomu u komplexu <i>Ornithogalum umbellatum</i> agg.	27
Obrázek 9	Přehled velikosti genomu hybridních taxonů a jejich rodičů.....	28
Obrázek 10	Pylová viabilita u studovaného souboru jedinců zástupců rodu <i>Ornithogalum</i>	29
Obrázek 11	Pylová viabilita taxonů <i>O. brevistylum</i> a <i>O. pyrenaicum</i> subsp. <i>sphaerocarpum</i>	30
Obrázek 12	Pylová viabilita taxonů <i>O. boucheanum</i> a <i>O. nutans</i>	31
Obrázek 13	Pylová viabilita u taxonů z podrodu <i>Ornithogalum</i>	32
Obrázek 14	Pylová zrna vybraných taxonů rodu <i>Ornithogalum</i>	33
Obrázek 15	Pylová viabilita u hybridních taxonů <i>O. ×wildtii</i> a <i>O. ×degenianum</i>	34
Obrázek 16	Přehled pylové viability u různých ploidií	35
Obrázek 17	Počet pylových zrn u studovaných zástupců rodu <i>Ornithogalum</i>	37
Obrázek 18	Vztah velikosti genomu a pylové viability rodu <i>Ornithogalum</i>	37
Obrázek 19	Vztah ploidie, velikosti genomu, pylové viability a počtu pylových zrn.....	39
Obrázek 20	Vztah pylové viability a počtu pylových zrn	40
Obrázek 21	Vztah velikosti genomu, ploidie a pylové viability u podrodu <i>Ornithogallum</i>	41
Obrázek 22	Vztah velikosti genomu, ploidie a pylové viability u <i>Ornithogalum umbellatum</i> agg.	42

Seznam tabulek

Tabulka 1	Velikost genomu u středoevropských zástupců rodu <i>Ornithogalum</i>	22
Tabulka 2	Dunnův test – absolutní velikost genomu taxonů <i>O. umbellatum</i> agg.	26
Tabulka 3	Dunnův test – monoploidní velikosti genomu taxonů <i>O. umbellatum</i> agg.	26
Tabulka 4	Monoploidní velikost genomu <i>O. umbellatum</i> agg.	27
Tabulka 5	Dunnův test – pylová viabilita taxonů <i>O. umbellatum</i> agg.	32
Tabulka 6	Dunnův test – pylová viabilita tetraploidních taxonů rodu <i>Ornithogalum</i>	36
Tabulka 7	Pylová viabilita ve vztahu ke konkrétním taxonům	36
Tabulka 8	Absolutní počet pylových zrn.....	38

Přílohy

Příloha 1 Přehled lokalit

1 Úvod

1.1 Velikost genomu

Velikost genomu je u rostlin klíčovým a široce využívaným znakem biologické rozmanitosti, který je používán pro vyjádření množství DNA obsažené v buněčném jádře (Hanson et al. 2001). V literatuře často není pojem „velikost genomu“ stabilizován a je používán v různých významech. Buď se používá pro obsah DNA v kompletní chromozomové sadě v somatických buňkách, nebo pro obsah DNA v jedné, tedy haploidní sadě chromozomů. Proto Greilhuber et al. (2005) navrhuje jednotnou terminologii, kde můžeme rozlišit dva základní pojmy pro popis velikosti genomu. Prvním je „holoploidní velikost genomu“ zkráceně též „C-value“ (C-hodnota), který charakterizuje obsah DNA v celé chromozomové sadě charakteristické pro daný organismus, a to bez ohledu na ploidní stupeň. Druhým je „monoploidní velikost genomu“, zkráceně též „Cx-value“, kde „x“ značí ploidii, který udává somatický obsah DNA, jež je vydělen stupněm ploidie. Pro vyjádření velikosti genomu se v literatuře také velmi často používá pojem 1C hodnota, která charakterizuje množství DNA v haploidní sadě chromozomů (v gametách) a je v podstatě shodná s termínem holoploidní velikost genomu. Bývá zpravidla udávána v pikogramech či v počtu párů bází, kde 1 pg = 978 Mbp (Doležel et al. 2003). Pro diploidní a autopolyploidní druhy lze somatický obsah DNA vydělený stupněm ploidie použít pro přesný odhad velikosti genomu, ale pro taxony, které obsahují genomy různé velikosti, například pro diploidy vzniklé hybridizací či pro allopolyploidy, poskytuje tento vzorec pouze průměrný odhad velikosti genomu. U polyploidních druhů jsou takto odhadované velikosti genomu vždy menší, než je hodnota 1C. 2C hodnota poté vyjadřuje množství DNA v somatických buňkách. Obecně je za velikost genomu považována právě hodnota 1C (Bennett et al. 2000, Soltis et al. 2003, Greilhuber et al. 2005, Pospíšilová 2012), ale pojetí tohoto termínu je v literatuře stále značně variabilní.

Rostliny vynikají svou obrovskou rozmanitostí ve velikosti genomu, jehož hodnota má až 2400násobný rozsah od nejmenšího po největší genom. Mezi cévnatými rostlinami byl nejmenší genom zjištěn u druhu *Genlisea tuberosa* z čeledi *Lentibulariaceae* (1C = 61 Mbp; Fleischmann et al. 2014), naopak největší genom byl po dlouhou dobu přiřazován geofytnímu druhu *Fritillaria assyriaca* z čeledi *Liliaceae* (1C = 124 597,2 Mbp; Bennett & Smith 1976). Později však byly zjištěny i větší genomy u jiných geofytních rostlin z čeledi *Melanthiaceae*, a to konkrétně u *Trillium hageae* (1C = 129 536,1 Mbp; Zonneveld 2010) a *Paris japonica* (1C =

148 880,9 Mbp; Pellicer et al. 2010). Obecně mají větší genomy hlavně jednoděložné rostliny a velké genomy jednoznačně převládají u geofytů, naopak malé genomy jsou typické například pro mechorosty (Grime & Mowforth 1982, Veselý et al. 2012, Pellicer et al. 2018). Pro konkrétní druh bývá velikost genomu zpravidla charakteristická a konstantní, ale často se může výrazně lišit mezi druhy, a to i v rámci jednoho rodu. Při studiu rostlin má velikost genomu mnohá uplatnění. Může například sloužit pro určení hybridních či polyploidních taxonů a jejich rodičů. V některých případech může sloužit také jako rozlišovací znak mezi taxony, k jejichž rozlišení by nestačily morfologické znaky. Lze říci, že se jedná o velmi důležitý taxonomický znak definující biologický druh (Bennett et al. 2000, Heslop-Harrison & Schwarzacher 2011, Pospíšilová 2012, Schwarzová 2012, Veselý et al. 2012, Pellicer et al. 2018).

Množství DNA v buněčném jádře může u rostlin ovlivnit některé jejich vlastnosti. Může například omezit maximální výšku rostliny, rychlost růstu, generační dobu či přítomnost druhu v určitém typu niky (Veselý et al. 2012, Pellicer et al. 2018). Extrémní variabilita ve velikosti genomu je u rostlin způsobena především repetitivními úseky nekódující DNA, která je zpravidla generována transponovatelnými prvky (transpozony) či retroelementy (Soltis et al. 2015). Druhým mechanismem, který významně ovlivňuje a vede ke značné variabilitě ve velikosti genomu mezi rostlinami je polyploidie, která zvětšuje genom rostlin zmnožením počtu chromozomových sad v jádře buněk a způsobuje také akumulaci retroelementů (Wendel et al. 2002). Velké genomy jsou velké tedy hlavně proto, že jsou nasyceny těmito nekódujícími úseky DNA a tím pádem mají rostlinné druhy, které je nesou, značné náklady spojené s akumulací a replikací této DNA. Buněčný cyklus u těchto druhů trvá delší dobu a proto dochází (za stejných ekologických podmínek) u rostlin s velkými genomy i k pomalejšímu růstu než u těch, které mají genomy menší. Pravděpodobně i replikace DNA je energeticky mnohem náročnější u velkých genomů. Na základě pozorování se také ukazuje, že rostliny s menšími genomy mají mnohem širší ekologické niky. Zástupci s velkými genomy se udržují spíše na stanovištích, kde nepůsobí silné kompetiční tlaky a kde se nenachází stresové podmínky. Úspěšnými kompetitory bývají hlavně na stanovištích s dostatkem živin, hlavně dusíku a fosforu. V místech, kde je těchto živin nedostatek může docházet k jejich negativní selekci. Z toho vyplývá, že velké genomy mohou být obecně brány za evolučně nevýhodné (Wendel et al. 2002, Knight et al. 2005, Veselý et al. 2012, Pellicer et al. 2018).

1.2 Polyploidie

Polyploidie je stav, kdy se v jádře somatických buněk nachází více než dvě kompletní sady chromozomů. K tomuto stavu dochází procesem polyploidizace, tedy duplikací, triplikací či vyšším stupněm zmnožení počtu chromozomových sad. Podle toho, kolik chromozomových sad se v jádře buněk nachází, označujeme daný polyploidní organismus jako triploidní, pokud má tři sady, tetraploidní se čtyřmi sadami, pentaploidní s pěti atp. Můžeme rozlišit dva základní typy polyploidů. Prvním typem jsou autopolyploidi, což jsou polyploidní druhy, které vznikají buď somatickou polyploidizací, splynutím neredukovaných gamet v jednotlivých populacích nebo křížením mezi různými ekotypy či varietami v rámci jednoho druhu. Druhým typem jsou allopolyploidi, jejichž původ je následkem interspecifické hybridizace. Dříve se předpokládalo, že se v přírodě více setkáme s allopolyploidními druhy, avšak pozdější studie zabývající se polyploidii, které ve své práci shrnují například Soltis et al. (2007) ukazují, že výskyt autopolyploidů byl dosti podhodnocený a odhady frekvence jejich výskytu v přírodních populacích se dosti zvýšily. Autopolyploidie má dle současných studií významnou roli ve speciaci rostlin (Ramsey & Schemske 1998, Comai 2005, Soltis et al. 2007, Barker et al. 2015).

Polyploidie je považována za velmi významný mechanismus adaptace a speciace krytosemenných rostlin (Ramsey & Schemske 1998, Leitch & Bennett 2004, Adams & Wendel 2005, Soltis et al. 2015). Leitch & Leitch (2012) udávají, že přibližně 15 % všech speciálních událostí u krytosemenných rostlin vzniklo procesem polyploidie. Je odhadováno, že asi 35–70 % krytosemenných rostlin je polyploidních (Ramsey & Schemske 1998, Soltis et al. 2015). Genomická data ukazují, že v průběhu evoluce docházelo k procesům polyploidizace mnohokrát opakovaně. Masterson (1994) odhaduje, že přibližně u 70 % krytosemenných rostlin došlo v průběhu historie k polyploidizační události, avšak Wood et al. (2009) ve své práci udává, že polyploidní původ mají možná všechny současné rostlinné druhy. Jeho myšlenku také podporuje Jiao et al. (2011), kteří v jejich studii uvádějí, že většina linií krytosemenných rostlin vykazuje alespoň jednu či více historických událostí polyploidizace. Zastávají názor, že během evoluce došlo ke dvěma událostem duplikace celého genomu, přičemž k první došlo u společného předka všech semenných rostlin a ke druhé u společného předka všech krytosemenných rostlin. Bylo například prokázáno, že i některé druhy, které jsou považovány za diploidní jsou ve skutečnosti paleopolyploidní, což znamená, že u nich došlo v průběhu historie k polyploidizačním procesům a následně k procesu diploidizace (viz níže). Mezi tyto druhy patří i modelový druh s malým genomem *Arabidopsis thaliana*, jehož celý genom byl

osekvenován a vykazuje důkazy o nejméně třech historických duplikacích celého genomu (Leitch & Bennett 2004, Adams & Wendel 2005, Leitch & Leitch 2012, Soltis et al. 2015).

U krytosemenných rostlin tedy není výskyt polyploidie nic vzácného, stejně tak je tomu i u skupiny plavuní (*Lycopodiophyta*) a kapradin (*Monilophyta*). Naopak ve skupině nahosemenných rostlin je tento jev, velmi vzácný. Můžeme zde najít ale i několik výjimek, a to především v řádu *Gnetales*, kde se v rodu *Ephedra* vyskytuje až 44 % druhů s vyšší ploidní úrovní. Dále několik polyploidních druhů můžeme nalézt například v čeledi *Cupressaceae* a jeden triploidní druh se nachází i mezi cykasy. Z jakého důvodu tento proces u nahosemenných nehraje příliš velkou roli není doposud zcela jasné. Jedno z možných vysvětlení, které ve své práci popisují Leitch & Leitch (2012), se přisuzuje tvorbě neredukovaných gamet. Právě ta podmiňuje častý vznik polyploidních taxonů a je pravděpodobně i primární příčinou jejich vzniku (Ramsey & Schemske 1998). Může docházet ke splývání redukované a neredukované gamety, což vede k následnému vzniku triploidních či tetraploidních jedinců, skrz které je poté možný vznik i vyšších ploidních úrovní. Obecně takto vzniklí triploidní jedinci bývají sterilní a jejich role spočívá většinou v tom, že slouží jako „meziprodukty“ či „mosty“ při tvorbě jedinců s vyšší ploidí. Naopak tetraploidní jedinci, jimž daly vznik dvě neredukované gamety jsou potenciálně stabilní (Comai 2005). Nejčastější příčinou tvorby neredukovaných gamet jsou chyby, které nastanou v průběhu meiózy. Výsledkem je gameta obsahující počet chromozomů jako běžné somatické buňky, označovaná jako „2n gameta“ (Ramsey & Schemske 1998). Vznik neredukovaných gamet se mezi krytosemennými rostlinami pohybuje v průměru kolem 0,56 % u nehybridních taxonů, ale u hybridních je to mnohem více a to kolem 27 %. Avšak u nahosemenných je produkce těchto gamet velice vzácná. Leitch a Leitch (2012) zmiňují pouze jedinou studii (Pichot & El Maâtaoui 2000), která potvrzuje vznik neredukovaných gamet u nahosemenných, a to u druhu *Cupressus dupreziana* z čeledi *Cupressaceae* (Ramsey & Schemske 1998, Leitch & Leitch 2012).

V rostlinných populacích je často produkce 2n gamet geneticky zakotvená či může být velmi ovlivněna i environmentálními faktory vnějšího prostředí, kde největší efekt má především teplota, respektive její kolísání a dále také například stres způsobený nedostatkem vody či živin nebo choroba (Ramsey & Schemske 1998, Fawcett & Van de Peer 2010, Soltis et al. 2015). Ke vzniku polyploidních gamet mohou vést také chyby vzniklé v průběhu meiózy, procesem endoreduplikace, tedy replikace DNA bez následného jaderného či buněčného dělení. Pokud dojde v somatických buňkách zárodečné linie k chybné expresi genů, které se podílí na regulaci endoreduplikace, dojde ke znásobení počtu chromozomů v těchto buňkách (endopolyploidii),

následně k vytvoření polyploidního sporofytu, čímž se takto vzniklá polyploidie dostane do dalších generací (Ramsey & Schemske 1998, Leitch & Leitch 2012). Nový polyploidní jedinec může vzniknout i když k endoreduplikaci dojde v somatických buňkách, které tvoří rostlinná pletiva, jež se následně podílí na vegetativní reprodukci rostlin. Příkladem takto vzniklého polyploidního druhu může být *Primula kewensis*, který vznikl z fertilního tetraploidního výhonu na jinak sterilní hybridní diploidní rostlině (Newton & Pellew 1929, Ramsey & Schemske 1998, Leitch & Leitch 2012). Se somatickou polyploidii se lze běžně u krytosemenných rostlin setkat (Ramsey & Schemske 1998, Leitch & Leitch 2012).

Co se týče vztahu mezi velikostí genomu a ploidním stupněm, dalo by se očekávat, že C hodnota, tedy množství DNA v nereplikovaném jádře buňky, bude u polyploidních druhů o násobek ploidního stupně vyšší než u jejich diploidních předků a že velikost monoploidního genomu, tedy $1Cx$, bude stejná na všech úrovních ploidie. Často je však pozorováno, že je C-hodnota u polyploidů nižší než tento násobek. Tedy C-hodnota se nezvyšuje v přesném poměru se stupněm ploidie a velikost genomu má tendenci s rostoucí ploidií spíše klesat. Vzniku polyploidů tedy následuje ztráta DNA neboli zmenšení genomu, a ukazuje se, že je to poměrně rozšířený jev značného biologického významu. Tento fenomén se označuje jako „genome downsizing“. Některé studie ukázaly, že po polyploidizaci dochází k eliminaci nekódujících sekvencí DNA, které představují velkou část genomu organismů, či může docházet ke ztrátám chromozomových segmentů (Leitch & Bennett 2004, Pellicer et al. 2018). Velkou zajímavostí je zjištění, že velikost genomu (1C hodnota) hraje také důležitou roli v tom, v jakém rozsahu dojde ke snížení množství DNA u polyploidních druhů. Zjistilo se totiž, že taxony na diploidní úrovni s větší velikostí genomu vykazovaly při polyploidizaci větší redukci genomu než taxony, které měly v diploidním stavu genomy menší (Leitch & Bennett 2004). Leitch & Bennett (2004) uvádějí, že toto snižování velikosti genomu s rostoucí ploidií může být například způsobeno jednoduše selekcí pro nižší C-hodnotu, kdy mohou být zvýhodněni jedinci se sníženým množstvím DNA. Zároveň zdůrazňují, že tato selekce závisí samozřejmě i na mnoha dalších faktorech, jako je životní strategie druhu či jeho ekologické nároky. Menší genom je pro rostliny výhodnější i z toho důvodu, že větší genomy jsou spojeny s vyšším příjmem živin jako je hlavně dusík a fosfor, které potřebují rostliny pro tvorbu nukleových kyselin. Často jsou právě tyto prvky v mnoha prostředích limitující (Leitch & Bennett 2004, Dodsworth et al. 2016, Pellicer et al. 2018). Jev snižování genomu se obvykle vyskytuje hlavně u krytosemenných rostlin. Oproti tomu u skupiny kaprad'orostů (*Monilophyta*) existuje lineární vztah mezi počtem

chromozomů a velikostí genomu, který naznačuje, že polyploidie není spojena s podstatným zmenšováním a ztrátou částí genomu (Leitch & Leitch 2012).

Ztráty repetitivních, nekódujících sekvencí DNA v důsledku polyploidizace mohou vést až k návratu zpět do původního diploidního stavu. Tento proces se nazývá diploidizace a mechanismy, které diploidizaci způsobují, jsou u krytosemenných rostlin často druhově specifické. Je však nutno poznamenat, že tyto diploidizační procesy nevedou k návratu polyploidních druhů zpět do původního diploidního stavu, ale zůstala u nich zachována rozsáhlá reorganizace celého genomu, která zahrnuje opakované ztráty repetitivní DNA, přeskupení chromozomů či ztráty některých genů. Právě tyto změny činí diploidizovaného polyploida jedinečným a druh tak může získat například nové možnosti adaptace k prostředí či může dojít k určitým morfologickým, biochemickým či fyziologickým změnám. Inovace spojené s duplikací genomu a s procesem diploidizace mimo jiné významně přispěly k evolučnímu úspěchu krytosemenných rostlin (Comai 2005, Jiao et al. 2011, Soltis et al. 2015, Dodsworth et al. 2016).

Značný úspěch polyploidních jedinců je často přičítán jejich zvýšené genetické rozmanitosti ve srovnání s jejich diploidními předky. Tato genetická rozmanitost se může projevovat novými charakteristikami na biochemické, morfologické, fyziologické či ekologické úrovni, a díky ní mohou polyploidi vstupovat i nových nik v porovnání s diploidy. To dává polyploidním taxonům značné evoluční výhody, oproti jejich diploidním předkům (Ramsey & Schemske 1998, Balao et al. 2011, Soltis et al. 2015). Nejčastěji zmiňovanou fenotypovou změnou je takzvaný „gigas efekt“. Jedná se o zvětšení buněk v důsledku znásobení genetického materiálu v buněčném jádře, což má za následek i zvětšení velikosti celé rostliny v porovnání s diploidy (Balao et al. 2011). V důsledku tohoto efektu dochází tedy i ke zvětšení průduchů či vaskulárních buněk a s těmito morfologickými změnami jsou úzce spojeny i změny fyziologické, kdy právě například větší průduchy vedou k rychlejší výměně plynů, či k vyšší fotosyntetické aktivitě, tím pádem i ke změnám v růstové rychlosti, což u polyploidů způsobuje posun v ekologické toleranci a ve zvládnutí stresových podmínek v porovnání s jejich předky (Balao et al. 2011, Soltis et al. 2016, Veselý et al. 2020).

Polyploidní druhy mají oproti diploidům i některé selektivní výhody, které se u nich objevily v důsledku zmnožení kopií genů. Můžeme se u nich setkat například s větším množstvím mutací, které zde najdou uplatnění hlavně díky znásobenému počtu chromozomů a kopií genů, na kterých se mohou vyskytovat. Právě nadbytek genů ale chrání polyploidní druhy před následky škodlivých mutací. Když se mutace objeví na některém genu, je pravděpodobné, že

nedojde ke ztrátě jeho funkce, protože se v organismu nachází více jeho kopií, které ji mohou zajišťovat. Na místě mutace pak může nastat proces subfunkcionalizace či neofunkcionalizace genu, což znamená, že mutovaný gen může získat úplně novou funkci, aniž by ta předchozí v organismu zcela zanikla. Tyto mechanismy jsou úzce spojené s duplikací genomu a zejména u krytosemenných rostlin jsou relativně běžným jevem (Comai 2005, Fawcett & Van de Peer 2010, Dodsworth et al. 2016). Polyploidizace je také spojována s různými reprodukčními strategiemi, jako je například nepohlavní rozmnožování, celoroční životní cyklus, a i vyšší tolerance k samoopylení. Je pravděpodobné, že polyploidizace narušuje systémy nekompatibility s vlastním pylem a vývoj autogamie přímo podporuje. Zjistilo se, že polyploidní mají často vyšší podíl samoopylení, než je tomu u jejich diploidních příbuzných. Polyploidní druhy mají také obecně lépe fixovanou heterozygotnost, tudíž se jejich genetická diverzita v důsledku inbreedingu způsobeného autogamií tolik nesníží, jako je tomu u diploidních druhů, jinými slovy nepodléhají tolik inbrední depresi (Comai 2005, Barringer 2007, Fawcett & Van de Peer 2010, Dodsworth et al. 2016).

Tyto reprodukční strategie (zejména autogamie a nepohlavní rozmnožování) mohou polyploidům poskytovat jisté konkurenční výhody v porovnání s diploidy. Například mohou u polyploidů způsobovat větší toleranci k fragmentaci jejich stanovišť a k narušení populací. Ve srovnání s jejich diploidními předky mohou polyploidní druhy někdy zaujímat také nové či širší ekologické niky, často mohou obsazovat drsnější a nestabilní prostředí. S tím souvisí i větší rozšíření polyploidních druhů ve vyšších nadmořských výškách a ve vyšších zeměpisných šířkách, jako například jejich hojný výskyt v arktických oblastech, oproti jejich diploidním předkům. Veškeré tyto adaptace polyploidů mohou vést až k jejich úspěchu jako invazivních druhů (Fawcett & Van de Peer 2010, Dodsworth et al. 2016, Rice et al. 2019).

1.3 Pylová viabilita

Termín pylová viabilita je obecně používán ve smyslu životnosti/životaschopnosti pylu. Terminologie však není jednotná a v literatuře se pro tento termín nachází velké množství definic. Mnoho autorů používá tento termín v různých významech, ať už se jedná o schopnost pylu klíčit na blizně či v in vitro podmínkách, schopnost vázat určitá barviva nebo schopnost úspěšně oplodit vajíčko, ze kterého následně vzniknou semena. Význam tohoto termínu je obecně velmi široký a může se vztahovat ke kterékoli fázi životního cyklu pylového zrna, a proto je vhodnější nahradit ho jinými termíny, které lépe vystihují konkrétní testovaná kritéria u pylových zrn, jako je klíčivost, barvitelnost či schopnost oplození a tvorba semen. Právě tyto

pojmy mnohem lépe odrážejí skutečnou studovanou vlastnost pylového zrna a jsou úžeji vymezené nežli obecný pojem viabilita. Pylové zrno může mít například schopnost klíčit, avšak k samotnému klíčení nemusí vůbec dojít z důvodu nevhodných podmínek. Stejně tak může vyklíčit, ale už nemusí dojít k oplození vajíčka kvůli určité formě nekompatibility pylového zrna a konkrétní blizny. Například ani nedostatečná tvorba semen po oplození nemusí znamenat nízkou pylovou viabilitu, ale semena se nemusela vytvořit z důvodu nevhodných podmínek (Dafni & Firmage 2000). Jelikož pyl reprezentuje kritickou fázi životního cyklu u rostlin, studium jeho životaschopnosti je významné proto, že má zásadní význam pro efektivní reprodukci rostlin (Shivanna et al. 1991).

Životaschopnost pylu může být testována různými způsoby, avšak některé, jako například pozorování klíčení pylu a růstu pylové láčky *in vitro* či sledování množství semen vzniklých po opylování, mohou být obvykle velmi pracné, časově náročné a obtížně proveditelné a reprodukovatelné. Výhody a nevýhody různých metod k posouzení pylové viability souhrnně porovnávají ve své práci Dafni & Firmage (2000). Nejrychlejší metodou je testování barvitelnosti, což je běžně používaná metoda pro hodnocení pylové viability. Sledování barvitelnosti se používá jako náhrada složitějšího testování skutečné životaschopnosti pylu. Důležité je nezaměňovat pojem barvitelnost a životaschopnost pylu, kdy barvitelnost pylu slouží pouze pro stanovení odhadu pylové viability a je tomu tak i v této práci, kdy se obarvená pylová zrna s obsahem cytoplazmy považují za viabilní, tedy životaschopná.

Chemická barviva reagují s pylovými enzymy a detekují přítomnost neporušeného buněčného obsahu – cytoplazmy (Shivanna et al. 1991, Khatun & Flowers 1995, Peterson et al. 2010). Existuje více možností barvení pylových zrn, například acetokarmínem či barvivem cotton blue. Nevýhodou těchto barviv je, že vůbec nezbarví abortovaná pylová zrna. Proto v této práci byla použita metoda modifikovaného Alexandrova barvení (Peterson et al. 2010), při které dojde ke spolehlivému rozlišení abortovaných a neabortovaných pylových zrn. Cytoplazma uvnitř pylové buňky se zbarví do červena a buněčná stěna do zeleno-modra. Právě toto diferenciální barvení umožní vizuálně snadno rozlišit pylová zrna, ve kterých se nachází cytoplazma, o nichž se předpokládá, že jsou potenciálně životaschopná neboli viabilní, od prázdných či zdeformovaných pylových zrn. Další výhodou této metody je, že vzorky mohou být fixovány po dlouhou dobu ve fixáži, než dojde k vlastnímu barvení a na rozdíl od Alexandrova barvení (Alexander 1969) nevykazuje možná zdravotní rizika (Peterson et al. 2010).

Tato metoda se často využívá ve studiích zaměřených na mikroevoluční procesy polyploidizace a hybridizace, kdy právě nízká barvitelnost pylu může být jejich důkazem (Briggs & Walters 2001, Rich 2009). V několika studiích byla nalezena korelace mezi pylovou viabilitou a DNA-ploidním stupněm. Snížená pylová viabilita se obvykle nachází u polyploidních taxonů, především pak u těch, které mají liché ploidní stupně, či u taxonů u kterých se vyskytuje aneuploidie. Tato snížená schopnost tvořit viabilní pylová zrna je spojována s problémy vyskytujícími se v průběhu mikrogametogeneze či abnormalitami vyskytujícími se během meiózy (Kolarčík et al. 2015). Nízká viabilita pylu je také dosti častá u hybridních taxonů. Právě snížení či ztráta životaschopnosti pylu je velmi významnou postzygotickou reprodukční bariérou, která snižuje plodnost těchto taxonů, a tak brání zpětnému křížení s jejich rodičovskými druhy (Bureš et al. 2010).

1.4 Rod *Ornithogalum*

Rod *Ornithogalum* (snědek) představuje jednoděložné geofytní vytrvalé byliny z čeledi *Hyacinthaceae*, případně je řazen do podčeledi *Scilloidea* čeledi *Asparagaceae* (dle systému APG; Stevens 2001). Počet druhů zastoupených v tomto rodu není přesně znám, především z důvodu nedostatečně objasněné taxonomie a samotného vymezení rodu. Definice rodů v podčeledi *Ornithogaloideae* činila taxonomům problémy již od dob Linného (Martínez-Azorín et al. 2011). Někteří autoři vymezují v podčeledi *Ornithogaloideae* pouze jediný rod, a to *Ornithogalum*, do kterého zařazují až 250–300 druhů (Manning et al. 2004). Jiní rozlišují ve stejné podčeledi mnoho dalších rodů (Speta 1998, Pfosser & Speta 1999, Martínez-Azorín et al. 2011). Speta (1998) ve své studii rozlišil třináct menších rodů, které jsou snadněji morfologicky rozlišitelné, ale jak se později ukázalo, některé z nich nebyly vymezeny monofyleticky (Pfosser & Speta 1999, Martínez-Azorín et al. 2011). Manning et al. (2009) ve své práci navrhuje rozdělení podčeledi do tří tribů. Prvním je *Dipcadieae*, do kterého zařazují rody *Pseudogaltonia* a *Dipcadi*, druhý tribus *Albuaceae*, kam se řadí rod *Albuca* a třetím tribem je *Ornithogaleae*, kam zařadili velmi široce pojatý rod *Ornithogalum* se zhruba 160 druhy. Ovšem rody *Albuca* a *Ornithogalum* jsou kvůli své velké variabilitě dále členěny na další podrody, případně sekce. Naopak Martínez-Azorín et al. (2011) na základě fylogenetických analýz rozlišují v rámci podčeledi *Ornithogaloideae* devatenáct monofyletických rodů, konkrétně se jedná o rody *Albuca*, *Avonsera*, *Battandiera*, *Cathissa*, *Coilonox*, *Dipcadi*, *Eliokarmos*, *Elsiea*, *Ethesia*, *Galtonia*, *Honorius*, *Loncomelos*, *Melomphis*, *Neopatersonia*,

Nicipe, *Ornithogalum*, *Pseudogaltonia*, *Stellarioides* a *Trimelopter*. Do rodu *Ornithogalum* s. str. zařazují okolo 50 druhů.

Rod je v užším pojetí rozšířen zejména v oblasti Středozeří, kde v jeho západní části zasahuje až po Portugalsko a Maroko, na východ nejdále do Íránu, Turkmenistánu a Afghánistánu (Hrouda 1980, 2010; Manning et al. 2009, Martínez-Azorín et al. 2011). Jedná se o velmi polymorfní a taxonomicky složitý rod, který se vyznačuje různorodými počty chromozomů. Častým jevem je v tomto rodu polyploidie a vyskytuje se v něm i hybridizace. Mimo polyploidii se můžeme setkat i s několika dalšími cytologickými problémy, které výrazně komplikují charakterizování morfologicky blízkých skupin taxonů na základě jejich cytologie. Těmito problémy jsou zejména aneuploidie, dysploidie, polysomie a výskyt B-chromozomů (Hrouda 1980, Raamsdonk 1986, Guervin et al. 1994). Hlavním důvodem výskytu této cytologické variability jsou změny, které nastávají v průběhu meiózy. U taxonů s takto různorodým počtem chromozomů bývá poté problémem sexuální reprodukce, a tak se pro udržení svých populací reprodukují vegetativně pomocí pacibulek (Hrouda 1980, Herrmann 2002).

Podle současného pojetí v Květeně ČR (Hrouda 2010) rozlišujeme na území střední Evropy v rodu tři podrody, a to *Beryllis* (se zákl. chromozomovým číslem $x = 8$), *Myogalum* ($x = 7$) a *Ornithogalum* ($x = 9$). Všechny tři podrody mají centrum diverzity ve Středozeří. Ve střední Evropě se z podrodu *Beryllis*, jež je některými autory označován též jako podrod nebo samostatný rod *Loncomelos* (Hrouda 1980, 2010; Martínez-Azorín et al. 2011), můžeme setkat se dvěma zástupci, a to *Ornithogalum pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* a *O. brevistylum*. Podrod *Myogalum*, někdy též označován jako podrod/rod *Honorius* (Hrouda 1980, Martínez-Azorín et al. 2011), zastupují ve střední Evropě taktéž dva druhy, a to *O. boucheanum* a *O. nutans*. Poslední podrod *Ornithogalum* je zastoupený ve střední Evropě druhy *O. pannonicum* (*O. comosum* s. lat.), *O. refractum* a polyploidním komplexem *Ornithogalum umbellatum* agg.

1.4.1 *Ornithogalum umbellatum* agg.

Tento polyploidní komplex zahrnuje několik morfologicky blízkých taxonů, které se od sebe liší počtem chromozomů. Jak uvádí Hrouda (1980) v této skupině se vyskytuje mnoho cytologických problémů jako je anortoploidie, dysploidie, polysomie a také výskyt B-chromozomů. Základním chromozomovým číslem tohoto agregátu je $x = 9$ a tvoří polyploidní řadu v rozmezí od $2n = 18$ až po $2n = 108$ s možným výskytem dysploidních počtů chromozomů, např. $2n = 14, 16, 20$ (Raamsdonk 1986). V minulosti bylo v této skupině

vymezeno několik různých taxonů, a to často pouze na základě nepatrných morfologických rozdílů s malým biologickým významem, tudíž takto rozlišené druhy nabývaly pochybné taxonomické hodnoty. S tím se pojila i nesprávná interpretace náplně jednotlivých taxonů, což poté vedlo k dnešnímu nomenklatorickému chaosu a k vytváření velmi zmatené taxonomie, se kterou se dnes v agregátu můžeme setkat (Martínez-Azorín et al. 2009). Hlavním problémem je, že se v tomto polyploidním komplexu vyskytuje několik cytotypů, které byly dříve ztotožňovány se dvěma či třemi různými morfotypy. To způsobilo, že se stejné cytotypy označují v různých literárních pramenech různými jmény a často je poté právě údaj o ploidní úrovni hlavním rozlišovacím parametrem mezi jednotlivými taxony, na který se dá spolehnout, z důvodu rozdílného pojmenování druhů v různých literárních pramenech. Například pro diploidní rostliny se používá v Rakousku i v České republice označení *O. kochii*, v Německu se pro stejnou ploidii používá jak jméno *O. kochii*, tak *O. angustifolium* (Hrouda 2002, 2019; Fischer et al. 2008, Stolley 2010, Jäger 2017, Kunzová et al. 2020). Triploidní rostliny se v Rakousku a Německu označují jako *O. umbellatum* s. str. a označení *O. divergens* a *O. vulgare* se používá, dle některých autorů, pro rostliny, které mohou být pentaploidní i hexaploidní (Herrmann 2002, Martínez-Azorín et al. 2009, Jäger 2017, Kunzová et al. 2020). I v rámci České republiky se můžeme setkat s odlišným označením pro stejné cytotypy. Nejproblematictější jsou triploidní, pentaploidní a hexaploidní rostliny, které mají nestejná označení v různých literárních pramenech. Pro triploidní rostliny se používá *O. umbellatum* s. str. (Hrouda 2002) nebo *O. angustifolium* (Hrouda 2010, 2019), pentaploidní a hexaploidní rostliny se označují buď jako *O. divergens* (Hrouda 2002) či jako *O. umbellatum* s. str. (Hrouda 2010, 2019), přičemž se oba taxony mohou vykytovat v obou ploidních úrovních.

V této práci se budeme přidržovat pojmenování jednotlivých cytotypů na základě poslední platné typifikace (Martínez-Azorín et al. 2009). Pro diploidní rostliny tedy bude používáno jméno *O. kochii* ($2n = 18$), pro triploidní *O. umbellatum* ($2n = 27$), pro pentaploidní a hexaploidní *O. divergens* ($2n = 45, 54$). Martínez-Azorín (et al. 2009) také diskutuje typifikaci rostlinného materiálu náležícího ke jménu *O. divergens* a dalších blízkých taxonů. Udává, že jsou obecně ve skupině *O. umbellatum* agg. mezi polyploidními druhy uznávány podle většiny autorů pouze dva morfotypy, kdy jeden z nich představuje *O. umbellatum* a přiřazuje se k triploidním rostlinám a druhým morfotypem je *O. divergens*, který se váže k pentaploidním a hexaploidním zástupcům. Přičemž *O. angustifolium* je běžným synonymem pro *O. umbellatum*, tedy pro triploidní taxon (Herrmann 2002, Martínez-Azorín et al. 2009). Otázkou zůstává vhodné jméno pro tetraploidní taxon ($2n = 36$) tohoto agregátu. Pro tetraploidy

se často používá jméno *O. vulgare*. Speta (2000) spojil tetraploidní a pentaploidní rostliny z Rakouska právě pod toto jméno. Podobně Garbari et al. (2007) spojují tri-, tetra- a pentaploidní rostliny pod jméno *O. umbellatum*. Oba tyto přístupy jsou založeny na údajné podobnosti morfologie cibulí a tvorby olistěných pacibulek a také společného výskytu v populacích. Ve střední Evropě však smíšené populace těchto cytotypů dosud pozorovány nebyly a tetraploidní jedinci byli nalezeni pouze na jižním Slovensku a v Maďarsku (M. Hroneš, úst. sdělení). Morfologie těchto rostlin odpovídá spíše diploidnímu druhu *O. kochii* (Štolfová 2017). Z tohoto důvodu budou v této práci tetraploidní považováni za druhý, tetraploidní cytotyp taxonu *O. kochii*. K podobnému závěru dospěl L. Hrouda ve své habilitační práci (Hrouda 1980), kde ovšem používá pro tyto dva cytotypy název *O. ruthenicum* a jednotlivé cytotypy považuje za subspecie, tedy poddruhy. Pro diploidní taxony používá označení *O. ruthenicum* subsp. *ruthenicum*, pro tetraploidní *O. ruthenicum* subsp. *serotinum*. Tyto dvě ploidní úrovně není možné spolehlivě makromorfologicky rozlišit a je pravděpodobné, že tetraploidní cytotyp má autopolyploidní původ (Hrouda 1980, cf. Štolfová 2017).

U triploidních, pentaploidních a hexaploidních taxonů je dosti běžným jevem vegetativní rozmnožování pomocí cibulek, které zajišťují dlouhodobé přežívání konkrétních populací. Hrouda (1980) uvádí, že u tetraploidních druhů není tento typ rozmnožování tak běžný, jako například právě u hexaploidů a zdůrazňuje, že je jeho výskyt přímo úměrný tvorbě semen, kdy se jich u hexaploidů tvoří méně než u tetraploidů. Tvorba semen v takto vysoké ploidii je pravděpodobně podmíněna poruchami při meióze (Hrouda 1980).

1.4.2 Hybridní taxony

Jak již bylo zmíněno, v tomto rodu se můžeme setkat vzácně i s hybridizací. Z oblasti střední Evropy je znám výskyt třech hybridních taxonů na třech ploidních úrovních – triploidní, tetraploidní a pentaploidní. Triploidní hybridní taxon, označovaný jako *O. ×wildtii*, se vyskytuje na území České republiky, Rakouska a Slovenska a vznikl s největší pravděpodobností křížením mezi diploidním *O. kochii* a tetraploidním *O. boucheanum*. Na území České republiky ho jako první objevil v okolí Bzenecka Albin Wildt roku 1884, přičemž ho později, v roce 1912 popsal prof. Josef Podpěra (Podpěra 1913, Hrouda 2010, 2019). Dalším hybridním taxonem je DNA-tetraploidní *O. ×degenianum*, vyskytující se na území Slovenska a Maďarska. Poprvé ho popsal z území Maďarska Dr. Sándor Polgár roku 1928 a pojmenoval ho podle významného maďarského botanika Árpáda von Degen (Polgár

1928). Rodičovská kombinace však není zcela jistá a existuje několik možných scénářů. Může se jednat o křížence vzniklého spojením neredukované gamety diploidního *O. kochii* a redukované gamety tetraploidního *O. boucheanum* nebo mohl vzniknout ze dvou tetraploidních rodičovských rostlin (*O. kochii* × *O. boucheanum*), jak uvádí Píchalová (2017), která se ve své práci hybridizaci v rámci rodu *Ornithogalum* blíže věnuje. Z území Německa je uváděn také výskyt hybridního taxonu *O. ×vigeneri*, který je křížencem mezi *O. nutans* a *O. boucheanum*. Jedná se o pentaploidní cytotyp s $2n = 35$ (Hrouda 1980, Stolley 2010, Jäger 2017, Langbehn 2018). Hrouda (1980) však uvádí, že jméno *O. ×vigeneri* je neplatně publikováno, proto jej nelze pro tento hybridní taxon užít. Navrhuje tento taxon označovat jako *O. ×affinis* (resp. *Honorius ×affinis*).

1.4.3 Velikost genomu a pylová viabilita – současný stav poznání

Rod *Ornithogalum* je cytologicky velmi rozmanitý. Pozornost byla dosud věnována především studiu počtu chromozomů a porovnávání karyotypů (např. van Raamsdonk 1986, Dalgiç & Özhatay 1997). Naopak velikost genomu zatím studována příliš nebyla. Kromě studie tureckých autorů (Karaguzel et al. 2020) dosud nebyla vydána žádná přehledová studie velikosti genomu u rodu *Ornithogalum*. Tato práce však již na první pohled trpí řadou metodologických problémů a zabývá se především taxony, které se ve střední Evropě nevyskytují. Jednotlivé informace o velikosti genomu snědků lze nalézt rozesté v několika široce zaměřených ekologických nebo evolučních přehledových studiích (Zonneveld et al. 2005, Veselý et al. 2012, Bou Dagher-Kharrat et al. 2013, Šmarda et al. 2019, Zonneveld 2019). Obdobná situace se týká taktéž studia pylové viability u tohoto rodu, kdy byla na tuto problematiku zaměřena jediná studie (van Raamsdonk 1985). Další informace jsou uvedeny v nepublikované habilitační práci L. Hroudy (Hrouda 1980). Tato práce proto představuje první ucelený přehled velikosti genomu a pylové viability u střeoevropských zástupců rodu *Ornithogalum*.

2 Cíle práce

Tato práce se zabývá vztahem mezi DNA ploidní úrovní, velikostí genomu a pylové viability u střeoevropských zástupců rodu *Ornithogalum*.

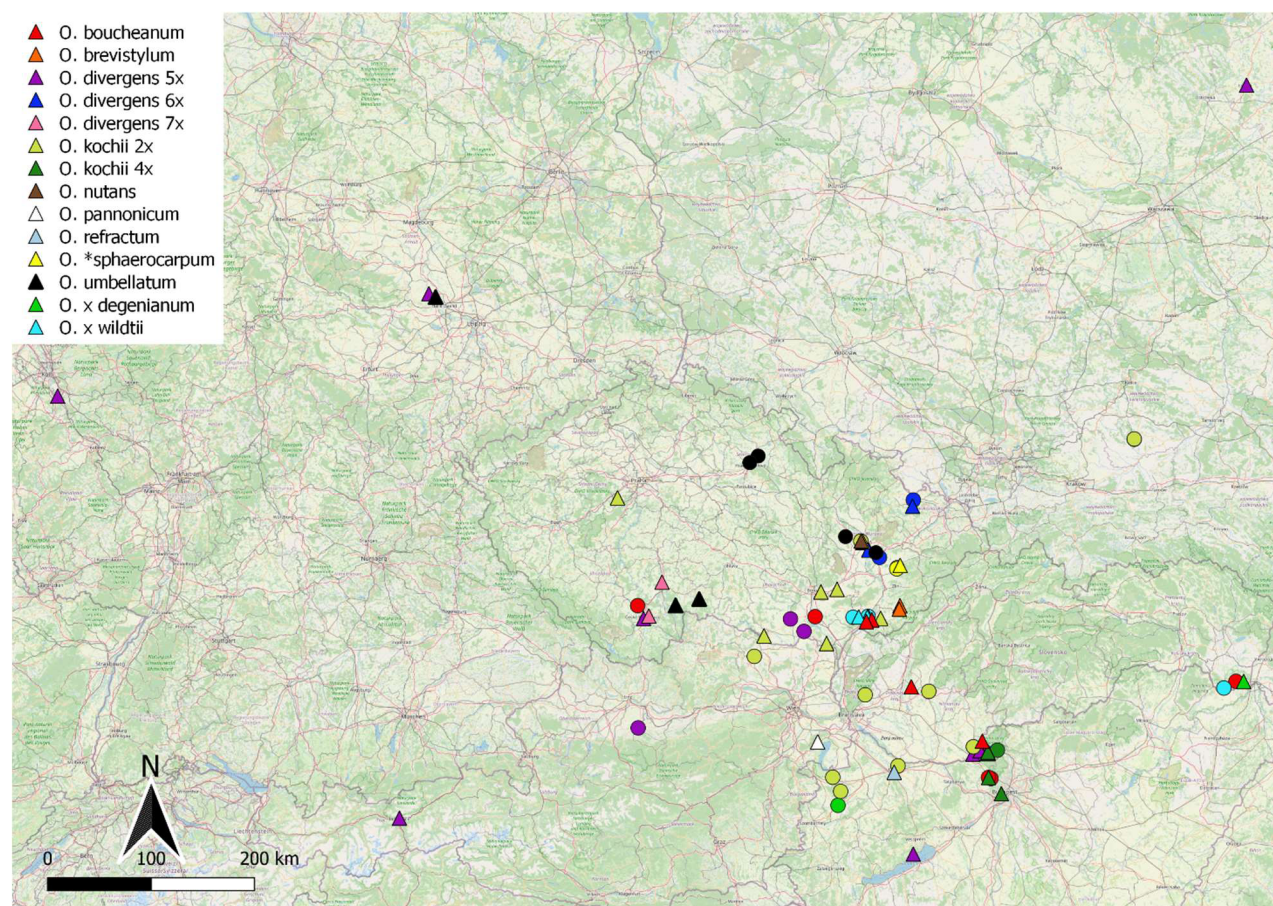
Hlavním cílem práce je:

- a) zjištění, zda mají jednotlivé studované taxony uniformní velikost genomu a pylovou viabilitu
- b) objasnění, zda existuje vztah mezi pylovou viabilitou, velikostí genomu a DNA ploidní úrovní daného taxonu
- c) zjištění, zda mají hybridní taxony sníženou pylovou viabilitu než jejich potenciální rodiče

3 Materiál a metody

3.1 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál použitý na studium dané problematiky byl sebrán na území střední Evropy konkrétně na území států České republiky, Slovenska, Polska, Rakouska, Německa a Maďarska. Z každé populace bylo odebráno alespoň pět jedinců, pokud to bylo možné. Sebraný rostlinný materiál byl přiřazen ke konkrétnímu taxonu, následně mu byl udělen unikátní třímístný kód a rostliny byly zasazeny ve sklenících katedry Botaniky PŘF UP v Olomouci. V několika případech (zejména u *O. brevistylum* a *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum*) byly vzorky odebrány z volně rostoucích rostlin a tito jedinci nebyli přesazováni.



Obrázek 1 Mapa lokalit studovaných populací. Taxony jsou barevně rozlišeny, trojúhelníky značí populace, které byly analyzovány na velikost genomu i na pylovou viabilitu; kolečka značí populace, které byly analyzovány pouze na velikost genomu.

3.2 Stanovení velikosti genomu a DNA-ploidní úrovně

Ke stanovení velikosti genomu byla použita metoda průtokové cytometrie. Měření probíhalo na průtokovém cytometru Partec PAS (Partec GmbH, Münster, Německo) na katedře Botaniky PřF UP. Přístroj je vybaven zeleným laserem Cobolt Samba (Cobolt AB, Stockholm, Švédsko) s vlnovou délkou 532 nm. Pro přípravu vzorků byly používány zdravé kořinky, které se odebíraly z rostlin kultivovaných ve skleníku nebo semeníky odebrané u rostlin v přírodě. Vzorek byl následně zpracován dle standardního protokolu (Doležel et al. 2007). Odebrané kořinky byly vloženy do malé epruvety řádně označené příslušným kódem a naplněné destilovanou vodou, aby nedošlo k jejich vysušení do doby měření. Následně byla část zdravého kořinku bez kořenové špičky přenesena společně s odpovídajícím množstvím pletiva interního standardu na Petriho misku. Společně byl tento rostlinný materiál nasekán za pomoci ostré žiletky v 1000 μ l pufru LB01 (pH 7,8) s přídavkem PVP-40 (20 mg/ml; Doležel & Bartoš 2005). Takto vzniklá suspenze byla poté přefiltrována přes 42 μ m nylonový filtr do epruvety, kam bylo zároveň přidáno dalších 500 μ l pufru LB01, 50 μ l RNasy A, typ IIA (o konečné koncentraci 50 μ g/ml) a nakonec byl vzorek obarven 50 μ l fluorochromu propidium jodid (PI; o konečné koncentraci 50 μ g/ml), který se váže mezi jednotlivé DNA báze. Takto vzniklý vzorek byl krátce promíchán na laboratorní třepačce a následně analyzován na průtokovém cytometru. Pro každou rostlinu byly provedeny vždy alespoň tři měření a byla zaznamenávána intenzita fluorescence pro 5000 jader. V případě, že se od sebe jednotlivá měření pro daný vzorek odlišovala o více jak 3 %, bylo provedeno další měření. Jako interní standardy byly použity druhy se známou velikostí genomu: *Vicia faba* L. 'Inovec' (2C = 26,90 pg) a *Secale cereale* L. 'Daňkovské' (2C = 16,19 pg). DNA-ploidní úroveň byla následně odvozená z naměřené velikosti genomu, u části vzorků byla ploidie kalibrována počtem chromozomů z předchozího výzkumu (M. Hroneš, osobní sdělení) a u části vzorků byly použity údaje z literatury. Monoploidní velikost genomu byla počítána vydělením absolutní velikosti genomu zjištěným ploidním stupněm. Pro jednotlivé taxony byla vypočtena procentuální variabilita mezi největší a nejmenší naměřenou hodnotou velikosti genomu.

3.3 Stanovení pylové viability a absolutního počtu pylových zrn

Pylová viabilita byla zjišťována za pomoci zjednodušené metody barvitelnosti pylu modifikovaným Alexandrovým barvivem podle protokolu Peterson et al. (2010). Prašníky byly odebírány před jejich dehiscencí z mírně otevřených květních pupat kultivovaných rostlin (případně rostlin v terénu) a ihned byly fixovány v Carnoyově roztoku složeného z etanolu,

chloroformu a kyseliny octové v poměru 6:3:1. Takto fixované prašníky byly následně skladovány v lednici do doby barvení (několik dní až cca půl roku). Z každého jedince byly sebrány tři prašníky, ideálně z různých květů. Před samotným procesem barvení byly prašníky vyjmuty z fixáže, důkladně osušeny papírovým ubrouskem a následně položeny na podložní mikroskopické sklíčko, kde byl na prašníky aplikován barvicí roztok (Peterson et al. 2010). Následně byl povrch prašníků opatrně narušen za pomoci ostré pinzety, aby se z něj uvolnila pylová zrna do barvicího roztoku a zbytek prašníku byl z podložního sklíčka odstraněn. Takto připravený vzorek byl zakrytý krycím sklíčkem a krátce zahřátý nad plamenem. Připravený preparát byl ponechán 10minutovému působení a poté byl pozorován pod mikroskopem Zeiss Axio Scope.A1 s kamerou AxioCam 105 color pod zvětšením 50×. Fotografie jednotlivých zorných polí byly pořízeny v programu ZEN 3.0 (vše Carl Zeiss AG, Jena, Německo). Pylová zrna obarvena jasně růžovou barvou, obsahují cytoplazmu a byla tudíž považována za potenciálně viabilní, neviabilní pylová zrna byla zbarvená šedě. Za pomoci kamery na mikroskopu bylo nafoceno v každém preparátu zcela náhodně šest zorných polí, na kterých poté byly spočítány počty viabilních (růžových) a neviabilních (šedých) pylových zrn. Pro každý prašík bylo z takto získaných počtů spočítáno procento potenciální viability. Pro konečné stanovení pylové viability (barvitelnosti) daného jedince byla spočítána průměrná viabilita všech tří odebraných prašníků. Pro každého jedince byl také stanoven absolutní počet pylových zrn ze tří prašníků, kdy z každého byla spočítána všechna pylová zrna na zcela náhodně umístěných šesti zorných polí pod mikroskopem. Takto stanovený absolutní počet pylových zrn pro každý taxon byl použit pro hrubý odhad schopnosti tvořit pylová zrna. Pro jednotlivé taxony byla vypočtena procentuální variabilita mezi největší a nejmenší zjištěnou hodnotou pylové viability a mezi nejvyšším a nejnižším počtem pylových zrn. Celkem bylo na pylovou viabilitu analyzováno 84 jedinců.

3.4 Statistické zpracování dat

Zpracování dat proběhlo v programu MS Excel a NCSS 9 (Hintze 2013). Pro stanovení rozdílů ve velikosti genomu či v pylové viabilitě mezi jednotlivými taxony byly využity testy s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ (T-test, ANOVA, Tukey-Kramerův test mnohonásobného porovnání, Dunnův test s Bonferroniho korekcí). V programu NCSS 9 (Hintze 2013) byly taktéž zpracovány korelace mezi jednotlivými studovanými parametry.

Mapa rozšíření studovaných lokalit byla zpracována v programu QGIS (QGIS Development Team 2020).

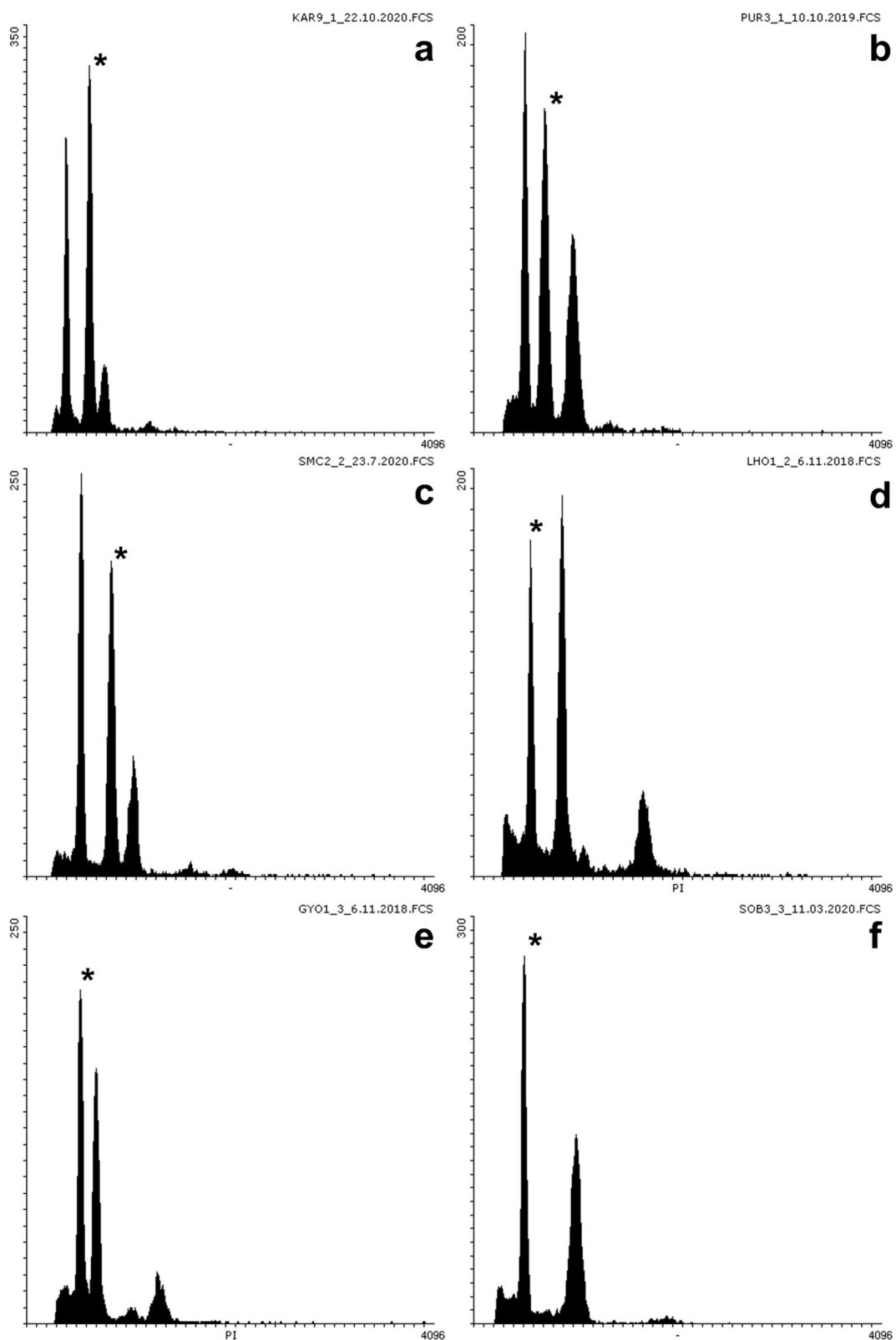
4 Výsledky

4.1 Velikost genomu a DNA ploidní úroveň

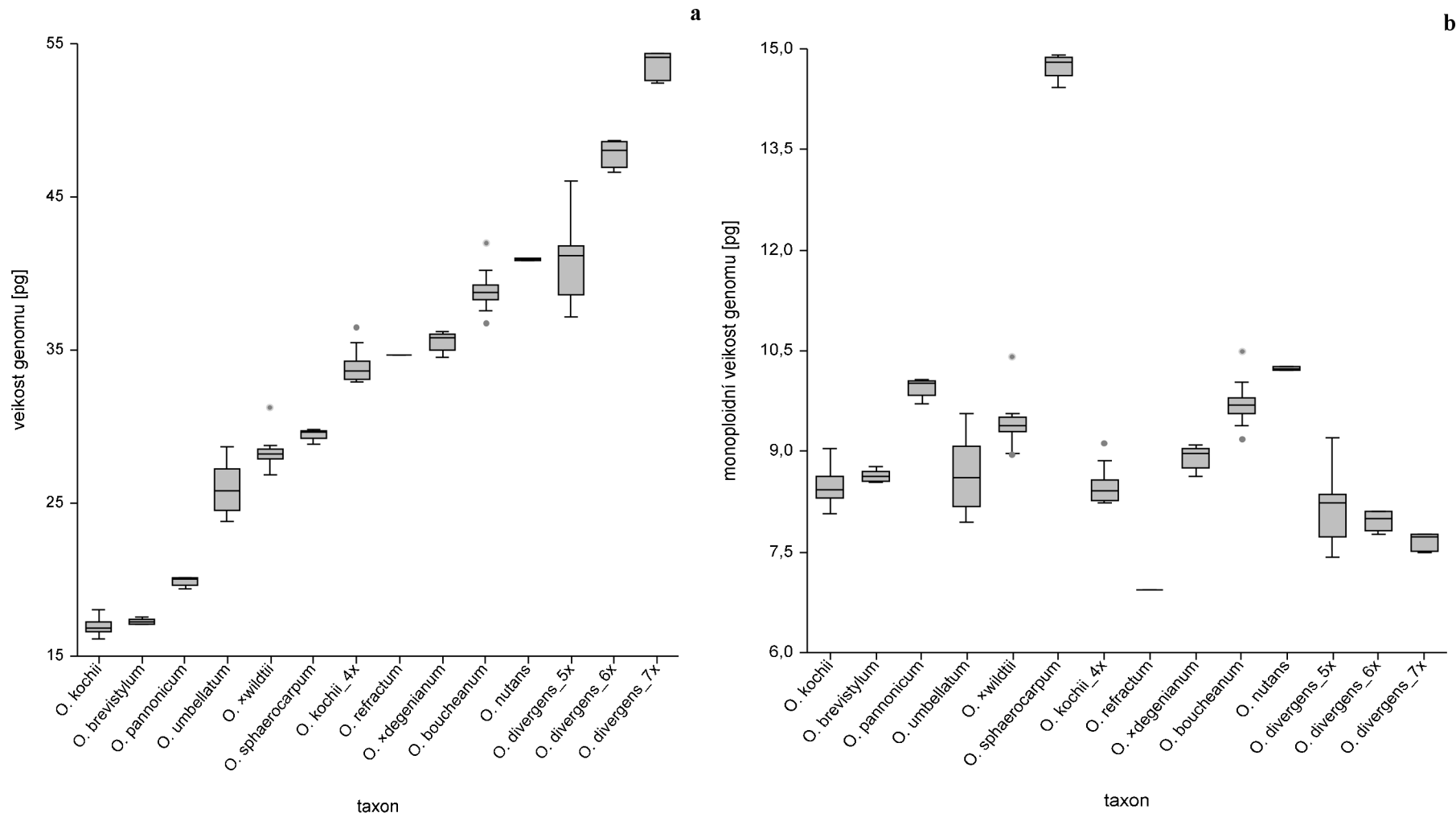
Velikost genomu a následně odvozená ploidní úroveň byla stanovena pro 146 jedinců z 66 populací, konkrétně 37 populací z České republiky, 10 ze Slovenska, 3 z Polska, 3 z Německa, 4 z Rakouska a 9 z Maďarska. V rámci studovaného souboru populací bylo rozlišeno celkem čtrnáct taxonů a šest ploidních úrovní – diploidní, triploidní, tetraploidní, pentaploidní, hexaploidní a heptaploidní.

Variační koeficient (CV) při měření velikosti genomu nabýval u interního standardu hodnot mezi 1,36 a 6,6 (průměr = $3,95 \pm 0,86$; medián = 4,08) a u měřeného vzorku mezi 1,06 a 6,32 (průměr = $4,05 \pm 0,88$; medián = 4,24). Variabilita mezi nejnižší a nejvyšší naměřenou hodnotou velikosti genomu v rámci tří měření jednoho vzorku se pohybovala od 0,05 % do 2,60 % (průměr = $1,02 \pm 0,61$ %; medián = 0,97 %).

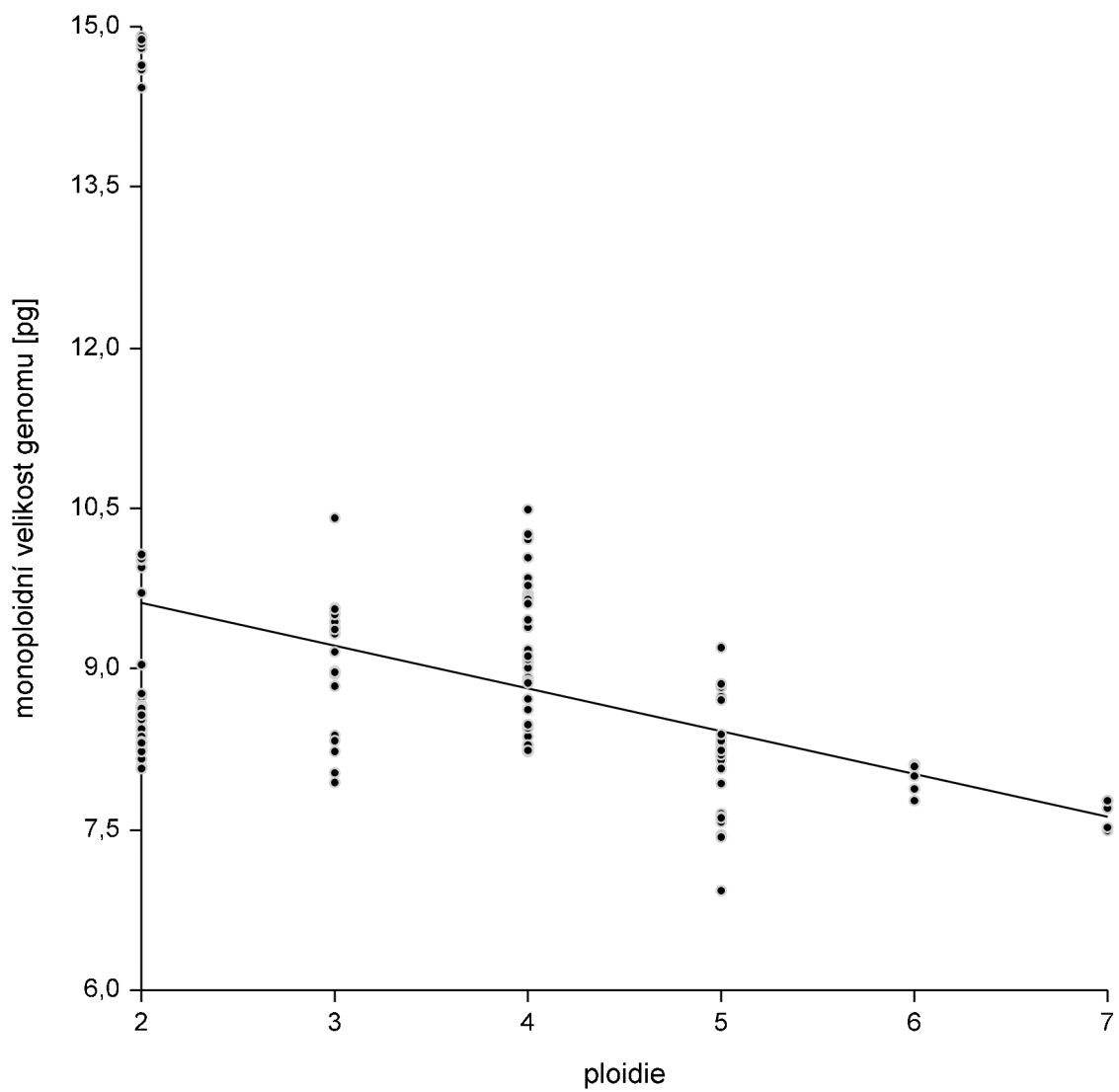
Průměrná velikost genomu v rámci studovaného souboru taxonů byla 33,15 pg, kdy nejnižší hodnota byla zjištěna u diploidního *O. kochii* z populace z Maďarska ($2C = 16,14$ pg) a nejvyšší hodnota u heptaploidního *O. divergens* z České republiky ($2C = 54,4$ pg), což představuje trojnásobný rozdíl (obr. 3, tab. 1). Průměrná monoploidní velikost genomu byla 9,14 pg, přičemž nejnižší hodnota byla zjištěna u *O. refractum* z Maďarska ($1Cx = 6,93$ pg), nejvyšší hodnota u *O. pyrenaicum subsp. sphaerocarpum* z České republiky ($1Cx = 14,91$ pg), jedná se tedy o více než dvojnásobný rozdíl monoploidní velikosti genomu v rámci studovaného souboru taxonů (obr. 3, tab. 1). Bylo prokázáno, že u studovaného souboru taxonů dochází ke značnému snižování monoploidní velikosti genomu s rostoucím ploidním stupněm (obr. 4).



Obrázek 2 Příklady výstupů z průtokového cytometru. Hvězdičkou je označen peak standardu *Vicia faba* L. (a,b,c,e,f) a *Secale cereale* L. (d); a) *Ornithogalum kochii* (2x), b) *Ornithogalum pannonicum*, c) *Ornithogalum brevistylum*, d) *Ornithogalum umbellatum*, e) *Ornithogalum refractum*, f) *Ornithogalum divergens* (7x)



Obrázek 3 Velikost genomu u studovaného souboru taxonů středoevropských zástupců rodu *Ornithogalum* a) absolutní velikost genomu, b) monoploidní velikost genomu (tělo box-plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř box-plotu medián, vousy zbytek variability a tečky odlehle hodnoty).



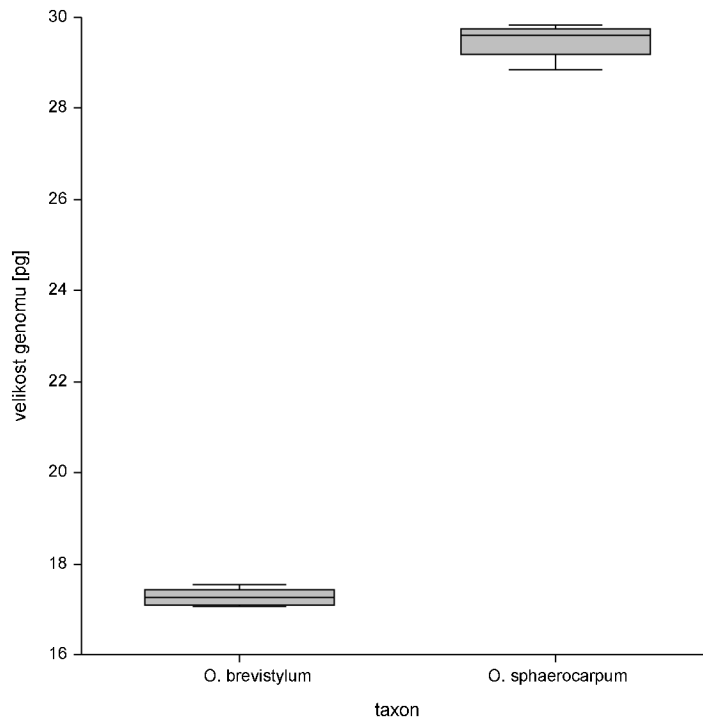
Obrázek 4 Korelace ploidního stupně a monoploidní velikosti genomu u studovaného souboru populací středoevropských zástupců rodu *Ornithogalum* (Pearsonův korelační koeficient, $r = -0,3821$, $p < 0,001$)

Tabulka 1 Velikost genomu u středoevropských zástupců rodu *Ornithogalum*, N–počet jedinců, μ –aritmetický průměr, SD–směrodatná odchylka

Podrod	Taxon	Ploidie	N	Absolutní velikost genomu 2C [pg]			Monoploidní velikost genomu 1Cx [pg]			Variabilita [%]
				Min	Max	$\mu \pm SD$	Min	Max	$\mu \pm SD$	
<i>Beryllis</i>	<i>O. pyrenaicum</i>	2x	7	28,86	29,82	29,46 \pm 0,33	14,43	14,91	14,73 \pm 0,16	3,27
	subsp. <i>sphaerocarpum</i>									
	<i>O. brevistylum</i>	2x	5	17,07	17,54	17,26 \pm 0,16	8,53	8,77	8,63 \pm 0,08	2,75
<i>Myogalum</i>	<i>O. boucheanum</i>	4x	14	36,74	41,98	38,86 \pm 1,18	9,18	10,49	9,71 \pm 0,29	13,48
	<i>O. nutans</i>	4x	3	40,83	41,02	40,93 \pm 0,08	10,21	10,26	10,23 \pm 0,02	0,48
<i>Ornithogalum</i>	<i>O. pannonicum</i>	2x	5	19,43	20,15	19,91 \pm 0,26	9,71	10,07	9,96 \pm 0,13	3,61
	<i>O. refractum</i>	5x	1			34,66			6,93	
	<i>O. kochii</i>	2x	30	16,14	18,08	16,89 \pm 0,41	8,07	9,04	8,45 \pm 0,21	11,49
	<i>O. umbellatum</i>	3x	10	23,83	28,69	25,99 \pm 1,60	7,94	9,56	8,66 \pm 0,53	18,70
	<i>O. kochii</i>	4x	10	32,93	36,47	33,92 \pm 1,11	8,23	9,12	8,48 \pm 0,28	10,45
	<i>O. divergens</i>	5x	28	37,13	46,00	40,87 \pm 2,26	7,43	9,20	8,17 \pm 0,45	21,70
	<i>O. divergens</i>	6x	5	46,62	48,67	47,82 \pm 0,78	7,77	8,11	7,97 \pm 0,13	4,29
	<i>O. divergens</i>	7x	6	52,43	54,40	53,69 \pm 0,84	7,49	7,77	7,67 \pm 0,12	3,68
Hybridní taxony	<i>O. \timesdegenianum</i>	4x	8	34,49	36,22	35,60 \pm 0,59	8,62	9,09	8,91 \pm 0,16	4,87
	<i>O. \timeswildtii</i>	3x	14	26,86	31,24	28,24 \pm 1,00	8,95	10,41	9,41 \pm 0,33	15,54
Celkem			147							
Průměr						33,15			9,14	

4.1.1 Podrod *Beryllis*

V podrodu *Beryllis* byla zjištěna signifikantně menší velikost genomu (T-test, $t = -70,5299$, $DF = 10$, $p < 0,001$; obr. 5, tab. 1) u druhu *O. brevistylum* ($2C = 17,26$ pg), než u druhu *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* ($2C = 29,46$ pg) a to až téměř dvakrát. Z naměřených výsledků velikosti genomu by mohla být odhadnuta ploidní úroveň pro *O. brevistylum* jako diploidní a pro taxon *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* jako tetraploidní. Ovšem na základě údajů z literatury z předchozích výzkumů se jedná zcela jistě o dva diploidní taxony, které se liší jak počtem chromozomů, tak velikostí genomu. Variabilita mezi největší a nejmenší naměřenou velikostí genomu u taxonu *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* byla 3,27 %, u *O. brevistylum* 2,75 % (tab. 1).

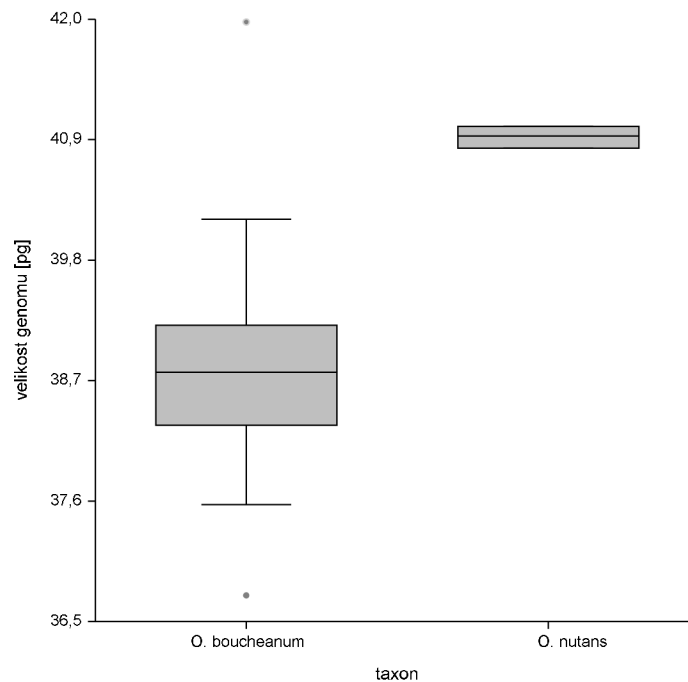


Obrázek 5 Absolutní velikost genomu ($2C$) u taxonů *O. brevistylum* a *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* z podrodu *Beryllis* (tělo box-plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř box-plotu medián, vousy zbytek variability a tečky odlehlé hodnoty).

4.1.2 Podrod *Myogalum*

Jedna ploidní úroveň, DNA-tetraploidní, byla odvozena na základě velikost genomu u druhů *O. boucheanum* a *O. nutans* z podrodu *Myogalum*.

Signifikantně větší velikost genomu (T-test, $t = -2,8600$, $DF = 15$, $p = 0,012$; obr. 6, tab. 1) byla zjištěna u druhu *O. nutans* ($2C = 40,93$ pg), oproti *O. boucheanum* ($2C = 38,92$ pg). U druhu *O. nutans* byla velikost genomu měřena pouze ze tří jedinců z jedné populace, naměřené výsledky tedy nejsou plně relevantní a tento nízký počet může ovlivnit i variabilitu ve zjištěné velikosti genomu, kdy byla vyšší variabilita zjištěna u taxonu *O. boucheanum* (13,48 %), než u *O. nutans* (0,48 %; tab. 1).



Obrázek 6 Absolutní velikost genomu ($2C$) u taxonů *O. boucheanum* a *O. nutans* z podrodu *Myogalum* (tělo box-plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř box-plotu medián, vousy zbytek variability a tečky odlehlé hodnoty).

4.1.3 Podrod *Ornithogalum*

V podrodu *Ornithogalum* bylo zjištěno na základě velikosti genomu celkem šest ploidních úrovní od diploidní po heptaploidní.

Diploidní a pentaploidní úroveň je charakteristická pro dva různé taxony řadící se do podrodu *Ornithogalum*. Diploidní úroveň u byla zjištěna u *O. pannonicum* a *O. kochii*, pentaploidní u *O. refractum* a *O. divergens*. Diploidní taxon *O. pannonicum* se svou velikostí genomu ($2C = 19,91$ pg) signifikantně liší od druhého diploidního taxonu *O. kochii* ($2C = 16,89$ pg) z podrodu *Ornithogalum* (T-test, $t = -15,5757$, $DF = 33$, $p < 0,001$; obr. 7, tab.1). Velikost genomu byla u taxonu *O. refractum* zjištěna pouze pro jednoho jedince ($2C = 34,66$ pg), tudíž nelze hodnotit, zda je mezi velikostmi genomu obou pentaploidních taxonů signifikantní rozdíl. V průměru byla naměřena větší velikost genomu u *O. divergens* ($2C = 40,87$ pg), pro statistické porovnání by bylo však nezbytné mít k dispozici více naměřených údajů pro taxon *O. refractum* (obr. 7, tab. 1).

V polyploidním komplexu *O. umbellatum* agg. bylo zjištěno celkem šest ploidních úrovní. Velikost genomu taxonu *O. kochii* odpovídá diploidnímu a tetraploidnímu cytotypu. Velikost genomu *O. umbellatum* odpovídá triploidnímu stupni. U druhu *O. divergens* byly zjištěny na základě velikosti genomu tři ploidní úrovně, pentaploidní, hexaploidní a heptaploidní (tab. 1).

Výsledky mnohonásobného porovnání absolutní velikosti genomu v tomto polyploidním komplexu (Dunnův test; tab. 2, obr. 7) dokazují, že se diploidní taxon *O. kochii* signifikantně liší svou velikostí genomu od jeho tetraploidního cytotypu a také, společně s *O. umbellatum* od všech tří ploidních stupňů taxonu *O. divergens*. Tetraploidní *O. kochii* se liší, vedle svého diploidního cytotypu, signifikantně i od heptaploidního *O. divergens*.

Na základě výsledků Dunnova testu mnohonásobného porovnání s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ se monoploidní velikost genomu diploidního taxonu *O. kochii* signifikantně liší od všech tří ploidí taxonu *O. divergens*. Triploidní *O. umbellatum* a tetraploidní cytotyp *O. kochii* se se svou monoploidní velikostí genomu signifikantně odlišují od heptaploidního *O. divergens* (obr. 8, tab. 3). U triploidů a tetraploidů dochází v porovnání s diploidy k mírnému zvětšení monoploidní velikosti genomu, naopak u pentaploidního, hexaploidního a heptaploidního cytotypu se monoploidní velikost genomu v porovnání s diploidy zmenšuje s rostoucí ploidí (obr. 8, tab. 4).

Tabulka 2 Výsledky Dunnova testu mnohonásobného porovnání absolutní velikosti genomu taxonů *O. umbellatum* agg.

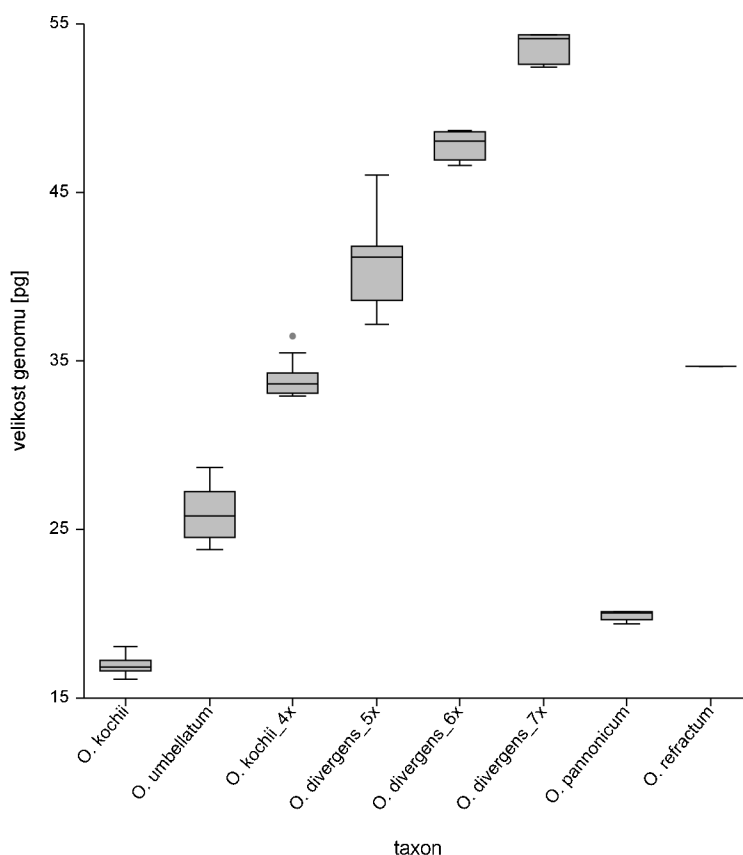
* = signifikantní rozdíl ($p < 0,05$; $z > 2,9352$).

Taxon	2n	<i>O. kochii</i> 2x	<i>O. umbellatum</i> 3x	<i>O. kochii</i> 4x	<i>O. divergens</i> 5x	<i>O. divergens</i> 6x	<i>O. divergens</i> 7x
<i>O. kochii</i>	2x	0,0000	2,1200	3,1801*	7,2178*	5,2485*	6,1451*
<i>O. umbellatum</i>	3x	2,1200	0,0000	0,8655	3,0470*	3,2154*	3,8227*
<i>O. kochii</i>	4x	3,1801*	0,8655	0,0000	1,9963	2,5087	3,0731*
<i>O. divergens</i>	5x	7,2178*	3,0470*	1,9963	0,0000	1,3155	1,8929
<i>O. divergens</i>	6x	5,2485*	3,2154*	2,5087	1,3155	0,0000	0,3516
<i>O. divergens</i>	7x	6,1451*	3,8227*	3,0731*	1,8929	0,3516	0,0000

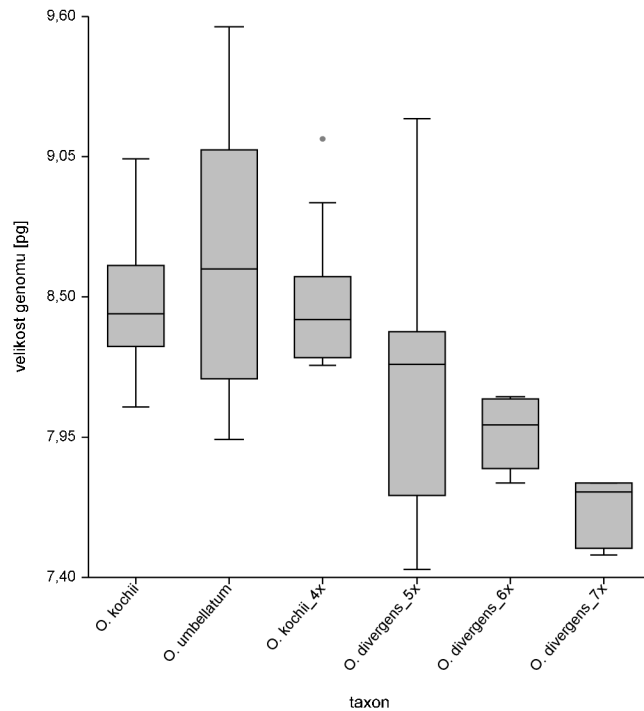
Tabulka 3 Výsledky Dunnova testu mnohonásobného porovnání monoploidní velikosti genomu taxonů *O. umbellatum* agg.

* = signifikantní rozdíl ($p < 0,05$; $z > 2,9352$).

Taxon	<i>O. kochii</i> 2x	<i>O. umbellatum</i> 3x	<i>O. kochii</i> 4x	<i>O. divergens</i> 5x	<i>O. divergens</i> 6x	<i>O. divergens</i> 7x	
<i>O. kochii</i>	2x	0,0000	0,3181	0,0477	2,9693*	3,0416*	4,0629*
<i>O. umbellatum</i>	3x	0,3181	0,0000	0,2987	2,4332	2,8945	3,7435*
<i>O. kochii</i>	4x	0,0477	0,2987	0,0000	2,0706	2,6506	3,4849*
<i>O. divergens</i>	5x	2,9693*	2,4332	2,0706	0,0000	1,4191	2,3046
<i>O. divergens</i>	6x	3,0416*	2,8945	2,6506	1,4191	0,0000	0,5743
<i>O. divergens</i>	7x	4,0629*	3,7435*	3,4849*	2,3046	0,5743	0,0000



Obrázek 7 Absolutní velikost genomu (2C) u taxonů z podrodu *Ornithogalum* (tělo box-plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř box-plotu medián, vousy zbytek variability a tečky odlehlé hodnoty).



Obrázek 8 Monoploidní velikost genomu (1Cx) u taxonů z polyploidního komplexu *Ornithogalum umbellatum* agg. (tělo box-plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř box-plotu medián, vousy zbytek variability a tečky odlehlé hodnoty).

Tabulka 4 Monoploidní velikost genomu cytotypů *O. umbellatum* agg., N–počet jedinců

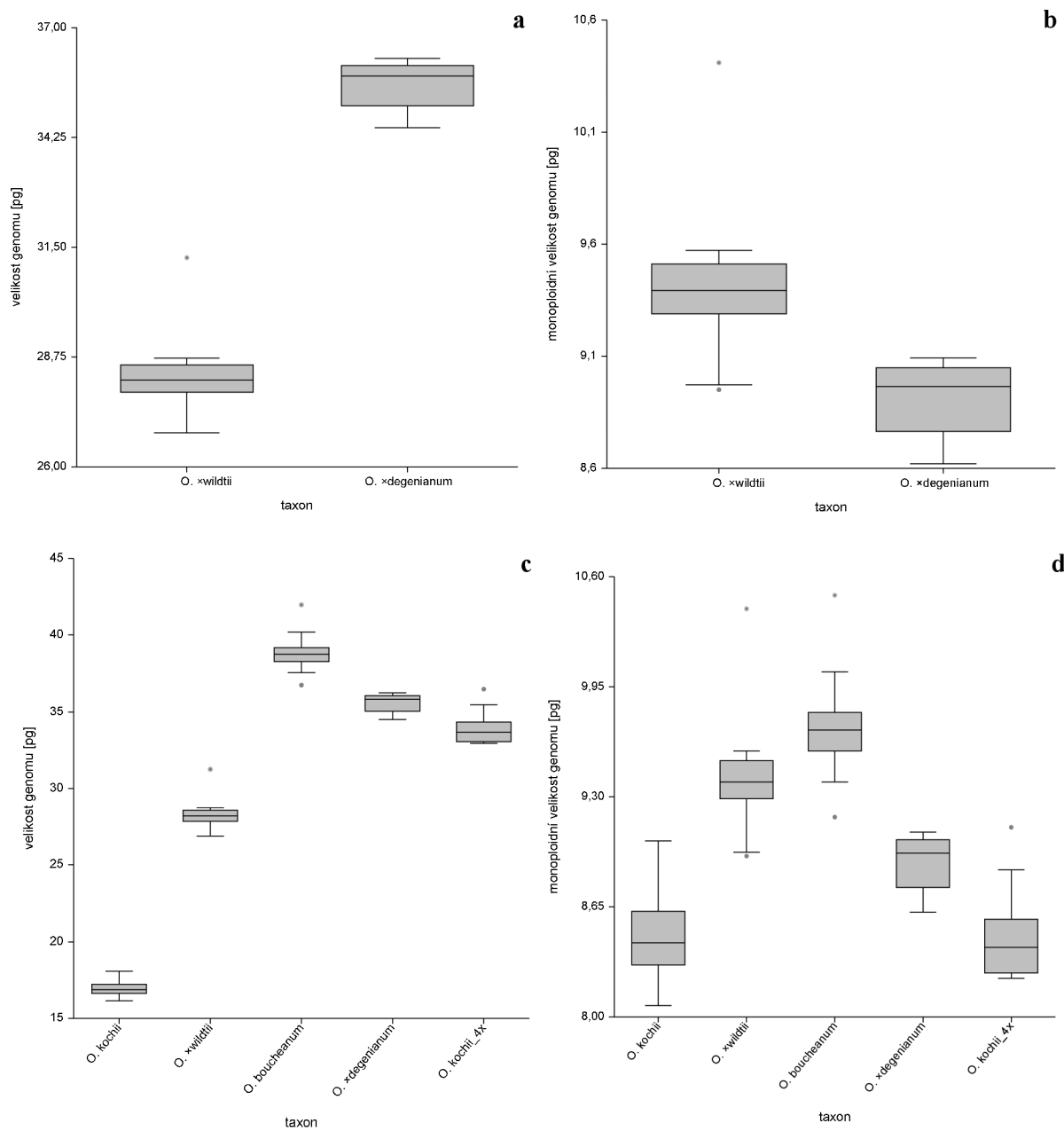
Taxon	Ploidie	N	Průměrná monoploidní velikost genomu Cx [pg]	Procento zvýšení/snížení genomu vzhledem k diploidní úrovni
<i>O. kochii</i>	2x	30	8,45	
<i>O. umbellatum</i>	3x	10	8,66	+2,49
<i>O. kochii</i>	4x	10	8,48	+0,36
<i>O. divergens</i>	5x	28	8,17	-3,31
<i>O. divergens</i>	6x	5	7,97	-5,68
<i>O. divergens</i>	7x	6	7,67	-9,23

4.1.4 Hybridní taxony

U obou hybridních taxonů byly zjištěny různé ploidní úrovně a také signifikantně odlišné velikosti genomu. U taxonu *O. ×wildtii* byla zjištěna DNA-triploidní ploidní úroveň, u taxonu *O. ×degenianum* DNA-tetraploidní. Signifikantně menší absolutní velikost genomu byla zjištěna u *O. ×wildtii* (T-test, $t = -18,2315$, $DF = 20$, $p < 0,001$; obr. 9a, tab. 1), naopak

monoploidní velikost genomu byla u tohoto taxonu signifikantně vyšší než u *O. ×degenianum* (T-test, $t = 3,8063$, $DF = 20$, $p = 0,001$; obr. 9b, tab. 1).

Velikost genomu u hybridních taxonů je znázorněna na obr. 9c společně s velikostmi genomu jejich potenciálních rodičů. Triploidní *O. ×wildtii* leží se svou velikostí genomu ($2C = 28,24$ pg) přesně mezi diploidním *O. kochii* ($2C = 16,89$ pg) a tetraploidním *O. boucheanum* ($2C = 38,86$ pg). Tetraploidní hybridní taxon *O. ×degenianum* se nachází se svou velikostí genomu



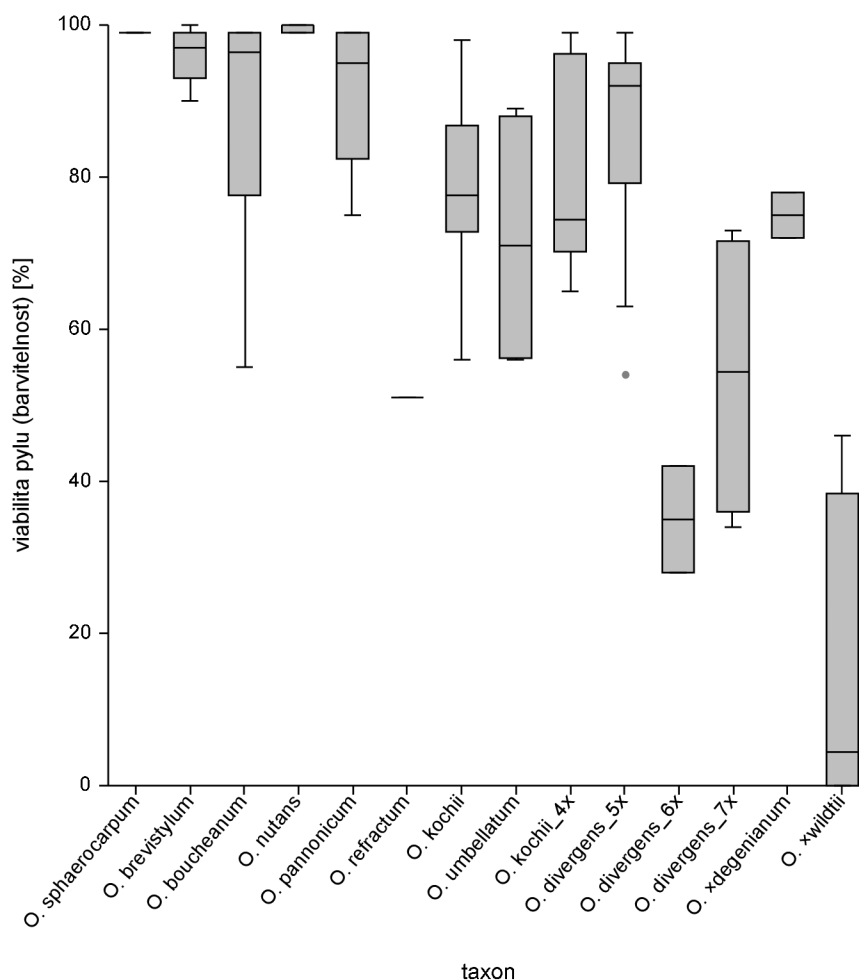
Obrázek 9 Přehled velikosti genomu, a) absolutní velikost genomu (2C) hybridních taxonů, b) monoploidní velikost genomu (1Cx) hybridních taxonů, c) absolutní velikost genomu (2C) hybridních taxonů a jejich potenciálních rodičů, d) monoploidní velikost genomu (1Cx) hybridních taxonů a jejich potenciálních rodičů (tělo box-plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř box-plotu medián, vousy zbytek variability a tečky odlehle hodnoty).

($2C = 35,60$ pg) mezi dvěma tetraploidními taxony *O. boucheanum* ($2C = 38,86$ pg) a *O. kochii* ($2C = 33,92$ pg). Stejný vztah můžeme pozorovat i na obr. 9d, kde je znázorněna monoploidní velikost genomu pro příslušné taxony.

4.2 Pylová viabilita

Pylová viabilita byla stanovena celkem u 84 jedinců z 37 populací.

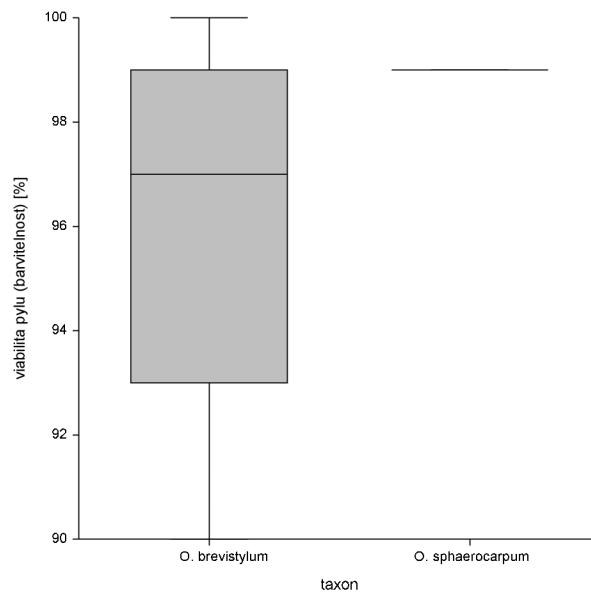
V rámci souboru studovaných jedinců se pylová viabilita pohybovala od 0 % do 100 % viabilních pylových zrn, v průměru 73 % (obr. 10, tab. 7). Nejnížší hodnoty pylové viability byly zaznamenány u hybridního taxonu *O. ×wildtii*, naopak až 100% pylová viabilita byla zjištěna u diploidního *O. brevistylum* a tetraploidního *O. nutans* (tab. 7).



Obrázek 10 Pylová viabilita (barvitelnost) u studovaného souboru jedinců středoevropských zástupců rodu *Ornithogalum* (tělo box-plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř box-plotu medián, vousy zbytek variability a tečky odlehlé hodnoty).

4.2.1 Podrod *Beryllis*

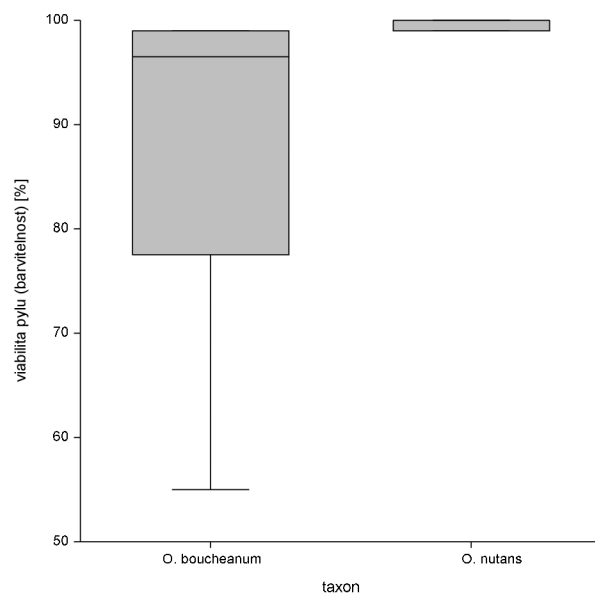
Oba diploidní druhy z podrodu *Beryllis* vykazovaly vysokou pylovou viabilitu, *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* (99 %) a *O. brevistylum* (96 ± 3 %). U taxonu *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* byla však stanovena viabilita pylu pouze u jednoho jedince, tudíž nelze tento výsledek považovat za plně relevantní. Variabilita v pylové viabilitě mezi jednotlivými vzorky u taxonu *O. brevistylum* byla 10,40 % (obr. 11, tab. 7).



Obrázek 11 Pylová viabilita u taxonů *O. brevistylum* a *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* z podrodu *Beryllis* (tělo box-plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř box-plotu medián, vousy zbytek variability).

4.2.2 Podrod *Myogalum*

Z podrodu *Myogalum* bylo prokázáno průměrně nižší procento pylové viability u tetraploidního taxonu *O. boucheanum* (89 ± 16 %) než u DNA-tetraploidního *O. nutans* (100 ± 0 %, obr.14a), avšak tento rozdíl nebyl potvrzen jako statisticky významný (T-test, $t = -1,4272$, $DF = 9$, $p = 0,187$). Druh *O. boucheanum* vykazoval ve viabilitě pylu větší variabilitu (49,72 %; obr. 12, tab. 7).



Obrázek 12 Pylová viabilita u taxonů *O. boucheanum* a *O. nutans* z podrodu *Myogalum* (tělo box-plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř box-plotu medián, vousy zbytek variability).

4.2.3 Podrod *Ornithogalum*

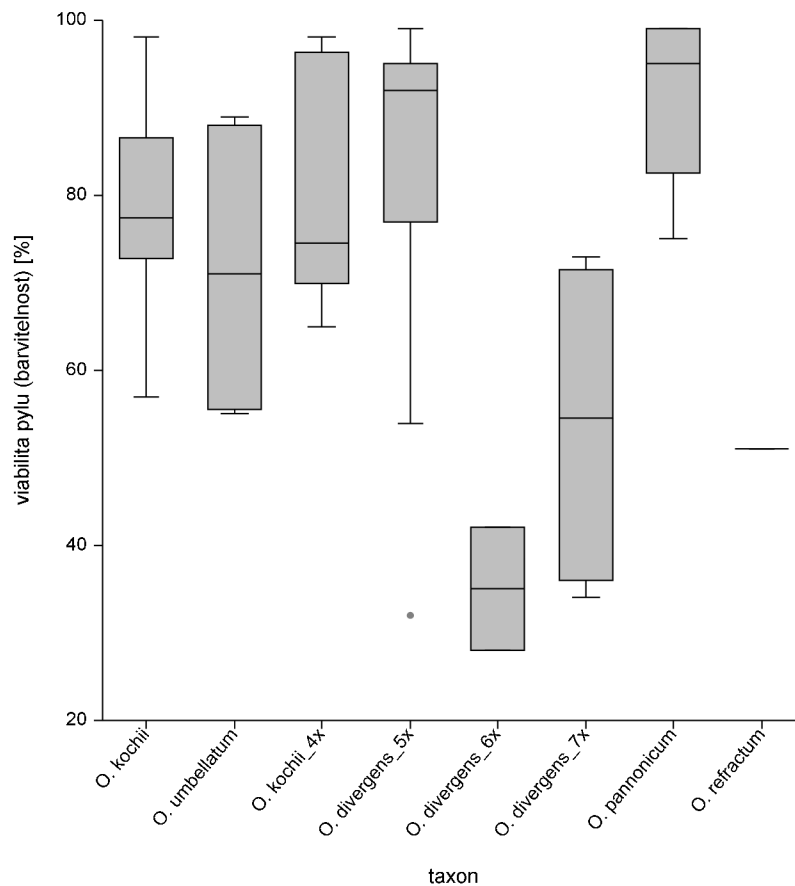
Velmi vysokých procent viability pylu (> 95%) z podrodu *Ornithogalum* dosahovali někteří jedinci diploidního taxonu *O. pannonicum*, obou cytotypů taxonu *O. kochii* a pentaploidního taxonu *O. divergens*. Ovšem v průměru byla největší viabilita pylu prokázána u diploidního taxonu *O. pannonicum* (92 %) a následně u pentaploidního *O. divergens* (86 %). Nejnižší pylovou viabilitu z tohoto podrodu vykazovali jedinci hexaploidního a heptaploidního cytotypu *O. divergens* (28 % a 34 %, obr. 14d). V průměru se výrazně nejvyšší pylová viabilita nacházela u hexaploidního taxonu *O. divergens* (35 %). U taxonu *O. refractum* byl hodnocen pouze jeden jedinec, jehož pylová viabilita byla 51 %. Pro relevantní zhodnocení pylové viability tohoto taxonu by bylo nutné studovat více jedinců. Nejvyšší míra variability v procentu pylové viability se nacházela u heptaploidního *O. divergens* (72,22 %) a diploidního *O. kochii* (54,14 %; obr. 13, 14b, tab. 7).

V rámci *O. umbellatum* agg. byl prokázán signifikantní rozdíl v pylové viabilitě pouze mezi pentaploidním a hexaploidním taxonem *O. divergens* (Dunnův test, tab. 5). Tyto výsledky však mohou být ovlivněny rozdílným počtem testovaných jedinců pro každou kategorii. Méně robustní Tukey-Kramerův test (DF = 47, critical value = 4,2065) však poukazuje na významný rozdíl mezi oběma cytotypy *O. kochii* a pentaploidního *O. divergens* s hexaploidním a

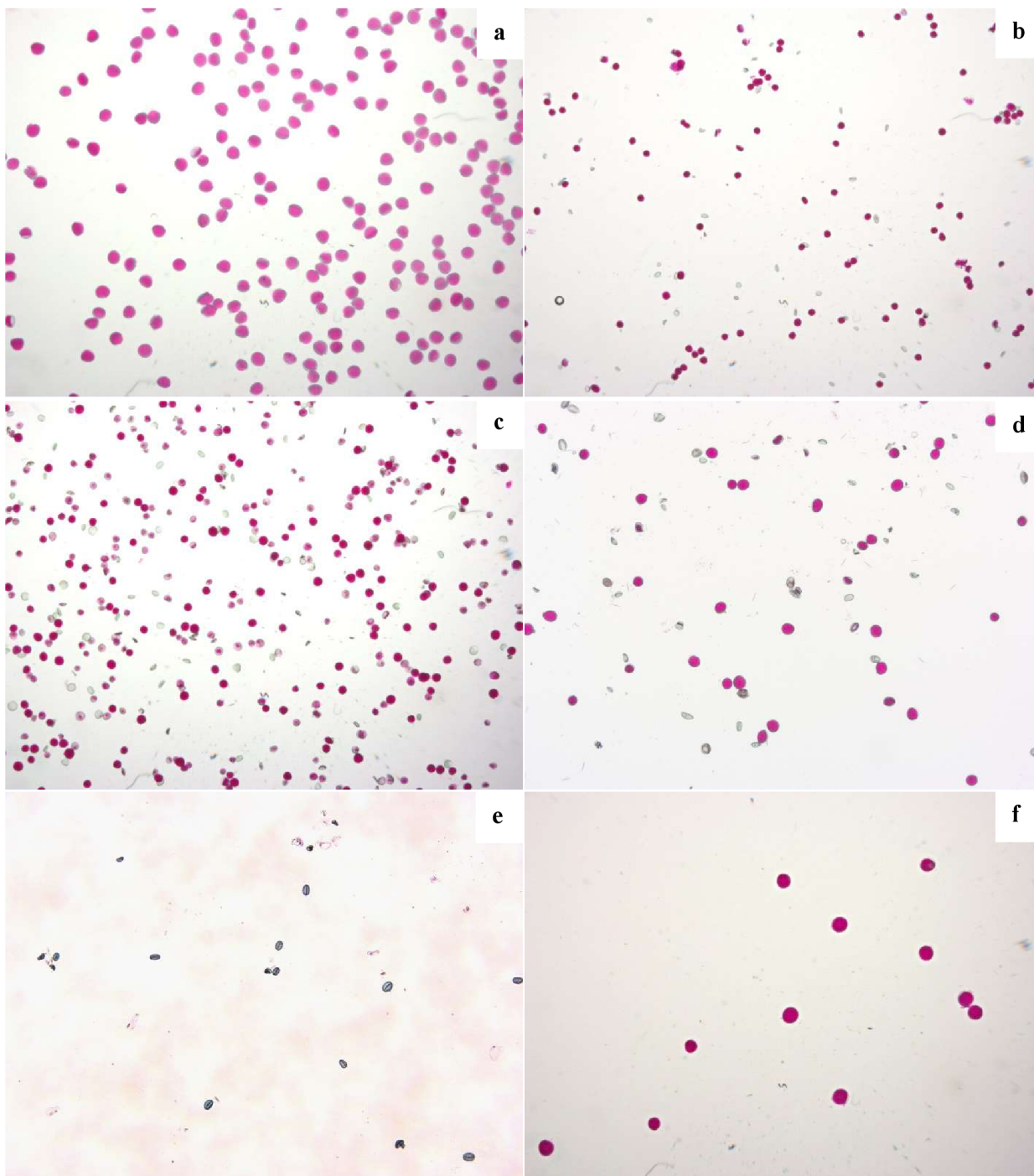
heptaploidním *O. divergens* a mezi triploidním *O. umbellatum* a hexaploidním *O. divergens*, jak by bylo patrné při pohledu na boxploty (obr. 13).

Tabulka 5 Výsledky Dunnova testu mnohonásobného porovnání pylové viability taxonů *O. umbellatum* agg.
* = signifikantní rozdíl ($p < 0,05$; $z > 2,9352$).

Taxon	<i>O. kochii</i> 2n	<i>O. umbellatum</i> 2x	<i>O. umbellatum</i> 3x	<i>O. kochii</i> 4x	<i>O. divergens</i> 5x	<i>O. divergens</i> 6x	<i>O. divergens</i> 7x
<i>O. kochii</i>	2x	0,0000	0,5190	0,4790	1,6453	2,2750	1,7253
<i>O. umbellatum</i>	3x	0,5190	0,0000	0,8464	1,6375	1,5304	0,9849
<i>O. kochii</i>	4x	0,4790	0,8464	0,0000	0,9005	2,4921	1,9837
<i>O. divergens</i>	5x	1,6453	1,6375	0,9005	0,0000	3,3454*	2,9188
<i>O. divergens</i>	6x	2,2750	1,5304	2,4921	3,3454*	0,0000	0,6185
<i>O. divergens</i>	7x	1,7253	0,9849	1,9837	2,9188	0,6185	0,0000



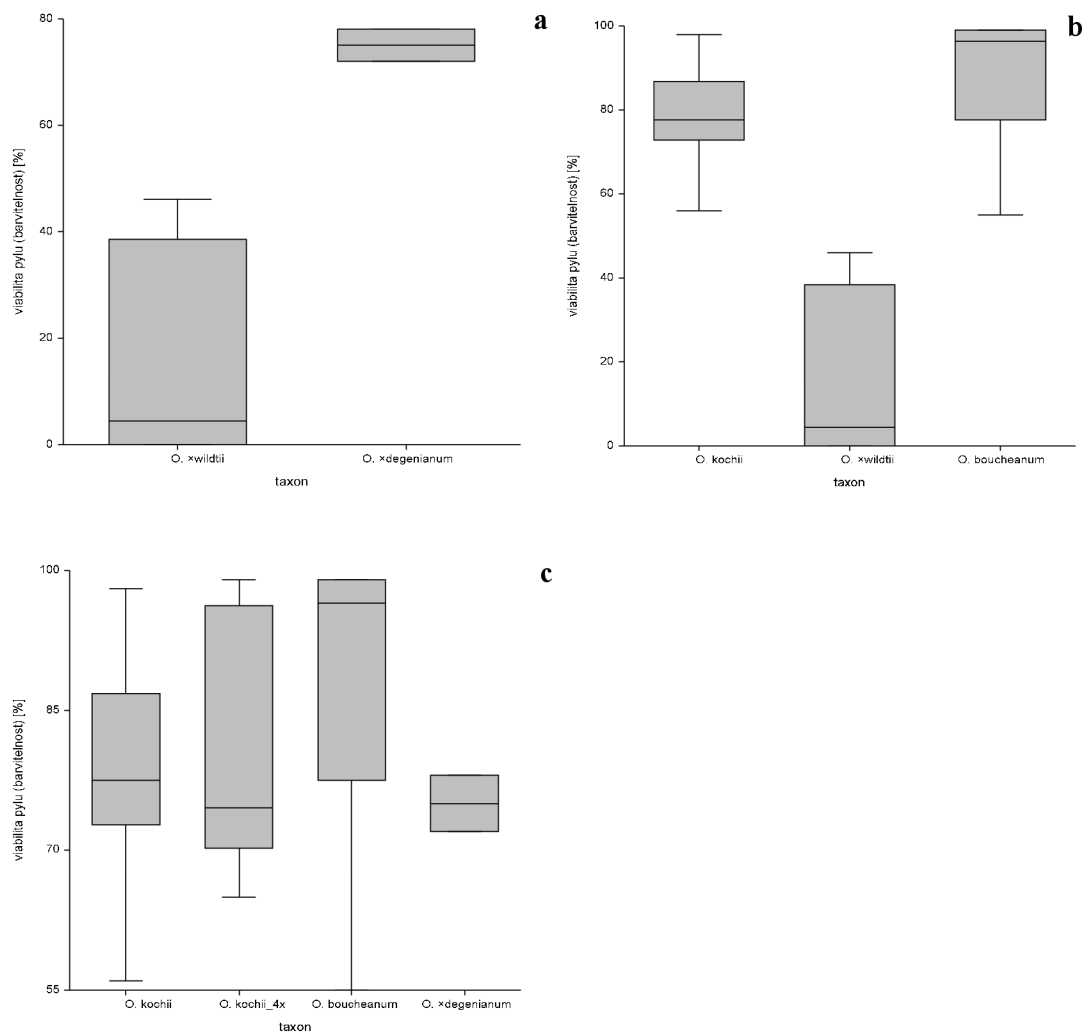
Obrázek 13 Pylová viability (barvitelnost) u taxonů z podrodu *Ornithogalum* (tělo boxplotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř boxplotu medián, vousy zbytek variability a tečky odlehlé hodnoty).



Obrázek 14 Pylová zrna vybraných taxonů rodu *Ornithogalum* obarvena modifikovaným Alexandrovým barvivem; zvětšení 50 ×; viabilní pylová zrna jsou vybarvena růžovou barvou, abortovaná pylová zrna jsou šedá; a) *O. nutans* (4x), b) *O. kochii* (2x), c) *O. umbellatum* (3x), d) *O. divergens* (6x), e) *O. ×wildtii* (3x), f) *O. ×degenianum* (4x)

4.2.4 Hybridní taxony

Výrazný rozdíl ve viabilitě pylu se nachází mezi hybridními taxony. Taxon *O. ×wildtii* vykazuje velmi nízké procento pylové viability (16 %, obr. 14e). Vyšší procento pylové viability bylo prokázáno u tetraploidního hybridního taxonu *O. ×degenianum* (74 %; obr. 14f, 15a, tab. 7). U tohoto taxonu však byli hodnoceni pouze dva jedinci a pro relevantní zhodnocení jeho pylové viability by bylo třeba studium více jedinců. Při porovnání pylové viability hybridního taxonu *O. ×wildtii* a jeho potenciálních rodičovských druhů byl nalezen signifikantní rozdíl (ANOVA, $n = 24$, $F = 41,45$, $p < 0,001$), kdy pylová viabilita u triploidního *O. ×wildtii* byla významně nižší, než u obou jeho potenciálních rodičovských druhů (Tukey-Kramerův test, $DF = 21$, critical value = 3,5719; obr. 15b, tab. 7). Naopak u tetraploidního *O. ×degenianum* nebyla oproti jeho



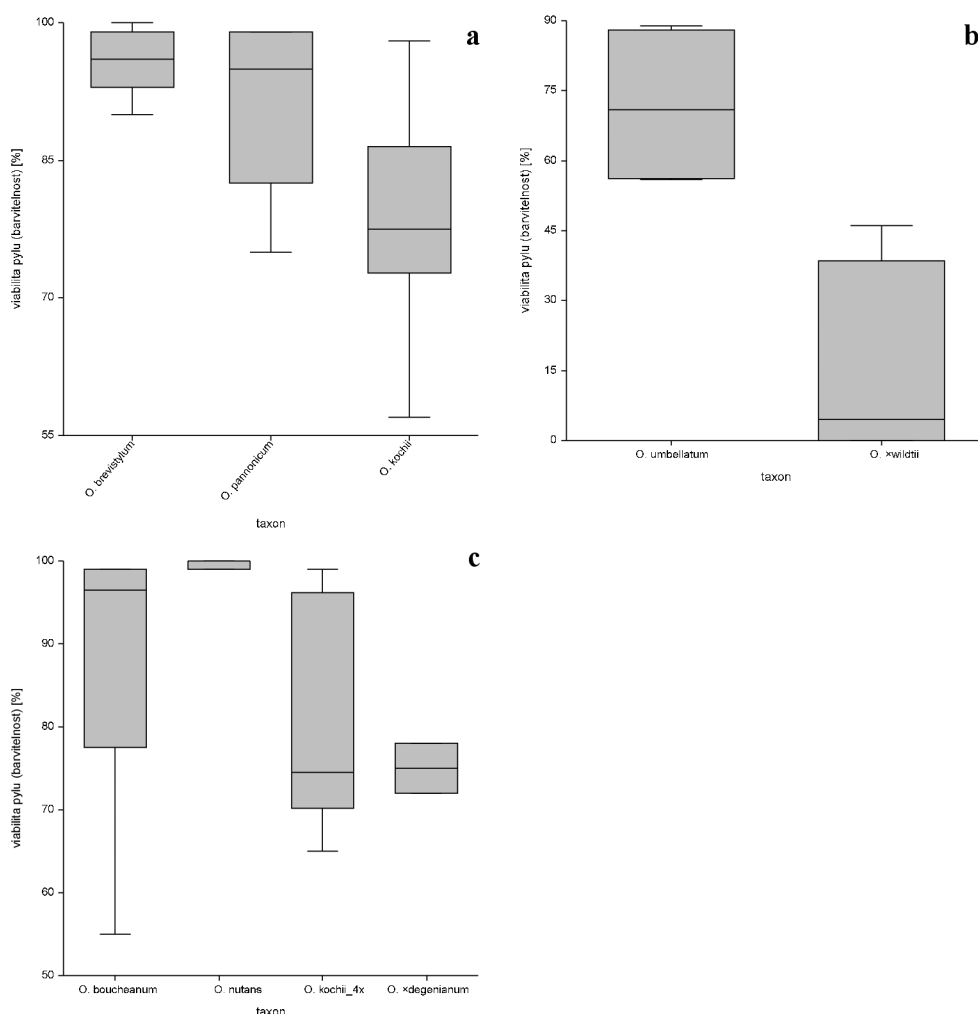
Obrázek 15 Pylová viabilita (barvitelnost) a) hybridní taxony triploidní *O. ×wildtii* a tetraploidní *O. ×degenianum*, b) *O. ×wildtii* a jeho potenciální rodiče diploidní *O. kochii* a tetraploidní *O. boucheanum*, c) *O. ×degenianum* a jeho potenciální rodiče diploidní a tetraploidní cytotyp *O. kochii* a *O. boucheanum* (tělo box-plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř box-plotu medián, vousy zbytek variability).

potenciálním rodičovským druhům prokázána nižší pylová viabilita (ANOVA, DF= 28, F = 1,00, p = 0,410; obr. 15c, tab. 7).

4.2.5 Srovnání pylové viability na jednotlivých ploidních úrovních

Při porovnání procenta pylové viability mezi diploidními taxony rodu *Ornithogalum* byla prokázána signifikantně nižší viabilita pylu u taxonu *O. kochii* (77 %) z podrodu *Ornithogalum* oproti *O. pannonicum* (92 %) ze stejného podrodu a *O. brevistylum* (96 %) z podrodu *Beryllis* (Tukey-Kramerův test, DF = 19, critical value = 3,6000; obr. 16a, tab. 7).

Z obou studovaných triploidních taxonů má signifikantně nižší pylovou viabilitu hybridní taxon *O. ×wildtii* (16%) oproti *O. umbellatum* (72 %; T-test, t = 4,5150, DF = 8, p = 0,002; obr. 14c,e; 16b; tab. 7). Signifikantní odlišnost v procentu pylové viability byla u tetraploidních zástupců rodu *Ornithogalum* prokázána mezi taxony *O. kochii* a *O. mutans* (Dunnův test, obr. 16c, tab.6)



Obrázek 16 Pylová viabilita (barvitelnost) u střeoevropských zástupců rodu *Ornithogalum*, a) diploidní taxony, b) triploidní taxony, c) tetraploidní taxony (tělo box-plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř box-plotu medián, vousy zbytek variability)

Tabulka 6 Výsledky Dunnova testu mnohonásobného porovnání pylové viability tetraploidních taxonů rodu *Ornithogalum*
 * = signifikantní rozdíl ($p < 0,05$; $z > 2,6383$).

Taxon	2n	<i>O. boucheanum</i>	<i>O. nutans</i>	<i>O. kochii</i>	<i>O. ×degenianum</i>
		4x	4x	4x	4x
<i>O. boucheanum</i>	4x	0,0000	2,0094	1,0287	0,8297
<i>O. nutans</i>	4x	2,0094	0,0000	3,1088*	2,2641
<i>O. kochii</i>	4x	1,0287	3,1088*	0,0000	0,1543
<i>O. ×degenianum</i>	4x	0,8297	2,2641	0,1543	0,0000

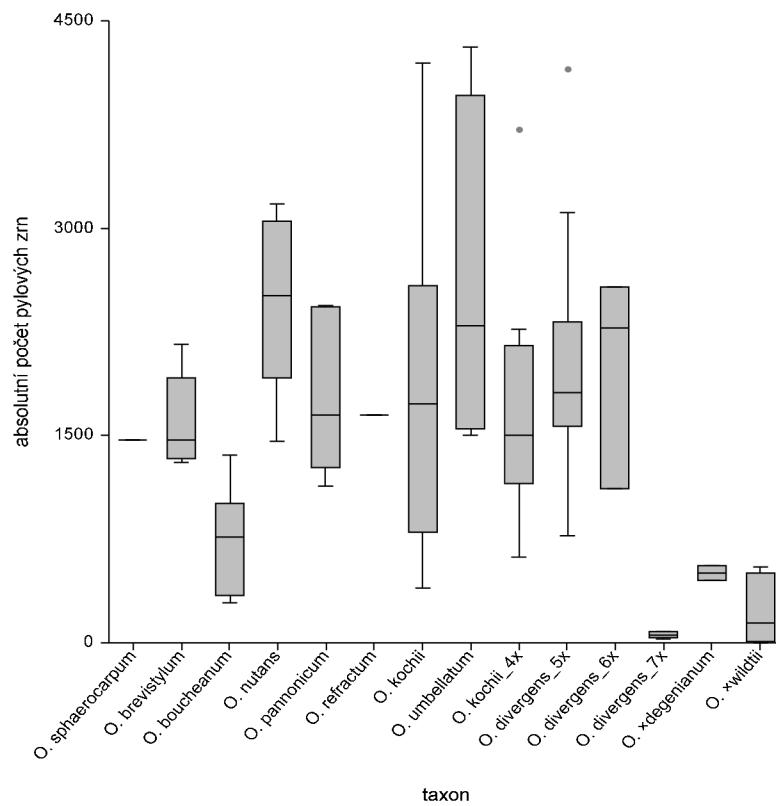
Tabulka 7 Pylová viabilita ve vztahu ke konkrétním taxonům, N–počet jedinců, μ –aritmetický průměr, SD–směrodatná odchylka

Podrod	Taxon	Ploidie	N	Pylová viabilita [%]			Variabilita [%]
				Min	Max	$\mu \pm SD$	
<i>Beryllis</i>	<i>O. pyrenaicum</i> subsp. <i>sphaerocarpum</i>	2x	1			99	
	<i>O. brevistylum</i>	2x	5	90	100	96 \pm 3	10,40
<i>Myogalum</i>	<i>O. boucheanum</i>	4x	6	55	99	89 \pm 16	49,72
	<i>O. nutans</i>	4x	5	99	100	100 \pm 0	1
<i>Ornithogalum</i>	<i>O. pannonicum</i>	2x	5	75	99	92 \pm 10	26,20
	<i>O. refractum</i>	5x	1			51	
	<i>O. kochii</i>	2x	12	56	98	78 \pm 11	54,14
	<i>O. umbellatum</i>	3x	4	56	89	72 \pm 15	45,99
	<i>O. kochii</i>	4x	8	65	99	81 \pm 13	42,17
	<i>O. divergens</i>	5x	22	54	99	86 \pm 12	52,46
	<i>O. divergens</i>	6x	3	28	42	35 \pm 6	40
	<i>O. divergens</i>	7x	4	34	73	54 \pm 16	72,22
Hybridní taxony	<i>O. ×degenianum</i>	4x	2	72	78	75 \pm 3	8
	<i>O. ×wildtii</i>	3x	6	0	46	15 \pm 19	303,30
Celkem			84				
Průměr						73	

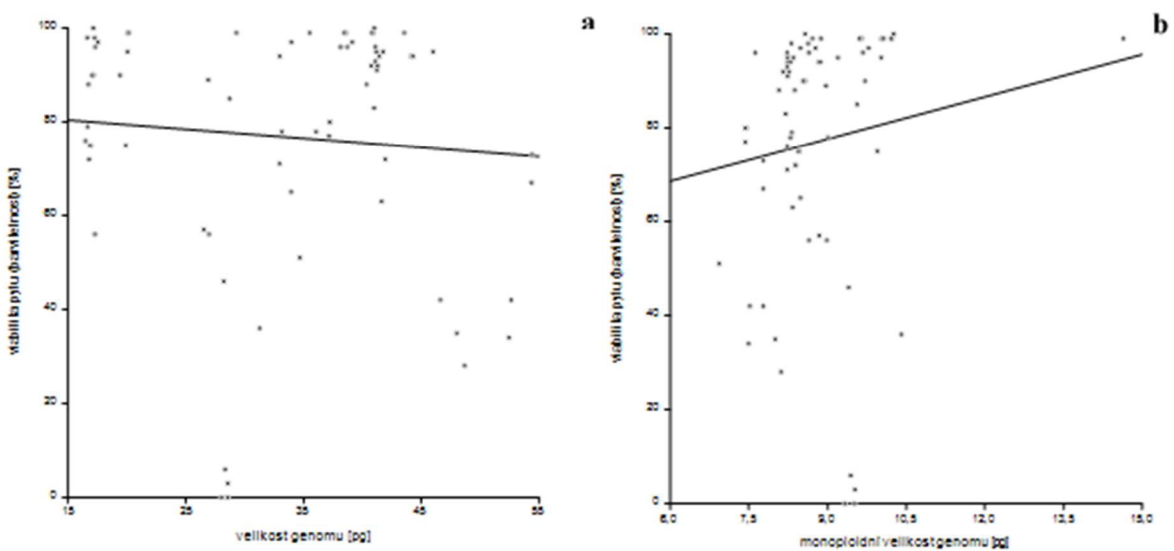
4.2.6 Absolutní počty pylových zrn

V rámci studovaného souboru jedinců byl průměrný počet 1459 pylových zrn ze třech prašníků, kdy v každém bylo pod mikroskopem spočítáno zcela náhodně šest zorných polí. Nejnižší počty byly zjištěny u triploidního hybridního taxonu *O. × wildtii* (4 pylová zrna) a u heptaploidního *O. divergens* (29 pylových zrn; obr. 17, tab. 8). Taxon *O. × wildtii* taktéž vykazoval v počtu pylových zrn největší variabilitu (243,23 %) mezi nejmenším a největším počtem zrn v jednom zorném poli. Velká variabilita byla též zjištěna u diploidního *O. kochii* (211,03 %). Nejméně variabilní v počtu pylových zrn byl hybridní taxon *O. ×degenianum* (20,38 %), tento výsledek však lze předpokládat vzhledem k tomu, že byl počet pylových zrn zjišťován pouze u dvou

jedinců. Dále byla nižší variabilita zjištěna u diploidního *O. brevistylum* (53,44 %) a tetraploidního *O. nutans* (69,26 %; obr. 17, tab. 8)



Obrázek 17 Počet pylových zrn v šesti zorných polích ve třech prašnicích (tělo box-plotu znázorňuje 25–75 % rozpětí variability, čára uvnitř box-plotu medián, vousy zbytek variability a tečky odlehle hodnoty).



Obrázek 18 Korelace velikosti genomu a pylové viability u studovaného souboru jedinců rodu *Ornithogalum*, a) absolutní velikost genomu vs. pylová viabilita (Pearsonův korelační koeficient, $r = -0,0816$, $p = 0,496$), b) monoploidní velikost genomu vs. pylová viabilita (Pearsonův korelační koeficient, $r = 0,1214$, $p = 0,310$)

Tabulka 8 Absolutní počet pylových zrn stanovený z šesti mikroskopických zorných polí pro tři prašníky v rámci jedince
Počet jedinců (N), Průměr (μ), Standardní odchylka (SD).

Podrod	Taxon	Ploidie	N	Absolutní počet pylových zrn (6 zorných polí / 3 prašníky / jedinec)			Variabilita [%]
				Min	Max	$\mu \pm SD$	
<i>Beryllis</i>	<i>O. pyrenaicum</i> subsp. <i>sphaerocarpum</i>	2x	1			1467	
	<i>O. brevistylum</i>	2x	5	1306	2158	1594 \pm 309	53,44
<i>Myogalum</i>	<i>O. boucheanum</i>	4x	6	290	1356	737 \pm 355	144,67
	<i>O. nutans</i>	4x	5	1457	3181	2489 \pm 591	69,26
<i>Ornithogalum</i>	<i>O. pannonicum</i>	2x	5	1136	2443	1807 \pm 549	72,31
	<i>O. refractum</i>	5x	1			1651	
	<i>O. kochii</i>	2x	12	396	4197	1801 \pm 1087	211,03
	<i>O. umbellatum</i>	3x	4	1505	4311	2601 \pm 1130	107,87
	<i>O. kochii</i>	4x	8	617	3712	1724 \pm 879	179,58
	<i>O. divergens</i>	5x	22	771	4149	1981 \pm 719	170,50
	<i>O. divergens</i>	6x	3	1117	2578	1992 \pm 630	73,36
	<i>O. divergens</i>	7x	4	29	81	54 \pm 21	95,85
Hybridní taxony	<i>O. \timesdegenianum</i>	4x	2	454	557	506 \pm 52	20,38
	<i>O. \timeswildtii</i>	3x	6	4	546	223 \pm 220	243,23
Celkem			84				
Průměr						1459	

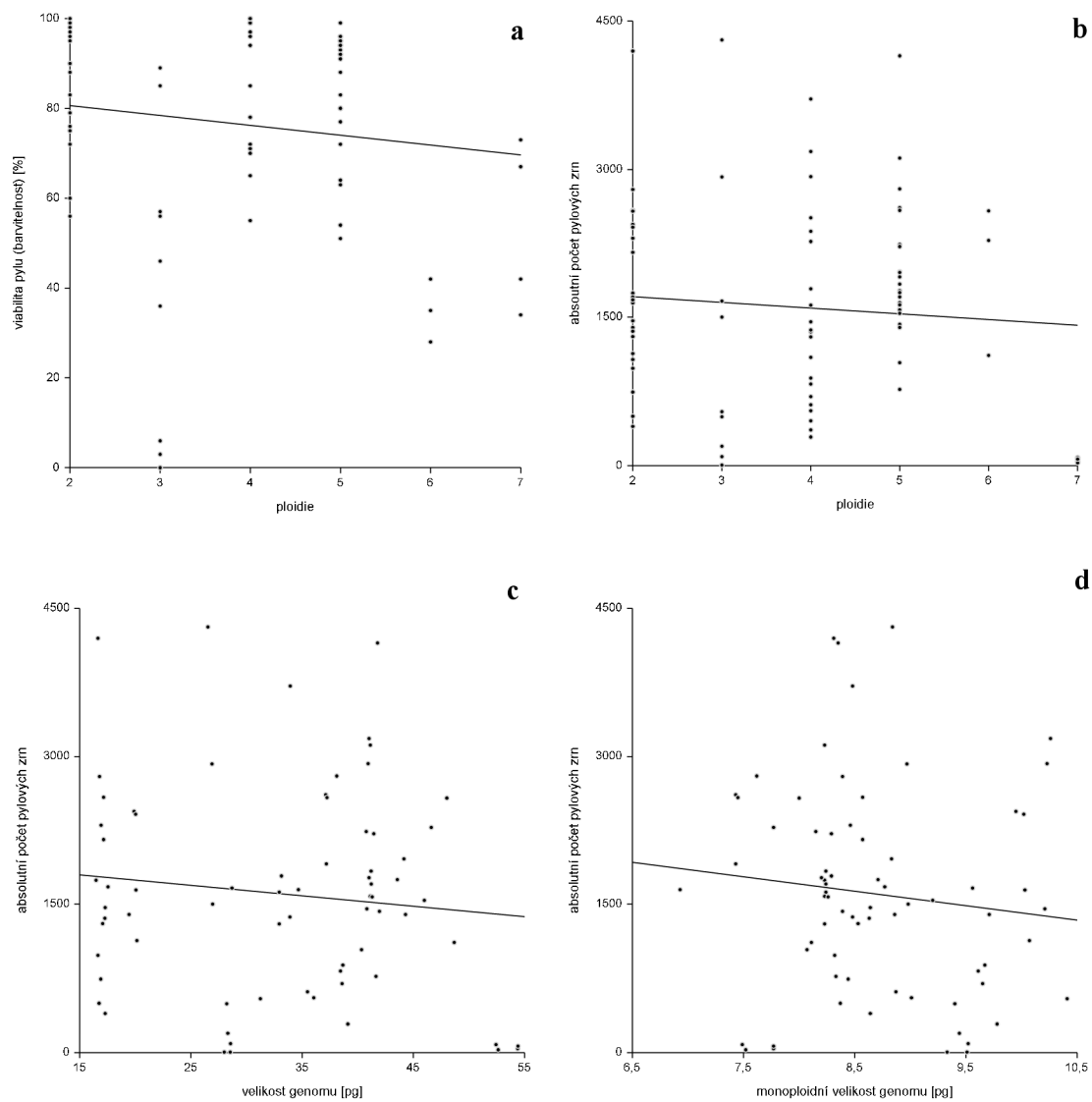
4.2.7 Vztah pylové viability, velikosti genomu a ploidní úrovně

U studovaného souboru jedinců dochází k mírnému poklesu viability pylu s rostoucí absolutní velikostí genomu, avšak tento pokles není potvrzen jako statisticky významný (obr. 18a). S tím souvisí i výsledek mírně negativní korelace, kdy viabilita mírně klesá s rostoucím ploidním stupněm, ale opět ne signifikantně (obr. 19a). Naopak s rostoucí monoploidní velikostí genomu dochází k mírně pozitivní korelaci v nárůstu pylové viability, ale i přesto, že je zde korelace silnější než v přechozím případě, nelze ji považovat za statisticky významnou (obr. 18b). S rostoucí ploidíi můžeme také pozorovat mírný pokles počtu pylových zrn, který byl spočítán vždy ze šesti zorných polí pod mikroskopem ve třech prašnicích na jedince (obr. 19b), avšak opět se nejedná o signifikantní výsledek. Jako statisticky významný výsledek nebylo porvrzeno ani snižování počtu pylových zrn s rostoucí velikostí genomu, ikdyž se v tomto vztahu objevuje mírně negativní korelace (obr. 19a, b). Je tedy patrné, že viabilita pylu ani množství pylových zrn významně nezávisí na rostoucí velikosti genomu ani na rostoucí ploidní úrovni.

S rostoucí variabilitou v počtu pylových zrn u daného taxonu mírně klesá celková hodnota pylové viability, ale tento rozdíl nebyl potvrzen jako statisticky významný (obr. 20a). Bylo však

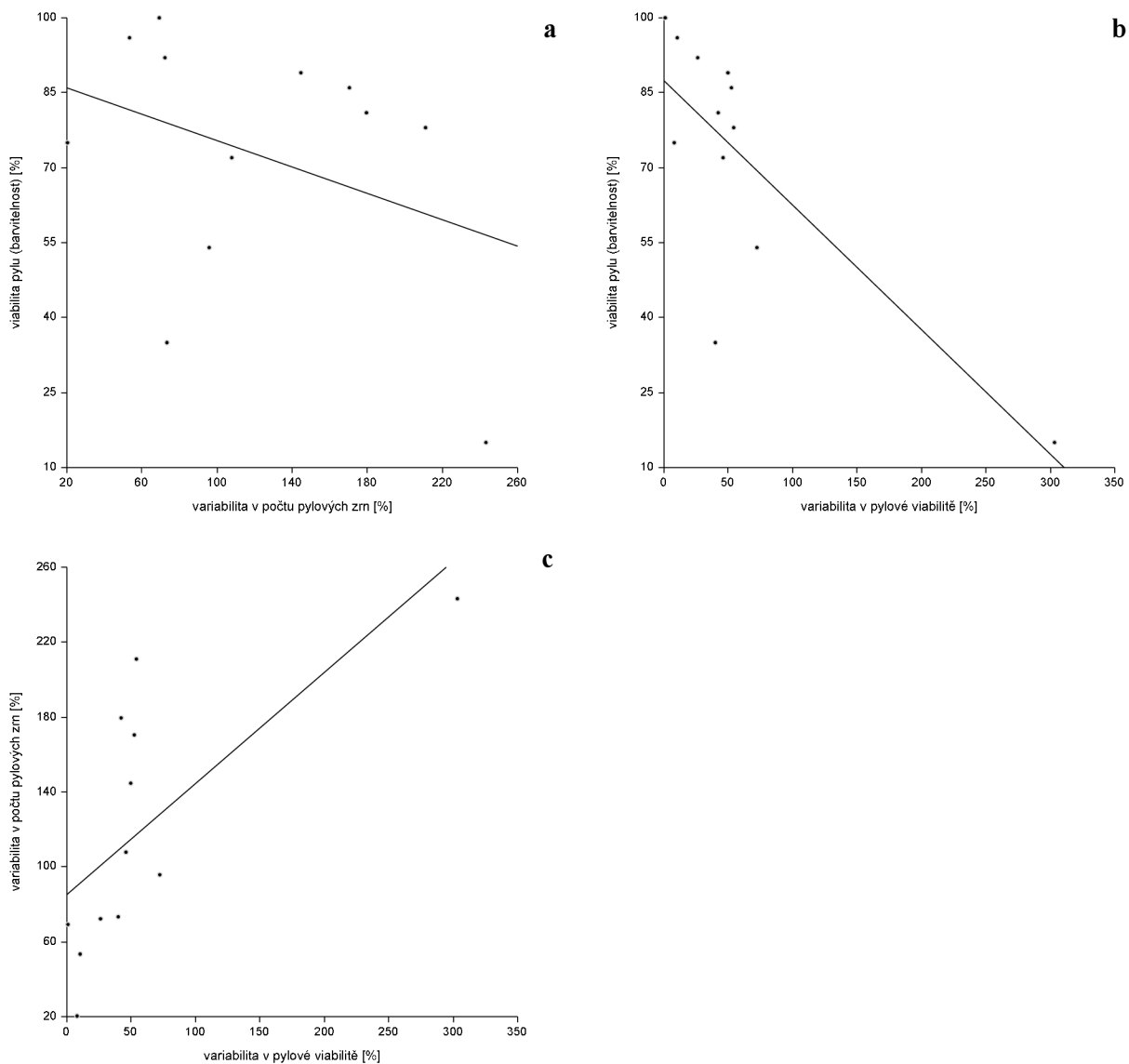
prokázáno, že čím více je daný taxon variabilní v hodnotách pylové viability, tím má pylovou viabilitu menší (obr. 20b) a současně čím více je taxon variabilní v hodnotách pylové viability, tím větší variabilita se u něj také vyskytuje v počtu pylových zrn (obr. 20c).

V případě analýzy taxonů pouze z podrodu *Ornithogalum* byla zjištěna negativní korelace mezi velikostí genomu a pylovou viabilitou, kdy s rostoucí velikostí genomu viabilita klesala (obr. 21a). Tento vztah nebyl potvrzen jako statisticky signifikantní, avšak jako statisticky významná byla vyhodnocena pozitivní korelace, kdy s rostoucí monoploidní velikostí genomu dochází u taxonů z tohoto podrodu k růstu pylové viability (obr. 21b). Rovněž dochází k významnému poklesu pylové viability s rostoucím ploidním stupněm u tohoto podrodu (obr. 21c). Stejně

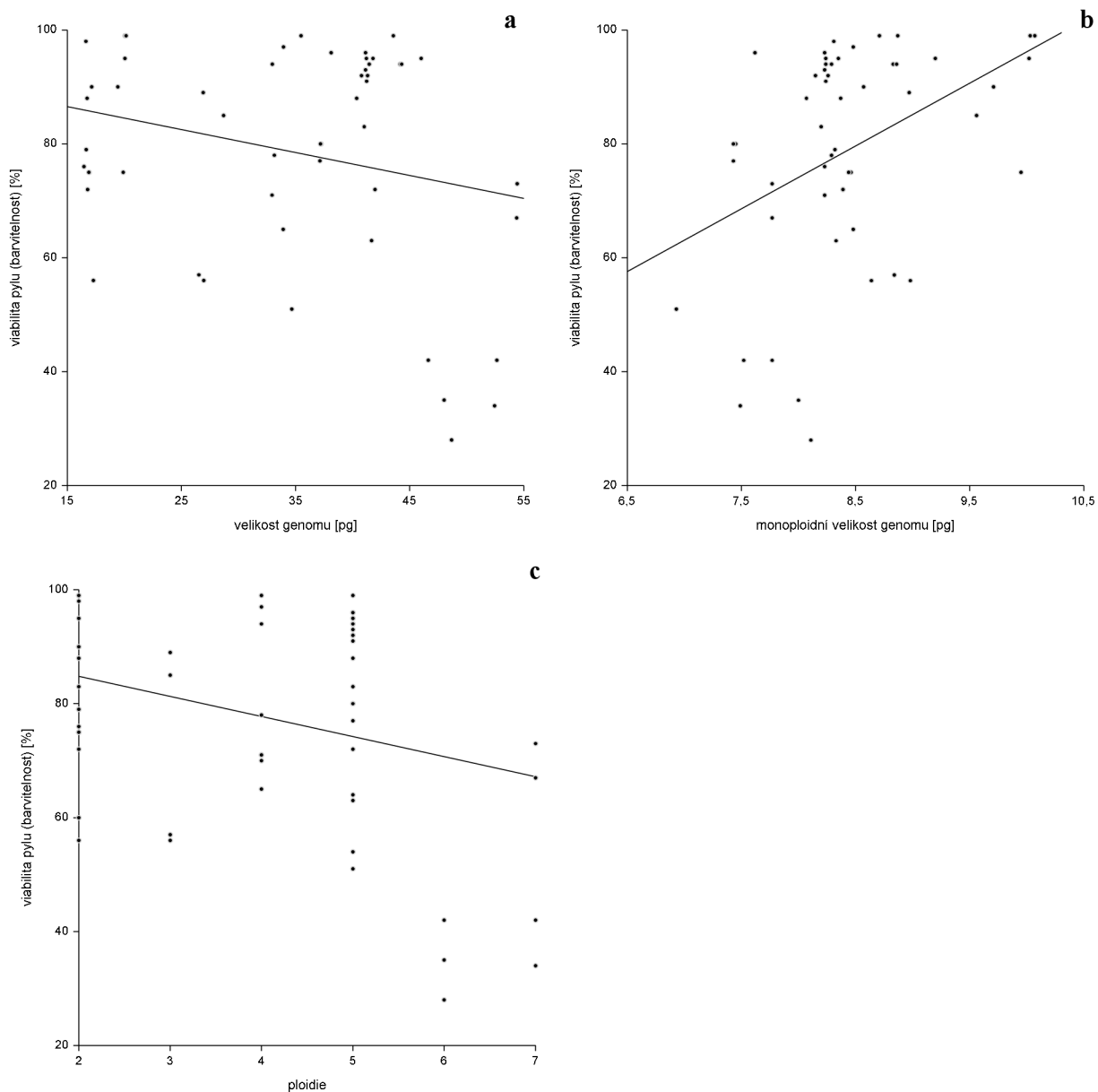


Obrázek 19 Korelace u studovaného souboru jedinců rodu *Ornithogalum* a) ploidy vs. pylová viabilita (Pearsonův korelační koeficient, $r = -0,1249$, $p = 0,258$), b) ploidy vs. absolutní počet pylových zrn (Pearsonův korelační koeficient, $r = -0,0840$, $p = 0,447$), c) absolutní velikost genomu vs. počet pylových zrn (Pearsonův korelační koeficient, $r = -0,1124$, $p = 0,351$), d) monoploidní velikost genomu vs. počet pylových zrn (Pearsonův korelační koeficient, $r = -0,1123$, $p = 0,351$).

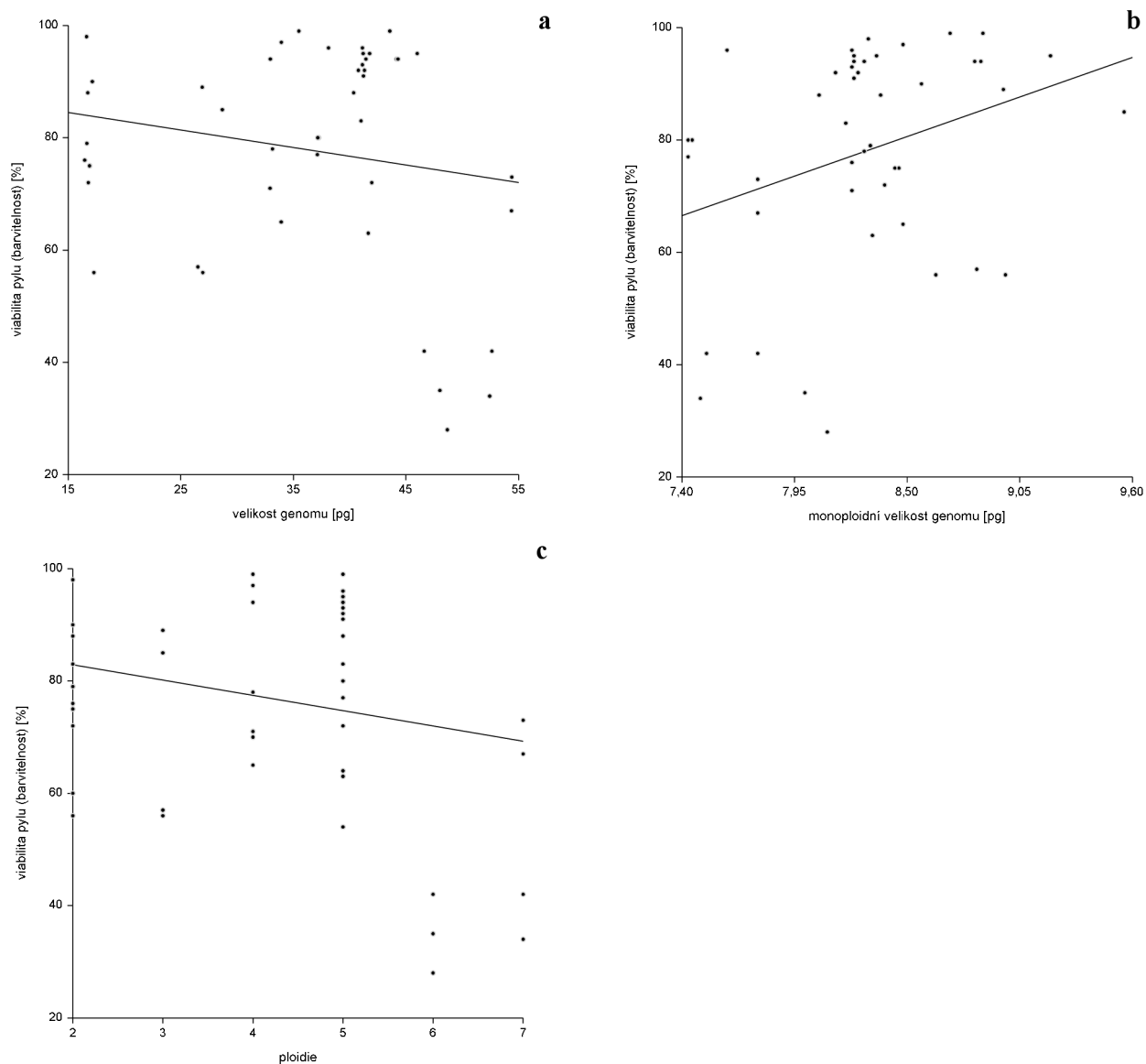
vztahy byly testovány taktéž jen pro polyploidní komplex *Ornithogallum umbellatum* agg., tedy bez taxonů *O. refractum* a *O. pannonicum*. Jediná signifikantní závislost byla potvrzena ve vztahu mezi monoploidní velikostí genomu a pylovou viabilitou, kdy, stejně jako u celého podrodu, dochází s rostoucí monoploidní velikostí genomu k růstu pylové viability (obr. 22b). U skupiny *O. umbellatum* agg. nebyla, narozdíl od celého podrodu *Ornithogalum*, statisticky potvrzena závislost mezi ploidním stupněm a viabilitou pylu (obr. 22c).



Obrázek 20 Korelace u studovaného souboru jedinců rodu *Ornithogalum* a) variabilita v absolutním počtu pylových zrn vs. pylová viabilita taxonu (Pearsonův korelační koeficient, $r = -0,3544$, $p = 0,2584$), b) variabilita ve viabilitě pylu vs. pylová viabilita (Pearsonův korelační koeficient, $r = -0,7720$, $p = 0,003$), c) variabilita ve viabilitě pylu vs. variabilita v absolutním počtu pylových zrn (Pearsonův korelační koeficient, $r = 0,6873$, $p = 0,014$).



Obrázek 21 Korelace velikosti genomu, ploidie a pylové viability u taxonů z podrodu *Ornithogalum* a) absolutní velikost genomu vs. pylová viabilita (Pearsonův korelační koeficient, $r = -0,2485$, $p = 0,0756$), b) monoploidní velikost genomu vs. pylová viabilita (Pearsonův korelační koeficient, $r = 0,4045$, $p = 0,003$), c) ploidní stupeň vs. pylová viabilita (Pearsonův korelační koeficient, $r = -0,2987$, $p = 0,022$).



Obrázek 22 Korelace velikosti genomu, ploidie a pylové viability u taxonů z polyploidního komplexu *Ornithogalum umbellatum* agg. a) absolutní velikost genomu vs. pylová viabilita (Pearsonův korelační koeficient, $r = -0,1885$, $p = 0,210$), b) monoploidní velikost genomu vs. pylová viabilita (Pearsonův korelační koeficient, $r = 0,3148$, $p = 0,033$), c) ploidní stupeň vs. pylová viabilita (Pearsonův korelační koeficient, $r = -0,2245$, $p = 0,106$).

5 Diskuse

5.1 Velikost genomu, DNA ploidní úroveň, pylová viabilita a jejich variabilita v taxonomických skupinách

V rámci cévnatých rostliny se setkáme s až 2400násobným rozdílem ve velikosti genomu, kdy se nejmenší genomy nachází u čeledi *Lentibulariaceae* (Fleischmann et al. 2014) a největší u čeledi *Melanthiaceae* (Pellicer et al. 2010). Leitch et al. (1998) ve své studii kategorizují druhy na základě velikosti genomu do čtyř skupin: s velmi malým genomem ($2C \leq 1,4$ pg), s malým genomem ($2C \leq 3,5$ pg), s velkým genomem ($2C \geq 14$ pg) a s velmi velkým genomem ($2C \geq 35$ pg). Velké a velmi velké genomy jsou obecně typické hlavně pro jednoděložné, konkrétně pro geofytní rostliny (Grime & Mowforth 1982, Veselý et al. 2012, Pellicer et al. 2018), mezi které patří i studované taxony v této práci, u kterých byla zjištěna průměrná velikost genomu 33,15 pg. Všechny studované druhy patří do skupin s velkým a velmi velkým genomem, přičemž mírně převažují taxony s velmi velkým genomem.

Rod *Ornithogalum* představuje poměrně náročnou skupinu z hlediska analýzy měření velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie, a to především kvůli přítomnosti sekundárních metabolitů, které značně komplikují proces měření. U měřených vzorků se pohybovala hodnota CV mezi 1,06 a 6,32, kdy se hraniční hodnoty CV pro měření podobají hodnotám i v dalších studiích (např. Bardy et al. 2010, Kolarčík et al. 2015, Koblřová & Hroneš 2019).

Soubory jedinců v rámci studovaných taxonů v této práci jsou dosti nevyrovnané, kdy byly některé taxony zastoupeny výrazně nižším počtem jedinců než ostatní. Hlavním důvodem byly především zákazy a omezení v důsledku pandemie koronaviru, které znemožnily během dvou sezón po sobě vycestovat do zahraničí pro sběr rostlinného materiálu. Tyto rozdíly mohly tak ovlivnit některé zde uváděné výsledky.

Podrod *Beryllis*

Na základě naměřené velikosti genomu u druhů *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* ($2C = 29,46$ pg) a *O. brevistylum* ($2C=17,26$ pg) bylo prokázáno, že až téměř dvakrát menší velikost genomu se vyskytuje u taxonu *O. brevistylum* než u druhého taxonu. Ke stejným výsledkům dospěli ve svých studiích také Zonneveld et al. (2005) a Zonneveld (2019), kdy u *O. brevistylum* (v jejich práci označovaném jako *O. pyramidale*) udávají velikost genomu 17,3 pg a u *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* uvádějí 31,1 pg (Zonneveld et al. 2005) a 30,2 pg

(Zonneveld 2019). Menší, avšak stále srovnatelnou velikost genomu u druhu *O. brevistylum* $2C = 15,25$ pg zjistili ve své práci Šmarda et al. (2019). Oba taxony bychom mohli označit za taxony s velkým genomem (Leitch et al. 1998). Pokud bychom ale měli odhadnout ploidní stupeň u těchto dvou druhů pouze na základě zjištěné velikosti genomu, došli bychom k závěru, že taxony vykazují rozdílné ploidní úrovně a sice, diploidní (*O. brevistylum*) a tetraploidní (*O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum*). V případě, že bychom ploidii obou druhů odhadovali pouze podle počtu chromozomů, došli bychom pravděpodobně k závěru, že *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* je diploid s $2n = 18$ (Hrouda 1980) a *O. brevistylum* je triploid s $2n = 24$ (Hrouda 1980, Tornadore & Orza 1987). I přes tento zjevný nesoulad mezi počtem chromozomů, velikostí genomu a ploidii, uvádí Hrouda (1980) na základě studia meiotického chování chromozomů a karyotypu somatických chromozomů, že jsou oba druhy diploidní a při mitózách a meiózách dochází k dokonalému párování chromozomů. Dále také udává, že se u taxonu *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum*, i přesto, že má menší počet chromozomů, vyskytují větší pylová zrna než u *O. brevistylum*. Je tedy logické, že se u tohoto taxonu budou také nacházet větší chromozomy, než u *O. brevistylum*. Oba tyto diploidní zástupci podrodu *Beryllis* vykazují vysokou pylovou viabilitu (> 90 %) a bezproblémovou tvorbu pylových zrn. To vše proto nepřímo potvrzuje, že jsou oba druhy diploidní. Hrouda (1980) tak ve své práci dochází k závěru, že oba taxony náleží k cytologicky odlišným skupinám podrodu *Beryllis* s rozdílným základním chromozomovým číslem. Karyologické a cytologické procesy u obou druhů by bylo vhodné dále studovat za pomoci modernějších metod, např. *in situ* hybridizace.

Podrod *Myogalum*

V podrodu *Myogalum* byla zjištěna u druhů *O. boucheanum* a *O. nutans* na základě velikosti genomu shodná ploidní úroveň, a to DNA-tetraploidní. Tento výsledek, je poměrně překvapivým zjištěním, jelikož se tradičně uvádí (např. Lauber 1947, Holzer 1952, Ludwig & Lenski 1969 cf. Hrouda 1980; Hrouda 1980, 2010), že druhy *O. boucheanum* a *O. nutans* tvoří polyploidní řadu se základním počtem chromozomů $x = 7$, přičemž *O. boucheanum* představuje tetraploidní a *O. nutans* hexaploidní taxon. U taxonu *O. boucheanum* se v mnoha studiích objevují shodné počty chromozomů $2n = 28$, které tetraploidní úrovni opravdu odpovídají (Lungeanu 1972, Hrouda 1980, 2007; Májovský et al. 1987, Markova & Goranova 1996, Speta 2000), ale u *O. nutans* je situace poněkud komplikovanější. Často uváděným počtem chromozomů u *O. nutans* je $2n = 42$ (Lauber 1947, Holzer 1952, Ludwig & Lenski 1969 cf. Hrouda 1980; Skalinska et al. 1976; Hrouda 1980; Speta 2000), což při základním

chromozomovém čísle $x=7$ odpovídá již zmíněné hexaploidní úrovni. Nutno dodat, že se ovšem u tohoto druhu objevují v literatuře velmi různorodé počty chromozomů (např. Dalgıç & Özhatay, 1997: $2n = 14$; Johnson & Brandham, 1997: $2n = 18$; Dalgıç et al., 2009: $2n = 35$; Meriç et al., 2011: $2n = 14, 15, 35, 40, 41$; Zonneveld, 2019: $2n = 14-42$), které často odpovídají různým ploidním stupňům. Kdyby taxony opravdu byly z jedné polyploidní řady se základním chromozomovým číslem $x = 7$ a *O. nutans* byl hexaploidní taxon, bylo by pravděpodobné, že by u něj byla potvrzena mnohem větší velikost genomu než u *O. boucheanum*, konkrétně kolem hodnoty 58 pg (vycházíme-li z hodnot monoploidní velikosti genomu tetraploidního *O. boucheanum* naměřených v této práci $1Cx = 9,71$ pg). I přesto, že u *O. nutans* byla opravdu zjištěna signifikantně větší velikost genomu, pohybovala se jen kolem 40 pg, které stále odpovídají DNA-tetraploidní úrovni. Obdobnou velikost genomu uvádějí ve svých studiích i Zonneveld et al. (2005) a Zonneveld (2019), a to 43,9 pg. Karaguzel et al. (2020) ve své práci naměřili u tohoto taxonu 45,7 pg. Tyto velikosti genomu jasně potvrzují, že se nejedná o hexaploidní taxon, nýbrž poukazují na nižší ploidní úroveň, pravděpodobně tetraploidní. Heitz (1926) v své práci tetraploidní počet chromozomů $2n = 28$ pro tento taxon udává (cf. Hrouda 1980), avšak tuto informaci Hrouda (1980) vyvrací a tvrdí, že daný počet chromozomů se vztahuje jistě k *O. boucheanum*. Karaguzel et al. (2020), kteří ve své studii pracovali s rostlinným materiálem pocházejícím z území Turecka, považují *O. nutans* také za tetraploidní taxon. Kdybychom předpokládali, že oba taxony *O. boucheanum* a *O. nutans* mají stejné základní chromozomové číslo a stejnou ploidní úroveň, pravděpodobně by musel taxon *O. nutans* podle své velikosti genomu disponovat většími chromozomy, než *O. boucheanum*. Hrouda (1980) však ve své práci udává fakt, že se u *O. boucheanum* vyskytují nejdelší chromozomy ze všech evropských druhů, což tuto myšlenku nepodporuje. Další možností ale také může být to, že je *O. nutans* opravdu hexaploidním taxonem, ale naopak se u něj mohou vyskytovat velmi malé chromozomy, které by zdůvodnily menší velikost genomu, než která by se předpokládala pro hexaploidní ploidní úroveň. Objasnění velikosti genomu a ploidní úrovně u taxonu *O. nutans* potřebuje však bezpochybně ještě další komplexnější studium. U *O. boucheanum* byla zjištěna poměrně velká variabilita ve velikosti genomu s rozmezím od 36 do 41 pg, na tento fakt upozorňuje ve své práci také Píchalová (2017), která tuto variabilitu vysvětluje možností výskytu aneuploidních jedinců v rámci tohoto taxonu, jejichž možný výskyt zmiňuje i Hrouda (1980). Variabilita ve velikosti genomu může být také způsobena rozdíly v obsahu repetitivních úseků nekódující DNA (Bennetzen et al. 2005, Soltis et al 2015).

U taxonu *O. nutans* byla potvrzena velmi vysoká pylová viabilita (100%), nejvyšší z celého studovaného souboru taxonů. Naopak *O. boucheanum* vykazoval viabilitu nižší, v průměru 89 % a zároveň u něj byla zjištěna až 50% variabilita v hodnotách pylové viability. To napovídá tomu, že se u tohoto taxonu vyskytují určité meiotické poruchy, které jsou způsobené hlavně velmi různorodým karyotypem a tím pádem špatným párováním chromozomů (Hrouda 1980). U *O. boucheanum* můžeme také sledovat až 145% variabilitu ve zjištěném počtu pylových zrn, kdy by právě meiotické poruchy mohly tyto výkyvy vysvětlovat.

Podrod *Ornithogalum*

Velmi cytologicky rozmanitý je podrod *Ornithogalum*, ve kterém bylo v této práci zjištěno hned šest ploidních úrovní od diploidní po heptaploidní. Studovaní zástupci této skupiny mají stejné základní chromozomové číslo $x = 9$. Můžeme se zde setkat se dvěma diploidními druhy *O. pannonicum* a *O. kochii*, jejichž ploidní úroveň byla potvrzena i mnoha dalšími autory (např. Tornadore & Garbari 1979, Hrouda 1980, van Raamsdonk 1986, Garbari et al. 2003). Tyto diploidní taxony se od sebe významně liší svou velikostí genomu ale i viabilitou pylu. Větší genom se vyskytuje u *O. pannonicum*, u kterého byla potvrzena i vysoká pylová viabilita (>90 %), signifikantně vyšší než u *O. kochii*, který měl viabilitu dosti sníženou, v průměru 78 %. Každý z těchto dvou druhů však řadíme do jiné skupiny v rámci podrodu *Ornithogalum* (*O. kochii* je součástí polyploidního komplexu *O. umbellatum* agg.), tudíž se jedná i o dosti odlišné taxony z hlediska morfologických znaků i ekologického a geografického výskytu (Hrouda 1980).

Mezi pentaploidní zástupce tohoto podrodu řadíme taktéž dva taxony a to *O. refractum* a *O. divergens*. V literatuře se můžeme setkat s různorodými informacemi, které se týkají ploidie u taxonu *O. refractum*. Například van Raamsdonk (1986) u tohoto druhu ve své práci uvádí hexaploidní úroveň s počtem chromozomů $2n = 54$, a cituje i další autory, kteří dospěli ke stejnému výsledku. Další autory, kteří uvádí stejný počet chromozomů citují např. Peruzzi & Passalacqua (2002). Často se jedná o počty chromozomů u rostlin z území Bulharska, Rumunska a Moldavska. Tentýž počet chromozomů uvádí i Garbari et al. (2003) z území Itálie. Ovšem jiná ploidní úroveň, pentaploidní, s počtem chromozomů $2n = 45$ byla prokázána u téhož taxonu pocházejícího z okolí Budapešti, což je „locus classicus“ tohoto druhu (Speta 2010). V mé práci byl studován pouze jeden jedinec taxonu *O. refractum*, který pochází zhruba ze stejného území (Győr), a proto je na základě místa sběru a naměřené velikosti genomu tedy považován za pentaploida. Pro přesné stanovení ploidního stupně je však nezbytné v dalším

studiu spočítat přesný chromozomový počet daného jedince. Druhý pentaploidní taxon *O. divergens*, řadíme do polyploidního komplexu *O. umbellatum* agg. Velikost genomu ani pylovou viabilitu zjištěnou u těchto dvou druhů nelze příliš srovnávat z důvodu nerovnoměrného počtu vzorků studovaných v této práci. Nicméně větší velikost genomu byla zjištěna právě u druhu *O. divergens*, který taktéž vykazoval i vyšší viabilitu pylu, v průměru 86 %. Ovšem v rámci studovaného souboru jedinců pro tento taxon se u některých z nich vyskytovaly hodnoty viability pylu kolem 50 %, což je hodnota, která byla zjištěna i u studovaného jedince *O. refractum*. Pro porovnání viability těchto dvou pentaploidních druhů by bylo jisté za potřeby mít k dispozici více vzorků taxonu *O. refractum*.

Do polyploidní řady *O. umbellatum* agg. patří také, vedle výše zmíněných taxonů (tj. diploidního *O. kochii* a pentaploidního *O. divergens*), další taxony, a to triploidní *O. umbellatum*, tetraploidní cytotyp *O. kochii* a další dvě ploidní úrovně *O. divergens*, hexaploidní a heptaploidní. Zjištění heptaploidního taxonu v tomto podrodu je novým poznatkem, který byl poprvé v literatuře zmíněn v práci autorů Kunzová et al. (2020), kde bylo pro tento taxon pracováno se stejným rostlinným materiálem, jako v mé studii. Nově zjištěná ploidní úroveň byla v rámci této práce přiřazena k taxonu *O. divergens*, u kterého Hrouda (1980) ve své práci výskyt i vyšší ploidie než penta- a hexaploidní připouští, avšak úroveň ploidie blíže nekonkretizuje. U této nově zjištěné ploidie je zajisté potřeba další studium, především zjistit přesný počet chromozomů. O to se pokoušeli Kunzová et al. (2020) a dospěli k přibližnému počtu chromozomů $2n \sim 60$, což heptaploidní úroveň potvrzuje, stejně tak jako zjištěná velikost genomu v této práci.

V této polyploidní řadě můžeme sledovat zajímavou závislost a to, že dochází ke zmenšování monoploidní velikosti genomu s rostoucím ploidním stupněm. Tím bylo dokázáno, že se v tomto komplexu můžeme setkat s běžně se vyskytujícím fenoménem mezi krytosemennými rostlinami, při kterém dochází po procesu polyploidizace ke ztrátám nekódujících sekvencí DNA (Leitch & Bennett 2004, Pellicer et al. 2018). Jedná o tzv. „genome downsizing“, jehož výskyt pozorovalo u polyploidních druhů různých rodů (čeledí) i několik dalších autorů (např. Eilam et al. 2010: *Triticeae*, Höffer & Meister, 2010: *Malus*; Zonneveld, 2010: *Hepatica*; López et al., 2011: *Turnera*; Möller, 2018: *Streptocarpus*; Bancheva & Greilhuber, 2006: *Centaurea*). Zmenšování velikosti monoploidního genomu je patrné u pentaploidního, hexaploidního a heptaploidního taxonu v porovnání s diploidy této skupiny. Tomuto jevu věnují ve své práci pozornost také například Galdeano et al. (2016) u rodu *Paspalum*, kde potvrdili v rámci různých cytotypů téhož taxonu tři možnosti změny monoploidní velikosti genomu. U některých taxonů

uvádí zvětšování, u jiných naopak zmenšování monoploidní velikosti genomu s rostoucí ploidií u polyploidních cytotypů v porovnání s diploidy daného druhu, avšak u většiny zkoumaných polyploidních cytotypů neprokázali signifikantní zvětšení ani zmenšení monoploidní velikosti genomu vzhledem k diploidním cytotypům téhož taxonu. Tyto výsledky, jak autoři uvádějí, se příliš neshodují s obecnou tendencí zmenšování genomu u polyploidních cytotypů, kterou pozorovali Leitch & Bennett (2004). Právě opačná tendence, tedy zvětšování genomu s rostoucí ploidií, byla v rámci jejich studie (Galdeano et al. 2016) výrazně prokázána u triploidního taxonu *Paspalum simplex*. Stejná tendence byla pozorována i v této práci u triploidních zástupců skupiny *O. umbellatum* agg., kteří vykazovali nárůst velikosti genomu v porovnání s diploidy z této skupiny o 2,5 %. Ve studii Leitch & Bennett (2004) byly všechny liché ploidie vyřazeny z analýz z důvodu nereprezentativního vzorku. Tento významný vztah, zmenšování monoploidní velikosti genomu s rostoucím ploidním stupněm, byl potvrzen zároveň v celém studovaném souboru populací rodu *Ornithogalum* v této práci.

U obou cytotypů taxonu *O. kochii* lze pozorovat stejnou monoploidní velikost genomu. Tento fakt může poukazovat na autopolyploidní vznik tetraploidního cytotypu v průběhu evoluce z diploidního *O. kochii*, což ve své práci předpokládá i Hrouda (1980). Galdeano et al. 2016 se ve své studii rodu *Paspalum* mimo jiné také zabývali velikostí genomu autotetraploidní rostliny uměle vytvořené z diploidní rostliny za pomoci působení kolchicinu a zjistili u těchto dvou jedinců stejnou monoploidní velikost genomu, což podporuje tvrzení, že polyploidní cytotypy v rámci jedné polyploidní řady určitého taxonu mohly vzniknout právě cestou autopolyploidizace.

Existuje několik studií, v rámci kterých byla nalezena korelace mezi nízkou pylovou viabilitou a meiotickými abnormalitami u autopolyploidních taxonů. Příkladem může být studie rodu *Onosma* (Kolarčík et al. 2015), kde vedle vysoké pylové viability u diploidních taxonů tohoto rodu (72–98 %) udávají také sníženou viabilitu u autotetraploidů (71 %). Stejně tak Cohen et al. (2013) sledovali u rodu *Hylocereus* vysokou viabilitu u diploidů (97 %) a o něco nižší viabilitu u autotetraploidů (86 %). Pokud považujeme tetraploidní cytotyp *O. kochii* za autotetraploidní taxon, zjištěné výsledky pylové viability v této práci se s výše zmíněnými závěry jiných autorů ohledně snížené viability u autotetraploidních druhů oproti diploidním příliš neshodují. I přesto, že rozdíl v pylové viabilitě nebyl statisticky významný, v průměru nižší pylová viabilita byla pozorována u diploidního cytotypu *O. kochii* (78 %), oproti jeho tetraploidnímu cytotypu, u kterého byla potvrzena v průměru viabilita 81 %. Van Raamsdonk (1985) uvádí u tetraploidních jedinců z komplexu *O. umbellatum* agg. (v jeho práci

označovaných jako *O. umbellatum*) extrémně variabilní hodnoty pylové viability, a to v rozmezí od 0–100 %. Hrouda (1980) udává u tetraploidního cytotypu barvitelnost 93 % a u diploidního cytotypu *O. kochii* 91 %. Diploidní *O. kochii* byl v hodnotách pylové viability zjištěných v této práci dosti variabilní s rozmezím 57 % a 98 %. Dosti rozkolísané hodnoty pylové viability v rámci diploidních taxonů komplexu *Ornithogalum umbellatum* agg uvádí ve své studii také van Raamsdonk (1985), kdy například u *O. monticolum* uvádí hodnoty od 1–66 % fertility, naopak u dalších Evropských diploidních taxonů jako jsou *O. excapum*, *O. comosum* či *O. platyphyllum* uvádí hodnoty nad 90 %. Výjimku tvoří diploidní *O. nivale* a *O. woronowii*, u kterých zjistil viabilitu pouze okolo 60 %. U dalšího diploidního taxonu, v jeho práci označovaného jako *O. angustifolium* s $2n = 18$ z území Polska (lze tedy předpokládat, že se jedná o taxon *O. kochii*), uvádí opět sníženou fertilitu, a to 45 %. Několik autorů udává možný výskyt aneuploidních jedinců u tohoto taxonu (např. Moret & Couderc, 1986: $2n = 16, 19$; Giordani & Garbari, 1989: $2n = 19, 20, 21$; Hrouda, 2010: $2n = 19, 21$). V důsledku přeskupení chromozomů (translokací) se může změnit celkový počet chromozomů a tím pádem dojde i ke změnám v průběhu meiózy, což má poté za následek tvorbu nevyvážených gamet, které poté dávají vznik právě těmto aneuploidním jedincům (Rivero-Guerra 2008). Právě to může být důvod snížené viability pylu některých jedinců u tohoto taxonu. Pro potvrzení této teorie by bylo nutné spočítat přesné počty chromozomů u jedinců, u nichž byla zároveň zjištěna i pylová viabilita.

Van Raamsdonk (1985) pro triploidní taxon *O. umbellatum*, při počtu chromozomů $2n = 27$ (v jeho práci označovaných jako *O. angustifolium*) udává pylovou viabilitu 73 %. Také Hrouda (1980) zjistil poměrně vysokou barvitelnost u triploidních taxonů *O. umbellatum* 85,5 %. To odpovídá i výsledkům v této práci, kdy byla pro tento triploidní taxon zjištěna 72% pylová viabilita, avšak hodnoty byly dosti variabilní, kdy se pohybovaly od 56 % do 89 %. Tato variabilita by mohla být způsobena nepravidelným párováním chromozomů v průběhu mikrosporogeneze a tím pádem i sníženou viabilitou pylu (Solís Neffa & Fernández 2000, Rivero-Guerra 2008, Czarniecki et al. 2014, Kolarčík et al. 2015). Stejný problém v průběhu mikrosporogeze by mohl vysvětlovat variabilitu v hodnotách pylové viability i u dalších taxonů, jako u tetraploidního *O. kochii* a u všech tří ploidních stupňů *O. divergens*. Dosti variabilní hodnoty udává u pentaploidních a hexaploidních taxonů z komplexu *O. umbellatum* agg. také van Raamsdonk (1985), u pentaploidů v rozmezí od 8–95 % a u hexaploidů 5–57 %. Poměrně sníženou barvitelnost u pentaploidů udává Hrouda (1980) a to 52 % a u hexaploidů odhadl 85% viabilitu. U pentaploidního *O. divergens* byla v této práci zjištěna pylová viabilita

86 %, tedy vyšší, než udává Hrouda (1980). Jedná se o odhad z dosti reprezentativního vzorku 22 jedinců, hodnoty byly v rozmezí od 54–99 %. Nejnižší pylová viabilita byla však pozorována u hexaploidního taxonu *O. divergens*, který vykazoval v průměru pouze 35% viabilitu pylu, což je více než dvakrát nižší hodnota, než uvádí u stejného taxonu Hrouda (1980). Heptaploidní *O. divergens* vykazoval v průměru mírně vyšší viabilitu (54%) než hexaploidní taxon, avšak u všech jeho studovaných jedinců docházelo v porovnání s ostatními taxony k extrémně nízké tvorbě pylových zrn. Nedostatečnou tvorbu pylu pozorovali u heptaploidního taxonu *Arundo donax* také Haddadchi et al. (2013). Tyto problémy s tvorbou pylu jsou spojeny s narušením tvorby semen, a tak s následnou sterilitou daných jedinců, kteří jsou tak odkázáni z velké části na vegetativní rozmnožování.

Hybridní taxony

Potenciální rodičovské druhy triploidního hybridního taxonu *O. ×wildtii* jsou diploidní *O. kochii* ze skupiny *O. umbellatum* agg. a tetraploidní taxon *O. boucheanum* z podrodu *Myogalum* (Podpěra 1913, Hrouda 1980, 2010, 2019). Předpokládaná velikost genomu u *O. ×wildtii* by tak měla být na základě naměřených hodnot velikosti genomu u jeho pravděpodobných rodičů 27,88 pg. Zjištěná velikost genomu u tohoto hybridního taxonu byla 28,24 pg, což tuto rodičovskou kombinaci potvrzuje. Hrouda (1980) ve své práci potvrzuje rovněž tuto rodičovskou kombinaci, a to na základě počtu chromozomů, kdy počet chromozomů u *O. ×wildtii* ($2n = 23$) je polovinou mezi počtem chromozomů u diploidního *O. kochii* ($2n = 18$) a *O. boucheanum* ($2n = 28$).

U druhého, tetraploidního hybridního taxonu jsou dva možné scénáře jeho vzniku. První možnou rodičovskou kombinací je diploidní *O. kochii* z *O. umbellatum* agg. a *O. boucheanum* z podrodu *Myogalum*, stejně jako v případě hybridního taxonu *O. ×wildtii* s tím rozdílem, že by došlo ke splynutí neredukované gamety taxonu *O. kochii* s redukovanou gametou *O. boucheanum*. Předpokládaná velikost genomu u takto vzniklého hybridního druhu by následně byla na základě naměřených velikostí genomu rodičů 36,32 pg. Druhou možnou rodičovskou kombinací je hybridizace mezi tetraploidním cytotypem *O. kochii* a tetraploidním *O. boucheanum*, kdy by předpokládaná velikost genomu byla totožná (36,39 pg). Píchalová (2017) ve své diplomové práci udává taktéž zjištěný výskyt tetraploidního cytotypu *O. kochii* na lokalitách společně s hybridním taxonem *O. ×degenianum*, což by mohlo nasvědčovat větší pravděpodobnosti právě této rodičovské kombinace. Zjištěná velikost genomu naměřená u hybridního taxonu *O. ×degenianum* (35,60 pg) odpovídá víceméně oběma výše zmíněným

možnostem vzniku. Pro jisté stanovení rodičovské kombinace u *O. ×degenianum* by bylo však nutné další studium zahrnující i molekulární metody. Oba hybridní taxony se mezi sebou liší jak velikostí genomu, ploidií, tak viabilitou pylu. Triploidní *O. ×wildtii*, ač má menší absolutní velikost genomu, vykazuje větší monoploidní velikost genomu než tetraploidní *O. ×degenianum*. Z literatury však není znám přesný počet chromozomů tetraploidního hybridního taxonu, ale dá se předpokládat, že *O. ×wildtii* bude disponovat většími chromozomy než *O. ×degenianum*. Triploidní *O. ×wildtii* je charakteristický velice nízkou pylovou viabilitou, oproti druhému hybridnímu taxonu, který vykazoval pouze mírně sníženou viabilitu (75 %). Navíc byla u *O. ×wildtii* potvrzena velmi nízká tvorba pylových zrn, kdy dva studovaní jedinci netvořili pylová zrna vůbec a zbývající čtyři jich tvořili velmi malé množství, z nichž většina byla abortovaných. Malé množství pylu u *O. ×wildtii* detekovala také při svém pozorování Píchalová (2017).

5.2 Vztah mezi viabilitou, velikostí genomu a ploidií

U studovaného souboru jedinců a taxonů byla nalezena korelace mezi viabilitou pylu a monoploidní velikostí genomu. I přesto, že nebyla statisticky významná, můžeme pozorovat mírný růst pylové viability s rostoucí monoploidní velikostí genomu. Tím pádem je patrný i mírný pokles pylové viability s rostoucím ploidním stupněm, jelikož menší monoploidní genom se vyskytuje u taxonů s vyšší ploidií. Avšak tyto závislosti nebyly prokázány jako statisticky významné, tudíž nelze pro uvedený soubor jedinců říci, že viabilita závisí na ploidií či na velikosti genomu. To ovšem neplatí pro případ, kdy je analyzován pouze podrod *Ornithogalum*, ve kterém byla potvrzena významná závislost viability pylu na monoploidní velikosti genomu i na ploidním stupni, kdy viabilita klesala s rostoucí ploidií a se zmenšující se monoploidní velikostí genomu. Na základě výsledků přechozích studií prováděných na různých druzích rostlin se dalo obecně očekávat, že snížená viabilita pylu bude nalezena hlavně u polyploidních a hybridních taxonů, a to zejména u lichých ploidií (např. Rivero-Guerra 2008, Rich 2009, Cohen et al. 2013, Czarnecki et al. 2014, Kolarčík et al. 2015). Právě nízká barvitelnost značí pravděpodobně částečnou či úplnou samčí sterilitu a poukazuje na abnormality, které se vyskytují při mikrosporogenezi, tedy při meióze, kdy může docházet například k nepravidelnému párování chromozomů a k tvorbě multivalentů. A právě tyto meiotické abnormality jsou velmi časté u polyploidních taxonů (Solís Neffa & Fernández 2000, Rivero-Guerra 2008, Czarnecki et al. 2014, Kolarčík et al. 2015). Naopak vysoká barvitelnost ukazuje na bezchybný průběh meiózy se správným homologním párováním rodičovských chromozomů,

a tudíž na správný vývoj pylu (Solís Neffa & Fernández 2000, Kolarčík et al. 2015). Většina autorů se shoduje, že ploidie je velmi důležitým znakem, který určuje barvitelnost, potažmo viabilitu pylu. Výsledky jejich studií prováděných na různých druzích rostlin ukazují relativně podobný scénář. Nejvyšší pylová viabilita se obvykle nachází u diploidních taxonů, následuje výrazný pokles viability u triploidů a dále u tetraploidů je viabilita obvykle opět poměrně vysoká. Značně snížená viabilita je pozorována také u hybridů. Například u druhu *Santolina pectinata* Rivero-Guerra (2008) uvádí až 92 % pylovou viabilitu u diploidů a sníženou viabilitu na 51 % u tetraploidů. Příkladem může být i studie na rodu *Sorbus* (Rich 2009), kde byla též nalezena nejvyšší viabilita u diploidů, následně u tetraploidů a nejnižší u triploidů a hybridů. Stejně tak z výsledků studie Czarnecki et al. (2014), kteří se ve své práci zabývali barvitelností pylu u kultivarů *Lantana camara*, je patrné, že nejvyšší pylovou viabilitou se vyznačovaly diploidní rostliny (v rozmezí 54–88 %), o něco nižší barvitelnost byla prokázána u tetraploidů (45 %), pentaploidů (34 %) a hexaploidů (18 %), nejnižší pylovou viabilitu našli u triploidních taxonů (9 %). Podobně i u jednoděložného geofytního rodu *Gagea* mají diploidní taxony vysokou viabilitu, tetraploidi mají procento viabilního pylu mírně nižší a největší snížení viability pylu lze pozorovat u pentaploidů (Měsíček & Hrouda 1974). Poměrně ostrý kontrast k výše uvedenému tvoří výsledky této studie, které neukazují výraznější pokles viability u triploidních (s výjimkou hybridního *O. ×wildtii*) a pentaploidních taxonů, a naopak poměrně nízkou viabilitu u některých diploidů. K velmi podobným výsledkům dospěl také van Raamsdonk (1985) ve své studii, ve které se zabývá mimo jiné i pylovou viabilitou (fertilitou) komplexu *Ornithogalum umbellatum* agg. a nenalezl souvislost mezi pylovou viabilitou a ploidní úrovní rostlin. Popisuje pozoruhodný nález plně viabilních jedinců v rámci lichých ploidií, konkrétně u triploidů a pentaploidů a naopak neviabilních (sterilních) jedinců u sudých ploidních stupňů, jako jsou diploidní a tetraploidní taxony. Zdá se tedy, že u rodu *Ornithogalum* nehraje ploidie při mikrosporogenezi větší roli, případně se začíná projevovat až u vysokých ploidních úrovních (hexa- a heptaploidů). O příčinách, proč tomu tak je, lze jen spekulovat.

Velmi zajímavé vztahy byly nalezeny mezi viabilitou pylu a počtem pylových zrn, které byly počítány vždy ze třech prašníků na jedince, kdy z každého byla spočítána všechna pylová zrna v šesti zcela náhodně vyfocených zorných polích. Ukázalo se totiž, že čím nižší byla u taxonu zjištěná pylová viabilita, tím variabilnější byl daný taxon v absolutním počtu pylových zrn. Typickým příkladem pro tento výsledek je triploidní hybridní taxon *O. ×wildtii*, který vykazoval velmi nízkou viabilitu a zároveň byl extrémně variabilní ve zjištěných počtech pylových zrn. To poukazuje na to, že někteří jedinci v rámci taxonů s nižší pylovou viabilitou

mohou trpět poruchami, které omezují vlastní tvorbu pylových zrn. Často tyto taxony poté kompenzují svou částečnou sterilitu schopností vegetativního rozmnožování, které jim zajistí udržení svých populací (Ellstrand et al. 1996). S tím také souvisí zjištění, že taxony, které jsou viabilní a nemají problém s tvorbou pylových zrn se vyznačují dosti stabilními hodnotami pylové viability napříč studovanými jedinci (např. *O. nutans*, *O. pannonicum*, *O. brevistylum*). Naopak u těch druhů, u kterých jsou patrné některé známky meiotických problémů, ať už se jedná o špatnou tvorbu pylových zrn (např. hybridní *O. ×wildtii*) či o tvorbu abortovaných zrn (např. *O. boucheanum*, diploidní *O. kochii*, pentaploidní *O. divergens*) jsou jedinci v hodnotách pylové viability dosti různorodí a někteří mají velmi nízké procento viability pylu, někteří naopak vysoké.

5.3 Vliv hybridizace na viabilitu pylu

Hybridizace patří mezi velmi důležité mechanismy vzniku nových druhů (Rieseberg & Willis 2007), avšak v některých případech může dojít i k introgresi, tedy ke zpětnému křížení hybridních taxonů s jejich rodiči a v extrémním případě tak způsobit jejich vyhynutí (Levin 2002, Bureš et al. 2010). Proto se u rostlin vyvinuly určité bariéry, které zabraňují buď samotné hybridizaci mezi druhy, nebo když už k ní dojde, brání nově vzniklým hybridním jedincům v plodnosti, čímž introgresi zabrání. Mnoho hybridů tak není schopno předat své geny zpět svým rodičovským druhům (Levin 2002, Rieseberg & Willis 2007). Právě tato druhá zmíněná možnost patří mezi postzygotické bariéry a ty se často projevují právě sníženou viabilitou pylu, či její úplnou ztrátou, tudíž neschopností tvorby semen (Rieseberg & Willis 2007, Bureš et al. 2010). Fakt, že mají hybridní taxony obvykle velmi sníženou fitness a jsou sterilní je také odrazem toho, že sady genů, které získaly od svých rodičů ve skutečnosti neuměly spolupracovat (Levin 2002).

U hybridního taxonu *O. ×wildtii* byla v průměru zjištěna 16% pylová viabilita, která je až pětkrát nižší než u rodičovských druhů tohoto taxonu (*O. kochii*, *O. boucheanum*). To může odrážet nesprávné párování chromozomů v průběhu mikrosporogeneze a tudíž výskyt částečné či úplné sterility u tohoto druhu. Právě u hybridního *O. ×wildtii* je však nutno zohlednit také vlastní tvorbu pylových zrn. Bylo studováno šest jedinců, z nichž čtyři tvořili abnormálně malé množství pylových zrn, která byla převážně abortovaná, v porovnání s ostatními studovanými rostlinami jiných ploidních stupňů a taxonů, a dva jedinci netvořili pylová zrna vůbec. Z tohoto důvodu není tento taxon schopný sexuálního rozmnožování a primárním zdrojem produkce těchto triploidů tak zůstává hybridizace mezi diploidním a tetraploidním taxonem, v tomto

případě *O. kochii* a *O. boucheanum* (Ramsey & Schemske 1998, Hrouda 2010) a dále je taxon odkázán hlavně na vegetativní rozmnožování pomocí dceřiných cibulek, které hojně vytváří (Štolfová 2017). Neschopnost sexuálního rozmnožování u tohoto taxonu potvrzuje také Hrouda (1980) jelikož ve své práci uvádí, že květy po odkvětu zasychají a nedochází tak k tvorbě plodů ani semen. Nízkou viabilitu pylu u allotriploidních taxonů uvádějí například i Kolarčík et al. 2015 u rodu *Onosma* (2–49 %) nebo Cohen et al. (2013) u rodu *Hylocereus* (11 %). Naopak u druhého tetraploidního hybridního taxonu *O. ×degenianum* nebyla potvrzena snížená viabilita pylu oproti jeho potenciálním rodičovským druhům. Vysoké hodnoty pylové viability u allotetraploidního druhu ve své práci uvádějí například i Kolarčík et al. 2015 (90 %). Dochází u něj ale taktéž k omezené tvorbě pylových zrn, avšak ne v takové míře jako u *O. ×wildtii*. Zajímavostí je, že u *O. ×degenianum* byla potvrzena tvorba semen, což poukazuje na alespoň částečnou fertilitu (Polgár 1928, Píchalová 2017). I u tohoto druhu dochází k tvorbě dceřiných cibulek, které slouží k vegetativnímu rozmnožování, což umožní druhu úspěšné zachování svých populací i přes případné nedostatečné sexuální rozmnožování. Píchalová (2017) ve své práci také poukazuje na mnohonásobně vyšší produkci dceřiných cibulek právě u obou hybridních taxonů oproti jejich možným rodičovským druhům, čímž se potvrzuje jistá kompenzace narušené sexuální reprodukce u těchto taxonů. Důležitou roli u obou hybridních taxonů tedy hraje jejich ploidní stupeň. Zatímco u tetraploidního hybridu se zřejmě při meiózách párují vždy dvě sady chromozomů od jednoho rodiče, u triploidních hybridů to možné není, a proto téměř nedochází k tvorbě viabilního pylu.

6 Závěr

Rod *Ornithogalum* je cytologicky velmi rozmanitý a dosud u něj nebyla příliš studována velikost genomu ani pylová viabilita. Tato práce tak představuje první ucelený přehled velikostí genomu, ploidních úrovní, pylové viability a jejich vztahů u střeoevropských zástupců rodu *Ornithogalum*. Pro stanovení velikosti genomu byla použita průtoková cytometrie a pro odhad pylové viability byla využita metoda barvitelnosti pylových zrn.

Celkem bylo v této práci rozlišeno čtrnáct taxonů a šest ploidních úrovní od diploidní po heptaploidní. V rámci studovaného souboru jedinců nebyl odhalen významný vztah mezi ploidní úrovní a viabilou pylu. Výjimkou byl však podrod *Ornithogalum*, u kterého byl zjištěn pokles pylové viability s rostoucím ploidním stupněm. Ploidie se ukázala být důležitým faktorem, který ovlivňuje viabilitu pylu, pouze u hybridních taxonů, kdy u triploidního hybridního taxonu byla prokázána částečná či úplná samčí sterilita, naopak u tetraploidního taxonu nedocházelo k významnému poklesu viability pylu. Na základě námi zjištěných výsledků lze konstatovat, že u rodu *Ornithogalum* nedochází k obecně předpokládané tendenci lichých ploidí mít sníženou viabilitu pylu a u sudých ploidí naopak vysokou. K dosti podobným závěrům ohledně viability pylu u tohoto rodu došla jediná předešlá studie zabývající se touto problematikou (van Raamsdonk 1985). Jedná se tedy zřejmě o jev typický právě pro snědky.

Další cytologické studium si zaslouží taxony *O. pyrenaicum* subsp. *sphaerocarpum* a *O. brevistylum* z podrodu *Beryllis*. U těchto taxonů by bylo vhodné použití jemnějších cytologických metod, jako například *in situ* hybridizace, které by mohly pomoci s objasněním skutečného ploidního stupně u taxonu *O. brevistylum* a organizace genomu u obou druhů.

Metoda barvení pylových zrn slouží pro stanovení hrubého odhadu skutečné životaschopnosti pylu. Pro přesnější stanovení vztahů mezi ploidním stupněm či konkrétním taxonem a pylovou viabilitou by bylo za potřebí využití složitějších a přesnějších metod jako například pozorování klíčení pylu a růstu pylové láčky či sledování množství vzniklých semen po opylení. Další zkoumání těchto vztahů by bylo vhodné doplnit údaji o přesném chromozomovém počtu u daných jedinců, které by taktéž pomohly k lepšímu pochopení této problematiky. Pro navazující studium tohoto rodu, které je bezpochyby za potřebí, je dále nutné navýšit počet vzorků pro analýzy a vyrovnat počty analyzovaných jedinců v rámci jednotlivých taxonů pro dosažení relevantnějších výsledků.

7 Literatura

- Adams K.L. & Wendel J.F. (2005): Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 135–141.
- Alexander M. P. (1969): Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology*. 44: 117–122.
- Balao F., Herrera J. & Talaver S. (2011): Phenotypic consequences of polyploidy and genomesize at the microevolutionary scale: a multivariate morphological approach. *New Phytologist* 192: 256–265.
- Bancheva S. & Greilhuber J. (2006): Genome size in Bulgarian *Centaurea* s.l. (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 257: 95–117.
- Bardy K. E., Albach D. C., Schneeweiss G. M., Fischer M. A. & Schönswetter P. (2010): Disentangling phylogeography, polyploid evolution and taxonomy of a woodland herb (*Veronica chamaedrys* group, Plantaginaceae s.l.) in southeastern Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 771–786.
- Barker M. S., Arrigo N., Baniaga A. E, Li Z. & Levin D. A. (2015): On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids. *New Phytologist* 210: 391–398.
- Barringer B. C. (2007): Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. *American Journal of Botany* 94: 1527–1533.
- Bennett M. D. & Smith J. B. (1976): Nuclear DNA amounts in Angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 274: 227–274.
- Bennett M. D., Bhandol P. & Leitch I. J. (2000): Nuclear DNA amounts in Angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. *Annals of Botany* 86: 859–909.
- Bennetzen J. L., Ma J. & Devos K. M. (2005): Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Annals of Botany* 95:127–132.
- Bou Dagher-Kharrat M., Abdel-Samad N., Douaihy B., Bourge M., Fridlender A., Siljak-Yakovlev S. & Brown S. C. (2013): Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora. *Plant Biosystems* 147: 1228–1237.

- Briggs D. & Walters S. M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. Ed 3. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Bureš P., Šmarda P., Rotreklová O., Oberreiter M., Burešová M., Konečný J., Knoll A., Fajmon K. & Šmerda J. (2010): Pollen viability and natural hybridization of Central European species of *Cirsium*. *Preslia* 82: 391–422.
- Cohen H., Fait A. & Tel-Zur N. (2013): Morphological, cytological and metabolic consequences of autopolyploidization in *Hylocereus* (Cactaceae) species. *BMC Plant Biology* 13: 173.
- Comai L. (2005): The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature reviews genetics* 6: 836–846.
- Cullen J. & Ratter J. A. (1967): Taxonomic and cytological notes on Turkish *Ornithogalum*. *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh* 27: 293–339.
- Czarnecki D. M., Hershberger A. J., Robacker C. D., Clark D. G. & Deng Z. (2014): Ploidy levels and pollen stainability of *Lantana camara* cultivars and breeding lines. *HortScience* 49: 1271–1276.
- Dafini A. & Firmage D. (2000): Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution* 222: 113–132.
- Dalgıç G. & Özhatay N. (1997): The genus *Ornithogalum* (Liliaceae) and its karyotype variation in European Turkey. *Bocconeia* 5: 743–747.
- Dalgıç G., Dane F. & Aksoy Ö. D. (2009): A new record for the flora of Turkey: *Ornithogalum bouchecanum* (Hyacinthaceae). 169–173. In: Ivanova D. (ed.): Plant, fungal and habitat diversity investigation and conservation. Proceedings of IV Balkan Botanical Congress, Sofia, 20–26 June 2006. Institute of Botany, Sofia.
- Dodsworth S., Chase M. W. & Leitch A. R. (2016): Is post-polyploidization diploidization the key to the evolutionary success of angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society* 180: 1–5.
- Doležel J. & Bartoš J. (2005): Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95: 99–110.

- Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H. & Greilhuber J. (2003): Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A*, 51A: 127–128.
- Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233–2244.
- Eilam T., Anikster Y., Millet E., Manisterski J. & Feldman M. (2010): Genome size in diploids, allopolyploids, and autopolyploids of Mediterranean Triticeae. *Journal of Botany* 2010: 1–12.
- Ellstrand N. C., Whitkus R. & Rieseberg L. H. (1996): Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 5090–5093.
- Fawcett J. A. & Van de Peer Y. (2010): Angiosperm polyploids and their road to evolutionary success. *Trends in Evolutionary Biology* 2: 16–21.
- Fischer M. A. (ed.) (2008): *Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol*. Ed. 3. OÖ Landesmuseen, Linz.
- Fleischmann A., Michael T. P., Rivadavia F., Sousa A., Wang W., Temsch E. M., Greilhuber J., Müller K. F. & Heubl G. (2014): Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. *Annals of Botany* 114: 1651–1663.
- Galdeano F., Urbani M. H, Sartor M. E, Honfi A. I, Espinoza F. & Quarin C. L. (2016): Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of *Paspalum* (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. *Journal of Plant Research* 129: 697–710.
- Garbari F., Giordani A., Marcucci R. & Tornadore N. (2003): The genus *Ornithogalum* L. (Hyacinthaceae) in Italy, XIV: towards a redefinition of infrageneric taxa, with new proposals. *Bocconea* 16: 269–281.
- Garbari F., Peruzzi L. & Tornadore N. (2007): *Ornithogalum* L. (Hyacinthaceae Batsch) e generi correlati (Subfam. Ornithogaloideae Speta) in Italia. *Atti della Società Toscana di Scienze Naturali, Residente in Pisa*. *Memorie* 114: 35–44.
- Giordani A. & Garbari F. (1989): The genus *Ornithogalum* L. (Hyacinthaceae). IX. Characters and typification of *O. kochii* Parl., a misinterpreted species. *Atti della Società Toscana di Scienze Naturali* 96: 1–8.

- Greilhuber J., Doležel J., Lysák M. A. & Bennett M. D. (2005): The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'Genome size' and 'C-value' to describe Nuclear DNA contents. *Annals of Botany* 95: 255–260.
- Grime J. P. & Mowforth M. A. (1982): Variation in genome size—an ecological interpretation. *Nature* 299: 151–153.
- Guervin C., Le Coq C., Esclapez M. & Moret J. (1994): Intra-individual variations of chromosomes and DNA content in meristems of adventitious roots of *Ornithogalum umbellatum* L. *Caryologia* 47: 315–323.
- Haddadchi A., Gross C. L. & Fatemi M. (2013): The expansion of sterile *Arundo donax* (Poaceae) in southeastern Australia is accompanied by genotypic variation. *Aquatic Botany* 104: 153–161.
- Hanson L., McMahon K. A., Johnson M. A. T. & Bennett M. (2001): First nuclear DNA C-values for 25 Angiosperm families. *Annals of Botany* 87: 251–258.
- Heitz E. (1926): Der nachweis der Chromosomen. Vergleichende Studien über ihre Zahl, Grösse und Form im Pflanzenreich I. *Botanische Zeitung*. Berlin 18: 625–681.
- Herrmann N. (2002): Biological Flora of Central Europe: „*Ornithogalum angustifolium*“ nom. prov., Syn. p.p. *O. orthophyllum* ssp. *kochii* = *O. kochii* Parl., *O. gussonei* Ten.). *Flora* 197: 409–428.
- Heslop-Harrison J. S. & Schwarzacher T. (2011): Organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal* 66: 18–33.
- Hintze J. 2013. NCSS 9. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. www.ncss.com.
- Höfer M. & Meister A. (2010): Genome size variation in *Malus* species. *Journal of Botany* 2010: 1–8.
- Holzer K. (1952): Untersuchungen zur karyologischen Anatomie der Wurzel. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 99: 118–155.
- Hrouda L. (1980): Studium rodu *Ornithogalum* L. s. l. v Československu. – Habilitační práce [Depon. in Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praha].

- Hrouda L. (2002): Hyacinthaceae (excl. *Scilla*). In.: Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J. & Štěpánek J. (eds): Klíč ke květeně České republiky. 747–749. Academia, Praha.
- Hrouda L. (2007): New records in *Ornithogalum*. 417–422. In: Marhold K., Mártonfi P., Mered'a P. jun., Mráz P. (eds): Chromosome number survey of the ferns and flowering plants of Slovakia. Veda, Bratislava.
- Hrouda L. (2010): *Ornithogalum* L. In: Štěpánková J. (ed.). Květena České republiky 8. 600–613. Academia, Praha.
- Hrouda L. (2019): *Ornithogalum* L. In: Kaplan Z., Danihelka J., Chrtek J. jun., Kirschner J., Kubát K., Štech M. & Štěpánek J. (eds): Klíč ke květeně České republiky. Ed. 2. 210–212. Academia, Praha.
- Jäger E. J. (ed.) (2017): Rothmaler – Exkursionsflora von Deutschland, Gefäßpflanzen: Grundband, Ed. 21. Spectrum, Heidelberg.
- Jiao Y., Wickett N. J., Ayyampalayam S., Chanderbali A. S., Landherr L., Ralph P. E., Tomsho L. P., Hu Y., Liang H., Soltis P. S. et al. (2011): Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* 473: 97–100.
- Johnson M. A. T. & Brandham P. E. (1997): New chromosome numbers in petaloid monocotyledons and in other miscellaneous angiosperms. *Kew Bulletin* 52: 121–138.
- Karaguzel O., Mutlu N., Gokturk R., Tuna M. & Boyaci F. (2020): Genome size and genetic diversity of some *Ornithogalum* species. *Freesenius Environmental Bulletin* 29: 107–113.
- Khatun S. & Flowers T. J. (1995): The estimation of pollen viability in rice. *Journal of Experimental Botany* 46: 151–154.
- Knight Ch. A., Molinari N. A. & Petrov D. A. (2005): The large genome constraint hypothesis: Evolution, ecology and phenotype. *Annals of Botany* 95: 177–190.
- Kobřlová L. & Hroneš M. (2019): First insights into the evolution of genome size in the borage family: a complete data set for Boraginaceae from the Czech Republic. *Botanical Journal of the Linnean Society* 189: 115–131.

- Kolarčík V., Ducár R. & Kačmárová T. (2015): Patterns of pollen stainability in polyploids of the genus *Onosma* (Boraginaceae). *Plant Ecology and Evolution* 148: 76–89.
- Kunzová P., Lepší M. & Koutecký P. (2020): Rozšíření snědků z okruhu snědku rozkladitého (*Ornithogalum umbellatum* agg.) v jižní části Čech. *Sborník Jihočeského muzea v Českých Budějovicích, Přírodní vědy* 60: 6–28.
- Langbehn H. (2018): Neues zur Flora des Landkreises Celle 2017. *Floristische Notizen aus der Lüneburger Heide* 26. 27–33.
- Lauber H. (1947): Untersuchungen über das Wachstum der Früchte einiger Angiospermen unter endomitotischer Polyploidisierung. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 94: 30–60.
- Leitch A. R. & Leitch I. J. (2012): Ecological and genetic factors linked to contrasting genome dynamics in seed plants. *New Phytologist* 194: 629–46.
- Leitch I. J. & Bennett M. D. (2004): Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 651–663.
- Leitch I. J., Chase M. W. & Bennett M. D. (1998): Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany* 82: 85–94.
- 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.
- López A., Panseri A. F., Poggio L. & Fernández A. (2011): Nuclear DNA content in the polyploid complex *Turnera ulmifolia* (*Turnera* L., Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution* 296: 225–230.
- Ludwig W. & Lenski I. (1969): Zur Kenntnis der hessischen Flora. *Jahrbücher des Nassauischen Vereins für Naturkunde* 100: 112–133.
- Lungeanu L. (1972): Contributions to the caryologic study of the genus *Ornithogalum*. *Lucrarile Gradini Botanice din Bucuresti (1970-1971)*: 147–151.
- Májovský J., Murín A., Feráková V., Hindáková M., Schwarzová T., Uhríková A., Váchová M. & Záborský J. (1987): *Karyotaxonomický prehľad flóry Slovenska*. Veda, Bratislava.

- Manning J. C., Forest F., Devey D., Fay M. F. & Goldblatt P. (2009): A molecular phylogeny and a revised classification of Ornithogaloideae (Hyacinthaceae) based on an analysis of four plastid DNA regions. *Taxon* 58: 77–107.
- Manning J. C., Goldblatt P. & Fay M. F. (2004): A revised generic synopsis of Hyacinthaceae in sub-saharan Africa, based on molecular evidence, including new combinations and the new tribe Pseudoprosperae. *Edinburgh journal of botany* 60: 533–568.
- Markova M. & Goranova V. (1996): Mediterranean chromosome number reports 6. *Fl. Medit.* 6: 317–323.
- Martínez-Azorín M., Crespo M. B. & Juan A. (2009): Nomenclature and taxonomy of *Ornithogalum divergens* Boreau (Hyacinthaceae) and related taxa of the polyploid complex of *Ornithogalum umbellatum* L. *Candollea* 64: 163–169.
- Martínez-Azorín M., Crespo M. B., Juan A. & Fay M. F. (2011): Molecular phylogenetics of subfamily Ornithogaloideae (Hyacinthaceae) based on nuclear and plastid DNA regions, including a new taxonomic arrangement. *Annals of Botany* 107: 1–37.
- Masterson J. (1994): Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of Angiosperms. *Science* 264: 421–424.
- Meriç Ç., Aksoy Ö & Dane F. (2011): Morphological and anatomical contributions to the taxonomical identification of two *Ornithogalum* taxa (*O. nutans* and *O. boucheanum*) from Flora of Turkey. *Biologia* 66: 68–75.
- Měsíček J. & Hrouda L. (1974): Chromosome numbers in Czechoslovak species of *Gagea* (Liliaceae). *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 9: 359–368.
- Möller M. (2017): Nuclear DNA C-values are correlated with pollen size at tetraploid but not diploid level and linked to phylogenetic descent in *Streptocarpus* (Gesneriaceae). *South African Journal of Botany* 114: 323–344.
- Moret J. & Couderc H. (1986): Contribution of cytology to the systematic knowledge of the *Ornithogalum* L. genus in north Africa: The *Heliochamos* Baker subgenus. *Caryologia* 39: 259–272.
- Newton W. C. F. & Pellew C. (1929): *Primula kewensis* and its derivatives. *Journal of Genetics*, 20. 405–467.

- Pellicer J., Fay M. F. & Leitch I. J. (2010): The largest eukaryotic genome of them all. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164: 10–15.
- Pellicer J., Hidalgo O., Dodsworth S. & Leitch I. (2018): Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. *Genes* 9 (88): 1–14.
- Peruzzi L. & Passalacqua N. G. (2002): Biosystematic and taxonomic considerations about Italian units of the genus *Ornithogalum* (Hyacinthaceae) showing reflexed pedicels. *Webbia* 57: 193–216.
- Peterson R., Slovin J. P. & Chen Ch. (2010). A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *International Journal of Plant Biology* 1. 66–69.
- Pfosser M. & Speta F. (1999): Phylogenetics of Hyacinthaceae based on plastid DNA sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 852–875.
- Píchalová B. (2017): Hybridizace mezi podrody *Ornithogalum* a *Honorius* rodu *Ornithogalum* (Hyacinthaceae) v Panonské nížině. Mgr. Thesis [Depon. in: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci].
- Pichot C., El Maâtaoui M. (2000): Unreduced diploid nuclei in *Cupressus dupreziana* A. Camus pollen. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 574–579.
- Podpěra J. (1913): Nové rostliny květeny moravské. *Živa* 23: 246–247.
- Polgár S. (1928): Eine neue *Ornithogalum*-Art aus Ungarn. *Magyar Botanikai Lápok* 27: 19–25.
- Pospíšilová M. (2012): Evoluce velikosti genomu v rodě *Globba* (Zingiberaceae). Mgr. Thesis [Depon. in: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze].
- QGIS Development Team (2020): QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>.
- Ramsey J. & Schemske D. W. (1998): Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review in Ecology and Systematics* 29: 467–501.
- Rice A., Šmarda P., Novosolov M., Drori M., Glick L., Sabath N., Meiri S., Belmaker J. & Mayrose I. (2019): The global biogeography of polyploid plants. *Nature Ecology & Evolution* 3: 265–273.
- Rieseberg L. H. & Willis J. H. (2007): Plant Speciation. *Science* 317: 910–914.

- Rich T. C. G. (2009): Pollen stainability in British *Sorbus* L. (Rosaceae). *Plant Ecology and Diversity* 2: 85–88.
- Rivero-Guerra A. O. (2008): Cytogenetics, geographical distribution, and pollen fertility of diploid and tetraploid cytotypes of *Santolina pectinata* Lag. (Asteraceae: Anthemideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 156: 657–667.
- Shivanna K. R., Linskens H. F. & Cresti M. (1991): Pollen viability and pollen vigor. *Theoretical and Applied Genetics* 81: 38–42.
- Schwarzová J. (2012): Obsah DNA a AT/GC genomový poměr v čeledi Apiaceae. Mgr. Thesis [Depon. in: Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno].
- Skalinska M., Jankun A. & Wcislo H. (1976): Further studies in chromosome numbers of Polish Angiosperms. Eleventh contribution. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 19: 107–148.
- Solís Neffa V.G. & Fernández A. (2000): Chromosome studies in *Turnera* (Turneraceae). *Genetics and Molecular Biology* 23: 925–930.
- Soltis D. E., Soltis P. S., Bennett M. D. & Leitch I. J. (2003): Evolution of genome size in the angiosperms. *American Journal of Botany* 90: 1596–1603.
- Soltis D. E., Soltis P. S., Schemske D. W., Hancock J. F., Thompson J. N., Husband B. C. & Judd W. S. (2007): Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species. *Taxon* 56: 13–30.
- Soltis P. S., Marchant D. B., Van de Peer Y. & Soltis D. E. (2015): Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Genetics & Development* 35: 119–125.
- Speta F. (1998): Hyacinthaceae. In: Kubitzki K. (ed): *The families and genera of vascular plants*. Ed 3. 261–285. Springer, Berlin.
- Speta F. (2000): Beitrag zur Kenntnis von *Ornithogalum* s.l. (Hyacinthaceae) in Oberösterreich. *Beiträge zur Naturkunde Oberösterreichs* 9: 743–792.
- Speta F. (2010): Kitaibel's *Ornithogalum refractum* (Hyacinthaceae – Ornithogaleae). *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien* 147: 109–123.

- Speta, F. (2000): Die Gattung *Ornithogalum* s.l. in Österreich. Linzer biologische Beiträge 32: 698.
- Stevens P. F. (2001): Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since]. - URL <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Stolley G. (2010): Die wilden, verwildernden und das ökologische Potenzial zu verwildern besitzenden Hyazinthengewächse (Hyacinthaceae) in Deutschland. URL: <http://offene-naturfuehrer.de/web/Hyacinthaceae>.
- Šmarda P., Knápek O., Březinová A., Horová L., Grulich V., Danihelka J., Veselý P., Šmerda J., Rotreklová O. & Bureš P. (2019): Genome sizes and genomic guanine+cytosine (GC) contents of the Czech vascular flora with new estimates for 1700 species. *Preslia* 91: 117–142.
- Štolfová K. (2017): Cytogeografie a morfologie okruhu snědku rozkladitého (*Ornithogalum umbellatum* agg.) ve východní části střední Evropy. Mgr. Thesis [Depon. in: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci].
- Tornadore N. & Garbari F. (1979): Il genere "*Ornithogalum*" L. (Liliaceae) in Italia. 3. Contributo alla revisione citotassonomica. *Webbia* 33: 379–423.
- Tornadore N. & Orza P. (1987): Il gen. *Ornithogalum* l. (Liliaceae) in Italia. VIII. Il subgen. *Beryllis* (Salisb.) Baker con particolare riguardo ad *O. brevistylum* Wolfner. *Atti della Società Toscana di Scienze Naturali, Residente in Pisa. Memorie* 94: 341–356.
- Van Raamsdonk L. W. D. (1985): Pollen fertility and seed formation in the *Ornithogalum umbellatum/angustifolium* complex (Liliaceae/Scilloideae). *Plant Systematics and Evolution* 149: 287–297.
- Veselý P., Bureš P., Šmarda P. & Pavlíček T. (2012): Genome size and DNA base composition of geophytes: the mirror of phenology and ecology. *Annals of Botany* 109: 65–75.
- Veselý P., Šmarda P., Bureš P., Stirton Ch., Muthama Muasya A., Mucina L., Horová L., Veselá K., Šilerová A., Šmerda J. & Knápek O. (2020): Environmental pressures on stomatal size may drive plant genome size evolution: evidence from a natural experiment with Cape geophytes. *Annals of Botany* 126: 323–330.
- Wendel J. F, Cronn R. C, Johnston J. S. & James Price H. (2002): Feast and famine in plant genomes. *Genetica* 115: 37–47.

- 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 USA* 106: 13875–13879.
- Zonneveld B. J. M. (2010): Genome sizes in *Hepatica* Mill: (Ranunculaceae) show a loss of DNA, not a gain, in polyploids. *Journal of Botany* 2010: 1–7.
- Zonneveld B. J. M. (2010): New record holders for maximum genome size in Eudicots and Monocots. *Journal of Botany* 2010: 1–4.
- Zonneveld B. J. M. (2019): The DNA weights per nucleus (genome size) of more than 2350 species of the Flora of The Netherlands, of which 1370 are new to science, including the pattern of their DNA peaks. *Forum Geobotanicum* 8: 24–78.
- Zonneveld B. J. M., Leitch I. J. & Bennett M. D. (2005): First nuclear DNA amounts in more than 300 Angiosperms. *Annals of Botany* 96: 229–244.

Příloha 1 – Přehled lokalit studovaných jedinců, 1) ploidní stupeň, 2) počet jedinců analyzovaných na velikost genomu, 3) počet jedinců analyzovaných na pylovou viabilitu, 4) lokalita, 5,6) GPS souřadnice, 7) datum sběru

Taxon	Ploidy ¹⁾	No indiv. GS ²⁾	No indiv. pollen ³⁾	Locality ⁴⁾	N ⁵⁾	E ⁶⁾	Date ⁷⁾
<i>O. pyrenaicum subsp. sphaerocarpum</i>	2	3	-	CZ, Slavkov pod Hostýnem, termophilous forest edge on the W margin of PP Stráž Nature Monument, 455 m a.s.l.	49,37582	17,68161	27.07.2020
		3	-	CZ, Brusné, meadow "Na Vápence" ca. 400 m NE of village, 390 m a.s.l.	49,36755	17,67709	27.07.2020
		1	1	CZ, Bystřice pod Hostýnem, Chvalčov, mesophilous road edge SW of Pod Kozincem Nature Monument, 460 m a.s.l.	49,39507	17,72025	03.07.2021
<i>O. brevistylum</i>	2	2	2	CZ, Polichno, in termophilous meadow in abandoned orchard ca. 300 SE of village, 325 m a.s.l.	49,06223	17,71751	22.07.2020
		3	3	CZ, Šumice, S margin of Goliáška forest NW of village, 255 m a.s.l.	49,03422	17,70914	22.07.2020
<i>O. boucheanum</i>	4	3	-	CZ, Uherčice, Uherčický les forest, N of village, 173 m a.s.l.	48,97274	16,64848	11.04.2015 26.04.2016
		1	-	HU, Pilisszentiván, oak forest, 290 m a.s.l.	47,61093	18,86633	16.05.2015
		-	1	SK, Bajtava, grassy roadside of road towards Kamenica nad Hronom village, 152 m a.s.l.	47,84639	18,72944	22.04.2016
		-	1	SK, Kláčany, grassy roadside of road towards Hlohovec town, 177 m a.s.l.	48,39000	17,86083	22.04.2016
		2	-	HU, Piliscsaba, forest edge SE village, 235 m a.s.l.	47,61947	18,83464	02.05.2016
		2	-	SK, Kráľovský Chlmec, road ditches in Robinia stand W of village	48,43518	21,95469	28.04.2018
		2	2	CZ, Moravský Písek, poplar forest SE of town, 174 m a.s.l.	48,97493	17,31672	13.05.2021
		2	2	CZ, Bzenec, sandy forest margin with Pinus and Robinia SE of Bzenec-Olšovec train station, 177 m a.s.l.	48,96884	17,30655	13.05.2021
		1	-	SK, Kamenín, S from the village, roadsides and adjacent wood (Robinia), 120 m a.s.l.	47,87944	18,64306	22.04.2016
		1	-	CZ, Munice, village lawn near small pond in SE part of village, 390 m a.s.l.	49,06391	14,41030	26.05.2017

<i>O. nutans</i>	4	3	5	CZ, Olomouc – Neředín, lawns, 235 m a.s.l.	49,59468	17,22806	05.05.2016
<i>O. pannonicum</i>	2	5	5	A, Purbach, Purbache Heide, dry grassland NW of village, 180 m a.s.l.	47,92072	16,68024	19.05.2019
<i>O. refractum</i>	5	1	1	HU, Győr, cemetery in Nádorváros, 121 m a.s.l.	47,66371	17,64457	01.05.2013
<i>O. kochii</i>	2	1	-	HU, Győr-Segitőház, sandy grasslands on N margin of the city, 120 m a.s.l.	47,71868	17,69321	2013
		1	-	HU, Csapod, forest edge by the road Csapod Cirák, 140 m a.s.l.	47,50139	16,96972	28.04.2013
		1	-	HU, Fertőd town, lawns in park at the Joseph Haydn street, 140 m a.s.l.	47,62167	16,87028	28.04.2013
		2	-	SK, Nitra, Zoborská lesostep Nature Reserve, dry grassland, 310 m a.s.l.	48,35116	18,08154	13.03.2015
		1	-	SK, Vinosady, Holubyho lesostep, road verge in oak forest, 254 m a.s.l.	48,32251	17,27940	13.03.2015
		1	1	CZ, Šlapanice, Velký hájek Nature Reserve, dry grassland, 237 m a.s.l.	49,17664	16,72101	30.03.2015
		2	3	CZ, Komořany, Stepní stráň u Komořan, Nature Reserve, dry grassland, 272 m a.s.l.	49,19813	16,92464	29.04.2016
		2	-	CZ, Olomouc – Neředín, lawns, 235 m a.s.l.	49,59418	17,22407	05.05.2016
		4	2	CZ, Olomouc, Smetanovy sady city park, lawns, 215 m a.s.l.	49,58886	17,24941	05.05.2016
		3	1	CZ, Srbsko, Kubrychtova bouda, dry grassland, 275 m a.s.l.	49,94569	14,15608	08.05.2016
		3	-	A, Wartberg, Holleberg, dry grassland, 289 m a.s.l.	48,64316	15,88078	18.03.2017
		2	2	CZ, Valtice, Rendez-Vous, dry grassland, 200 m a.s.l.	48,74996	16,79262	09.04.2017
		1	1	CZ, Havraníky, Havranické vřesoviště moor on the W margin of the village, 316 m a.s.l.	48,81376	16,00325	06.10.2018
		2	-	PL, Skorocice, dry grassland, 200 m a.s.l.	50,41879	20,67194	23.04.2019
		3	-	PL, Skorocice, dry grassland, 200 m a.s.l.	50,42079	20,67213	23.04.2019
		-	2	CZ, Blatnice pod Sv. Antonínkem, grassland below church, 345 m a.s.l.	48,95912	17,47408	14.03.2016
		1	-	SK, Kamenín, S from the village, roadsides and adjacent wood (Robinia), 120 m a.s.l.	47,87944	18,64306	22.04.2016
<i>O. umbellatum</i>	3	3	-	CZ, Čermilov, Kaltouz forest, wet meadow on the SW margin of the forest, 246 m a.s.l.	50,28409	15,92985	22.05.2015
		1	-	CZ, Hradec Králové, lawns on bank of Labe river near Plácky, 232 m a.s.l.	50,23007	15,82366	21.05.2016
		2	2	D, Brachwitz, lawns in alley by the road, 122 m a.s.l.	51,54807	11,86193	10.03.2017

<i>O. umbellatum</i>	3	1	-	CZ, Lhotka, Lhotka u Přerova Nature Reserve, dry grassland, 250 m a.s.l.	49,49951	17,41461	20.05.2017
		1	1	CZ, Kunžak, road edge in W margin of town, 590 m a.s.l.	49,12003	15,18589	04.04.2019
		1	1	CZ, Stráž nad Nežárkou, mesophilous meadow W of town, 445 m a.s.l.	49,06724	14,88867	04.04.2019
		1	-	CZ, Senice na Hané, Cakov, Skalka forest E of village, Robinia plantations, 330 m a.s.l.	49,63029	17,03142	24.05.2019
<i>O. kochii</i>	4	1	-	HU, Kóspallag, Pusztatorony, dry grassland, 210 m a.s.l.	47,85070	18,94582	16.05.2015
		2	2	SK, Chľaba, lawns and bushes near the railway station, 102 m a.s.l.	47,82250	18,82972	22.04.2016
		2	1	SK, Chľaba, lawns and bushes at NE village margin, 102 m a.s.l.	47,83472	18,82639	22.04.2016
		3	2	HU, Piliscsaba, forest edge SE village, 235 m a.s.l.	47,61947	18,83464	02.05.2016
		2	1	SK, Chľaba, young Robinia stand on the N margin of village, ca. 210 m a.s.l.	47,83463	18,82624	28.04.2019
<i>O. divergens</i>	5	-	2	HU, Budapest, Törökbálinti út street, lawns, 228 m a.s.l.	47,48158	18,99658	19.04.2019
		3	1	HU, Balatonfüred, city grasslands, 155 m a.s.l.	46,96528	17,88583	13.03.2013
		1	-	CZ, Miroslav, Robinia forest NE of village, 233 m a.s.l.	48,95394	16,33757	23.03.2016
		1	-	CZ, Novosedly, Robinia stand N of village, 186 m a.s.l.	48,85110	16,50802	23.03.2016
		2	2	SK, Chľaba, lawns and bushes near the railway station, 102 m a.s.l.	47,82250	18,82972	22.04.2016
		1	1	SK, Belá, bushes at way ESE from the village, 163 m a.s.l.	47,81806	18,63694	22.04.2016
		1	1	SK, Bajtava, grassy roadside of road towards Kamenica nad Hronom village, 152 m a.s.l.	47,84639	18,72944	22.04.2016
		2	2	A, Innsbruck town, lawns in park at Rennweg street, 570 m a.s.l.	47,27278	11,39833	01.05.2016
		1	-	SK, Chľaba, road edge near railway station, 106 m a.s.l.	47,82506	18,82940	02.05.2016
		4	3	CZ, Olomouc, Velkomoravská street, lawns, 210 m a.s.l.	49,58231	17,24758	10.05.2016
		2	2	D, Johannashall, bushes by the road, 120 m a.s.l.	51,57250	11,77694	10.03.2017
		2	2	D, Bonn, floodplain forest between Sieg and Rhein rivers, 50 m a.s.l.	50,76417	7,08779	12.03.2017
		3	5	PL, Lomza, lawns near cemetery, 105 m a.s.l.	53,17667	22,08833	29.04.2017
		1	-	A, Steyr, lawns in park in town centre,	48,03889	14,41639	05.05.2017
2	2	CZ, České Budějovice, Fr. Halase street, city lawns, 390 m a.s.l.	48,95832	14,48416	05.04.2019		
2	1	SK, Bajtava, forested roadside to Leľa, 195 m a.s.l.	47,85648	18,76319	28.04.2019		
<i>O. divergens</i>	6	1	-	CZ, Přerov, lawns in Michalov park, 210 m a.s.l.	49,46060	17,45918	08.04.2016
		1	1	CZ, Hradec nad Moravicí, lawns near railway station, 285 m a.s.l.	49,87783	17,87631	04.04.2019
		1	-	CZ, Opava, lawns in Otická street, 285 m a.s.l.	49,92864	17,88612	08.03.2020

<i>O. divergens</i>	6	2	2	CZ, Grygov, sparse Robinia stand left of the field way to Krčmaň village, 218 m a.s.l.	49,52065	17,32379	05.04.2021
<i>O. divergens</i>	7	3	3	CZ, České Budějovice, Fr. Halase street, city lawns, 390 m a.s.l.	48,95832	14,48416	05.04.2019
<i>O. divergens</i>	7	3	1	CZ, Soběslav, lawns in park near confluence of Lužnice river and Černovický potok brook, 400 m a.s.l.	49,25736	14,71646	06.04.2019
<i>O. ×degenianum</i>	4	2	-	SK, Kamenica nad Hronom, road edge E of village, 110 m a.s.l.	47,82322	18,74801	02.05.2016
		3	-	HU, Vasegerszeg, forest by the road Vasegerszeg-Vámoscsalád, 156 m a.s.l.	47,38270	16,93659	03.05.2016
		3	2	SK, Bačka village, dry grassland on the cross-road Bačka-Kráľovský Chlmec, 101 m a.s.l.	48,43400	22,05198	28.04.2018
<i>O. ×wildtii</i>	3	3	-	CZ, Milotice, Na Pískách forest, S margin of the forest, 185 m a.s.l.	48,96778	17,12611	03.05.2016
		2	-	CZ, Moravský Písek, poplar forest SE of town, 174 m a.s.l.	48,97493	17,31672	03.05.2016
		3	-	SK, Veľký Kamenec, road ditches N of village, 96 m a.s.l.	48,37931	21,80264	29.04.2018
		2	2	CZ, Moravský Písek, poplar forest SE of town, 174 m a.s.l.	48,97493	17,31672	13.05.2021
		2	2	CZ, Bzenec, sandy forest margin with Pinus and Robinia SE of Bzenec-Olšovec train station, 177 m a.s.l.	48,96884	17,30655	13.05.2021
		2	2	CZ, Vracov, sandy grassland on SW margin of village, 202 m a.s.l.	48,97024	17,19817	13.05.2021

