

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Polyploidie okruhu česneku ořešce (*Allium scorodoprasum* L.):
genetické rozdíly mezi cytotypy a původ polyploidní série**

Bakalářská práce

Kamila Haničáková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Forma studia: prezenční

Vedoucí práce: **Mgr. Lucie Kobrlová, Ph.D.**

Konzultant práce: **RNDr. Martin Duchoslav, Ph.D.**

Olomouc 2023

Prohlašuji, že jsem zadanou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Lucie Koblkové, Ph.D. a RNDr. Martina Duchoslava, Ph.D., s použitím
citované literatury.

V Olomouci dne:

.....

Podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat především své vedoucí bakalářské práce Mgr. Lucii Koblrové, Ph.D. za ochotu, vstřícnost a cenné rady, a také za věnovaný čas jak při práci v laboratoři, tak při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Martinu Duchoslavovi, Ph.D. za užitečné rady, připomínky a poskytnuté materiály. Mé poděkování patří i všem lidem, kteří se podíleli na sběru a umístění rostlin na pozemek Katedry botaniky. Bez tohoto by tato práce nevznikla. Velký dík patří i mým přátelům, a hlavně rodině, a to za neskutečnou podporu.

Bibliografická identifikace:**Jméno a příjmení autora:** Kamila Haničáková**Název práce:** Polyploidie okruhu česneku ořešce (*Allium scorodoprasum* L.): genetické rozdíly mezi cytotypy a původ polyploidní série**Typ práce:** bakalářská**Pracoviště:** Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci**Vedoucí práce:** Mgr. Lucie Koblíková, Ph.D.**Rok obhajoby:** 2023**Abstrakt:**

Allium scorodoprasum L. (česnek ořešec) je poměrně běžný, morfologicky dobře rozlišitelný druh české flóry s převažujícím vegetativním rozmnožováním (pacibulky v květenství). Celkový areál zahrnuje téměř celou kontinentální Evropu (včetně Britských ostrovů), s přesahem na Kavkaz. V rámci tohoto území byl potvrzen výskyt tří ploidních úrovní, a to diploidní, triploidní a tetraploidní. Diploidi a triploidi jsou poměrně běžní, často rostou i sympatricky, naopak tetraploidi byli ojediněle zaznamenáni pouze v některých částech areálu. Původ této polyploidní série a genetická struktura populací však zůstávají nejasné. Cílem této bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše o studovaném druhu, polyploidii a jejím významu v souvislosti s evolucí rostlin. Praktická část byla zaměřena na izolaci DNA a testování jaderných a chloroplastových molekulárních markerů pro následnou biosystematickou studii. DNA extrakce byla provedena na 90 jedincích pocházejících z 31 populací, které byly cytotypově uniformní. Kvalita vyizolované DNA byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy, koncentrace byla změřena na NanoDropu a vhodnost DNA pro následné analýzy byla otestována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Testovány byly tři lokusy, jeden jaderný (ITS) a dva chloroplastové úseky (ndhJ-trnF a trnH-psbA). Předběžná data poukazují na celkově nízkou variabilitu vybraných molekulárních markerů.

Klíčová slova: *Allium*, chloroplastový marker, izolace DNA, jaderný marker, PCR reakce, polyploidie, sekvenování**Počet stran:** 60**Počet příloh:** 1**Jazyk:** český

Bibliographical identification:**Autor's first name and surname:** Kamila Haničáková**Title:** Polyploidy of the sand leek (*Allium scorodoprasum* L.): genetic differences among cytotypes and origin of the polyploid series**Type of thesis:** Bachelor**Department:** Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc**Supervisor:** Mgr. Lucie Kobrlová, Ph.D.**Year of presentation:** 2023**Abstract:**

Allium scorodoprasum L. (sand leek) is a relatively common, morphologically easily distinguishable species of the Czech flora with predominant vegetative reproduction (bulbils in the inflorescence). The total area covers almost all of continental Europe (including the British Isles), with an extension into the Caucasus. Within this area, the occurrence of three ploidy levels was confirmed, namely diploid, triploid and tetraploid. Diploids and triploids are relatively common and often grow sympatrically, whereas tetraploids are rare and only recorded in some parts of the area. However, the origin of this polyploid series and the genetic structure of the populations remain unclear. The aim of this bachelor's thesis was to conduct a literature search on the studied species, polyploidy and its significance in the context of plant evolution. The practical part was focused on DNA extraction and testing of nuclear and chloroplast molecular markers for subsequent biosystematic study. DNA extraction was carried out on 90 individuals from 31 cytotype uniform populations. The quality of the extracted DNA was checked by agarose electrophoresis, the concentration was measured using a NanoDrop, and the suitability of the DNA for subsequent analyses was tested by polymerase chain reaction (PCR). Three loci were tested, one nuclear (ITS) and two chloroplast regions (*ndhJ-trnF* and *trnH-psbA*). Preliminary data indicate a low overall variability of the selected molecular markers.

Key words: *Allium*, chloroplast marker, DNA extraction, nuclear marker, PCR reaction, polyploidy, sequencing**Number of pages:** 60**Number of appendices:** 1**Language:** Czech

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. CÍLE PRÁCE	15
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	16
3.1 Rod <i>Allium</i> L.	16
3.2 Rod <i>Allium</i> sect. <i>Allium</i>	18
3.3 Druh <i>Allium scorodoprasum</i> L.	19
3.3.1 Cytotypová variabilita <i>A. scorodoprasum</i>	22
3.3.2 Morfologické a ekologické důsledky polyploidie u <i>A. scorodoprasum</i>	22
4. MATERIÁL A METODY	24
4.1 Rostlinný materiál	24
4.2 Izolace genomické DNA	26
4.3 Stanovení koncentrace DNA	27
4.4 Gelová elektroforéza	27
4.5 Amplifikace vybraných oblastí DNA pomocí PCR reakce	28
4.6 Příprava vzorků na sekvenaci	30
4.7 Zpracování sekvencí a fylogenetické analýzy	30
5. VÝSLEDKY	32
6. DISKUZE	41
7. ZÁVĚR	44
8. LITERATURA	45
9. PŘÍLOHY	58

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Přehled studovaných populací druhu <i>Allium scorodoprasum</i> . Ploidie rostlin byla zjištěna pomocí průtokové cytometrie, která nebyla předmětem této práce (Kobřlová, Kalous, Duchoslav, nepubl. údaje).	25
Tabulka 2: Testované DNA markery. Tabulka zahrnuje název úseku, k němu použité primery a jejich sekvence, včetně příslušné citace.	28
Tabulka 3: Protokol pro přípravu PCR premixu. Uvedené objemy platí pro přípravu 1 vzorku.	29
Tabulka 4: Podrobný popis programů pro PCR reakce testovaných lokusů.	29
Tabulka 5: Protokol premixu na přečištění PCR produktu. Uvedené objemy platí pro přípravu 1 vzorku.	30
Tabulka 6: Vybrané modely u metody maximální věrohodnosti (Maximum likelihood = ML) pro jednotlivé testované lokusy. JC = Jukes-Cantor model (Jukes & Cantor 1969); přítomnost nevariantních míst (+ I; Shoemaker & Fitch 1989); T92 = Tamura 3-parametrový model (Tamura 1992).	31
Tabulka 7: Koncentrace a čistota vyizolované genomické DNA diploidních, triploidních a tetraploidních populací <i>A. scorodoprasum</i>	33

Seznam obrázků:

- Obrázek 1:** Druh *Allium scorodoprasum*: a, b) celkový habitus, c) charakter listů d) detail květenství (foto: M. Duchoslav). 21
- Obrázek 2:** Mapa Evropy s vyznačenými populacemi druhu *Allium scorodoprasum*, které byly vybrány pro účely předložené práce (žlutá kolečka: diploidi, červená kolečka: triploidi, modrá kolečka: tetraploidi, vytvořeno v programu QGIS). 24
- Obrázek 3:** Příklad výsledné gelové elektroforézy vyizolované genomické DNA (DNA Ladder (100 bp), a – start jamky, kde byla napipetována DNA, b – vyizolovaná genomická DNA, c – degradovaná DNA). 32
- Obrázek 4:** Výsledek agarozové elektroforézy testovaných markerů (ITS, ndhJ-trnF, trnH-psbA). 36
- Obrázek 5:** Výsledný alignment sekvenovaného jaderného lokusu ITS. Čísla v konsenzuální sekvenci reprezentují pořadí nukleotidů ve výsledném elignmentu. Zobrazeny jsou pouze odlišné části (SNP) studovaných sekvencí, šedá barva zobrazuje shodu se sekvencí konsenzuální, ostatní barvy představují jednotlivé, odlišné nukleotidy (zelená = T, červená = A, modrá = C, žlutá = G), prázdné místo („gap“) pozici, ve které chybí daný úsek přítomný v ostatních sekvencích. 37
- Obrázek 6:** Výsledný alignment dvou sekvenovaných chloroplastových lokusů trnH-psbA (horní část obrázku) a ndhJ-trnF (dolní část obrázku). Čísla v konsenzuální sekvenci reprezentují pořadí nukleotidů ve výsledném elignmentu. Zobrazeny jsou pouze odlišné části (SNP) studovaných sekvencí, šedá barva zobrazuje shodu se sekvencí konsenzuální, ostatní barvy představují jednotlivé, odlišné nukleotidy (zelená = T, červená = A, modrá = C, žlutá = G), prázdné místo („gap“) pozici, ve které chybí daný úsek přítomný v ostatních sekvencích. 38
- Obrázek 7:** Ukázky chromatogramů sekvencí jaderného lokusu ITS ilustrující pozorovanou nehomologii v tomto úseku. a, b) diploidní jedinec 17/187/3; c, d) triploidní jedinec 15/112/3. 39
- Obrázek 8:** Sestavené fylogenetické stromy pomocí metody maximální věrohodnosti pro všechny tři markery: a) trnH-psbA; b) ndhJ-trnF; c) ITS (žlutá kolečka: diploidi, červená kolečka: triploidi, modrá kolečka: tetraploidi). 40

1. ÚVOD

Na rozdíl od většiny živočichů, u nichž jsou chromozomy přítomny ve dvou kopiích (jedná se tedy o diploidy), rostlinné genomy jsou poměrně často zastoupeny vyšším počtem zmnožených sad chromozomů (jedná se o tzv. polyploidii). Polyploidie (genomová multiplikace) je tedy stav, kdy se v jádře vyskytují více než dvě sady chromozomů (Levin 1983, Wood et al. 2009, Van de Peer et al. 2021). V rostlinné říši je tento jev velice častý a bývá považován za jednu z hlavních hnacích sil evoluce a diversifikace rostlin (např. Otto & Whitton 2000, Suda 2009, Levin 2011, Parisod 2012, Soltis et al. 2014, Doyle & Sherman-Broyles 2017). Dokonce se uvádí, že všechny krytosemenné rostliny prošly alespoň jedním kolem polyploidizace ve své evoluční historii (Soltis et al. 2009, Wendel et al. 2016, Van de Peer 2017). Mnohdy je polyploidie spojena s mezidruhovou či vnitrodruhovou hybridizací a následnou stabilizací hybridů a jejich únikem od sterility (Levin 1983).

Rozlišují se dva základní typy polyploidie, a to autopolyploidie a allopolyploidie (Kihara & Ono 1926, Leitch & Bennett 1997, Ramsey & Schemske 1998, Briggs & Walters 2001). Autopolyploidie vznikají zmnožením strukturně podobných, tzv. homologních, genomů v rámci jednoho, téhož druhu (Parisod et al. 2010). Allopolyploidie naopak vznikají jako produkty mezidruhového křížení a následného zdvojení nehomologních (tj. homeologických) genomů (Ramsey & Schemske 1998, Suda 2009). Oba tyto typy s sebou přináší jistá úskalí během meiózy. Autopolyploidie během meiózy často vykazují tvorbu multivalentů, kdežto allopolyploidie převážně vytvářejí bivalenty, jelikož nehomologní chromozomy se nepárují (Levy & Feldman 2002, Ramsey & Schemske 2002, Parisod et al. 2010). Vlivem nevyváženého počtu chromozomů tak mohou mít autopolyploidie sníženou plodnost, vykazují tzv. polysomickou dědičnost. Naopak pro allopolyploidy je charakteristická disomická dědičnost, tj. chromozomy jsou vždy přítomny v páru (Osborn et al. 2003, King et al. 2006). Toto rozdělení nicméně není zcela přímočaré, což dokládá například tzv. segmentální allopolyploidie. Segmentální allopolyploidie mají nehomologní i homologní chromozomální segmenty a v průběhu metafáze meiózy pak vytváří jak bivalenty, tak i multivalenty. Tito jedinci pak vykazují smíšenou, disomickou i polysomickou dědičnost (Levin 2002, Levy & Feldman 2002).

Na základě stáří, a v závislosti na úrovni procesů spojených s post-polyploidní reorganizací (tj. diploidizací) genomu (např. Mandáková & Lysák 2018), lze polyploidní

události klasifikovat na neopolyploidii, mesopolyploidii a paleopolyploidii (Levy & Feldman 2002, Bennett 2004). Dlouhou dobu byly tyto události rozdělovány pouze na neopolyploidii a paleopolyploidii (Mandáková et al. 2010). Neopolyploidní druhy (např. *Arabidopsis suecica* (Fr.) Norrl., postglaciální allotetraploid vzniklý křížením *A. thaliana* (L.) Heynh. a *A. arenosa* (L.) Lawalrée, Burns et al. 2021) jsou evolučně mladé taxony, genomicky velmi podobné svým diploidním nebo polyploidním předkům, které lze identifikovat (zdvojené jednokopiové geny, rozlišitelné rodičovské (sub)genomy, Ramsey & Schemske 2002, Bennett 2004, Mandáková et al. 2010). Naopak paleopolyploidní druhy jsou evolučně nejstarší taxony, které si ve své historii prošly polyploidizací, ale dnes se jeví jako diploidní (např. *Arabidopsis thaliana*, Jiao et al. 2011). Jejich genomy jsou vysoce diploidizované a dávné polyploidní události jsou v genomech maskovány (hledání paralogních sevcí, Levy & Feldman 2002, Bennett 2004, Jiao et al. 2011). Mesopolyploidní druhy (např. *Brassica rapa* L., Fu et al. 2013) jsou genomicky stále částečně podobné se svými diploidními či polyploidními předky (rozlišitelné rodičovské (sub)genomy), ale počet chromozomů byl již redukován (meióza podobná diploidům, Bennett 2004, Mandáková et al. 2010).

Nárůst počtu chromozomů s sebou mnohdy přináší řadu změn, které ovlivňují morfologické (např. velikost a barva semen, Kúr et al. 2012) či fyziologické (např. rychlost fotosyntézy, Warner & Edwards 1993) vlastnosti, ekologické preference (např. odlišné distribuční vzorce cytotypů, Trávníček et al. 2010, Koutecký et al. 2012, Castro et al. 2020) nebo způsob reprodukce rostlin (častější vegetativní rozmnožování, Suda 2009). Polyploidi se tak od svých diploidních předků často výrazně odlišují (morfologická diference, nové ekologické adaptace, reprodukční izolace) a polyploidie je tak považována za jeden z hlavních mechanismů adaptace a speciace u rostlin (Ramsey & Schemske 1998, Otto & Whitton 2000, Doyle & Egan 2010). V neposlední řadě mají polyploidi často vyšší genetickou variabilitu (Servick et al. 2015) a jsou méně náchylní ke snižování genetické diverzity v důsledku příbuzenského křížení (Suda 2009).

Mezi nejznámější fenotypový projev polyploidie patří tzv. „gigas efekt“, kdy v důsledku zvýšení obsahu DNA dochází ke zvětšování buněk, což má za následek i zvětšení rostlinných orgánů (např. listů nebo květů, Levin 1983). Polyploidi proto bývají robustnější, mívají větší listy (větší listová plocha) a mnohdy i větší, nápadnější květy ve srovnání s diploidy (např. Beaulieu et al. 2008, Suda 2009, Te Beest et al. 2012). S velikostí buněk je často spojena i intenzita metabolismu (např. rychlost fotosyntézy), jelikož větší buňky (větší buněčný povrch a objem) poskytují větší prostor, kde probíhají

chemické reakce (Warner & Edwards 1993, Suda 2009). Na rozdíl od velikosti buněk však jejich počet klesá. Příkladem může být množství průduchů na plochu listu, které se vzrůstajícím stupněm ploidie klesá (Joachimiak & Grabowska-Joachimiak 2000). Také u polyploidů často dochází k posunu květní periody a většinou kvetou později než diploidi (ontogenetický vývoj je pomalejší, mitóza trvá déle, Levin 1983, Ramsey & Schemske 1998). Odlišná květní morfologie a fenologie může mít za následek i odlišnou interakci s opylovači (Kao 2008). Všechny fenotypové projevy jsou nicméně do určité míry ovlivněny i vnějšími podmínkami prostředí, ve kterých se polyploidní druhy vyskytují.

Polyploidní rostliny často mívají vyšší ekologickou toleranci než jejich diploidní předci (cf. Sonnleitner et al. 2016). Mohou tak osídlvat narušovaná, nestabilní a pro diploidy často nepříznivá stanoviště (Petit & Thompson 1997, Bretagnolle & Thompson 2001, Fawcett & Van de Peer 2010, Levin 2011, Zozomová-Lihová et al. 2015). Důvodem je vyšší schopnost polyploidů se přizpůsobit různým výkyvům podmínek prostředí, na rozdíl od jejich diploidních předků, což zvyšuje jejich celkovou úspěšnost (lepší fitness, vyšší četnost, Fawcett & Van de Peer 2010). Z globálního pohledu jsou polyploidi široce rozšířeni napříč různými klimatickými pásy (Te Beest et al. 2012), přičemž častěji se vyskytují ve vyšších zeměpisných šířkách a vyšších nadmořských výškách (Brochmann et al. 2004, Te Beest et al. 2012, Rice et al. 2019).

Areály polyploidních druhů se mohou lišit distribučními vzorci jednotlivých cytotypů, tzn. jejich vzájemným prostorovým uspořádáním (Petit et al. 1999). Prostorové vztahy mezi cytotypy lze kategorizovat na alopatrické (disjunktní; areály se nepřekrývají), parapatrické (sousední; areály mají společnou hranici) a sympatrické (geograficky promíchané; částečný nebo úplný překryv areálů, Husband et al. 2013, Kolář et al. 2017). Nejméně častá je alopatrie, častější parapatrie (někdy můžeme pozorovat i mozaikovitou parapatrii) a nejčastější je sympatrie (Petit et al. 1999). Pokud se areály cytotypů dotýkají, může docházet ke vzniku tzv. kontaktních zón, které lze rozlišit dle jejich původu na primární a sekundární (Husband et al. 2013). Dojde-li k tomu, že jedna chromozomová rasa dá vzniknout druhé a následně spolu koexistují v sympatrii, jedná se o primární kontaktní zónu. Příkladem může být vznik autopolyploida v diploidní populaci. Vzniklé cytotypy jsou geneticky homogenní a odlišují se pouze ploidii. Oproti tomu u cytotypů, které byly po určitou dobu prostorově odděleny a tato bariéra opadla, dochází k druhotnému, sekundárnímu kontaktu. Tyto cytotypy se odlišují nejen svým ploidním stupněm, ale jsou zpravidla i geneticky diferencované (Husband et al. 2013).

V rámci sympatrických (vzácněji parapatrických) populací může docházet k heteroploidní hybridizaci neboli křížení jedinců s různými ploidními stupni (Wei et al. 2023). Většinou se jedná o zpětné křížení polyploidů s jejich diploidními předky. Mohou tak vznikat liché ploidní stupně (např. triploidní nebo pentaploidní), které čelí řadě problémů spojených s meiózou a mají nízkou fertilitu a životaschopnost (Ramsey & Schemske 1998, Köhler et al. 2010). V případě diploidně-tetraploidních komplexů tak může docházet ke vzniku triploidních rostlin (např. v rámci rodu *Arabidopsis* Heynh.), které jsou ale většinou sterilní nebo neživotaschopné. Mohou za to především poruchy při vývoji endospermu, tzv. „triploidní blok“ (Ramsey & Schemske 1998, Levin 2002, Köhler et al. 2010). Nepřímo tak tento triploidní blok může fungovat jako izolační mechanismus zvyšující pravděpodobnost koexistence cytotypů, navzdory jejich zdatnosti (cf. Husband 2004). Během evoluce se však vytváří další bariéry bránící křížení mezi jednotlivými cytotypy, jako je například prostorová izolace cytotypů či posun jejich doby kvetení (např. *Chamerion angustifolium* L., Husband & Sabara 2004). Cytotypové rozdíly jsou tak výsledkem působení přirozeného výběru na tyto cytotypy (Petit et al. 1999). Nicméně díky přítomnosti genového toku většinou nemůže dojít k úplné reprodukční izolaci mezi ploidními stupni (Petit et al. 1999).

Triploidní jedinci mohou spontánně vznikat i v rámci diploidních populací, a to splýváním redukovaných a neredukovaných gamet. Ty bývají v polyploidních populacích produkovány poměrně často (Ramsey 2007). Navzdory poruchám během meiózy (tvorba aneuploidních gamet) však mohou triploidi v menší míře produkovat i euploidní gamety a následně během zpětného křížení s diploidy nebo jinými triploidy dávat vzniku tetraploidům (jedná se o tzv. „triploidní most“ (Ramsey a Schemske 1998, Otto & Whitton 2000, Husband 2004).

Obecně bývají nově vzniklé polyploidní linie nestabilní, jelikož jsou zastoupeny nízkým počtem jedinců v rámci populací jejich početně převládajících diploidních rodičů, tzv. „minoritní cytotypová nevýhoda“ nebo „nevýhoda malých čísel“ (minority cytotype exclusion, Levin 1975, Briggs & Walters 2001). Vzácnější, minoritní cytotypy jsou ovlivněny pylovou produkcí diploidů za vzniku intermediárního cytotypu (mnohdy neživotaschopného), což omezuje produkci a opětovnou formaci minoritního cytotypu, který během několika generací může zcela vymizet (Levin 2002).

Jak již bylo zmíněno výše, polyploidi se častěji rozmnožují nepohlavně (asexuálně). Ve srovnání s diploidy se u nich běžně setkáváme s vegetativním rozmnožováním (jedinci vznikají z části mateřské rostliny, např. oddenkové hlízy, dceřiné

cibule) či apomixí s. str. (tvorba semen bez oplození, potomci geneticky identičtí s mateřskou rostlinou, Suda 2009). Zejména liché ploidní stupně se tak mohou vyvarovat chybnému párování (přítomnost liché, nepárové sady chromozomů) během meiózy (Ramsey & Schemske 1998). Jako příklad lze uvést skupinu pampelišek ze sekce *Taraxacum* sect. *Ruderalia* Kirschner, H. Ollgaard & Štěpánek, jejíž diploidní zástupci se rozmnožují převážně pohlavně, kdežto liché, triploidní taxony se rozmnožují výhradně apomikticky (Meirmans et al. 1999). Obdobný trend je dále častý například v rodech *Sorbus* L. nebo *Rubus* L. (Pratt et al. 1958, Suda 2009, Hamston et al. 2018).

Zvýšení genetické variability polyploidních rostlin často vede k pozitivním změnám, jako je například vyšší výnos, odolnost vůči stresu, přítomnost větších plodů, absence semen v plodech apod. Polyploidie má tedy významnou roli i v oblastech potravinářství nebo zemědělství. Příkladem významných, polyploidních, kulturních plodin může být pšenice (Krasileva et al. 2017), cukrová třtina (Raboin et al. 2008), banánovník (Perrier et al. 2019), bavlník, kávovník nebo tabák (Skalická 2005).

Z taxonomického hlediska s sebou polyploidie přináší značné problémy spojené s určováním, tzn. morfologickým rozlišením a klasifikací jednotlivých cytotypů. Některé druhy (např. *A. oleraceum* L., Fialová et al. 2014) vytváří polyploidní série, které od sebe nelze morfologicky odlišit, tzn. pozorujeme pouze morfologické rozdíly korelující s obsahem DNA (např. rozměry listů, velikost a počet průduchů na listovou plochu apod.). Oproti tomu u některých polyploidních druhů (např. *Symphytum officinale* agg., Kobrlová et al. 2022) jsou dílčí cytotypy morfologicky (případně i ekologicky) natolik odlišné, že lze těmito rozdíly přikládat taxonomický význam, tj. hodnotit je jako samostatné taxonomické jednotky.

Při studiu polyploidních komplexů je v první řadě nutné samotné stanovení ploidního stupně rostlin/populací. K tomu se v dnešní době nejčastěji používá metoda průtokové cytometrie, která je velmi rychlá, nedestruktivní a umožňuje analyzovat velké množství vzorků (Doležel et al. 2007). Vždy je však nutné, tato data ověřit pomocí klasické karyologie (cf. Özhatay 2002), tzn. alespoň u některých rostlin od každé ploidní úrovně počítat chromozomy. Nadstavbou jsou pak cytogenetické metody, které umožňují studovat chromozomové přestavby (FISH, Chester et al. 2010), případně odlišit rodičovské (sub)genomy (GISH, Chester et al. 2010). Získaná cytometrická/karyologická data lze využít pro rekonstrukci areálu dílčích cytotypů (geografické rozdíly). S tím souvisí i studium jejich ekologických preferencí, tj. odlišné stanovištní podmínky (půdní analýzy, vegetační snímkování). Dalším krokem bývá zhodnocení případných morfologických

(velikost/tvar listů, velikost a barva semen) nebo mikroanatomických rozdílů (např. velikost a četnost průduchů, velikost pylových zrn) mezi jednotlivými ploidními stupni (např. Murín & Feráková 1988, Kúr et al. 2012). Nejmodernějším přístupem je pak studium genetické variability, umožňující lépe pochopit vztahy mezi diploidními a polyploidními populacemi nebo odhalit původ polyploidní série (autopolyploidie či allopolyploidie). Příkladem mohou být metody AFLP (Amplified fragment length polymorphism; restriční metoda, dominantní marker) nebo mikrosatelity (STR, short tandem repeats: krátká tandemová opakování nebo SSR, simple sequence repeats; hojný výskyt v celém genomu, polymorfismus, kodominantní marker), vhodné pro vnitrodruhové a populační studie (Vos et al. 1995, Flegr 2009, Gohil et al. 2019). Patrně nejrozšířenější jsou pak sekvenační metody určující pořadí nukleotidů v molekule DNA (jaderné, chloroplastové a mitochondriální markery, Krak 2011), např. tradiční Sangerovo sekvenování nebo modernější metody sekvenování druhé (Illumina) a třetí generace (PacBio, Dufresne et al. 2014). Jedná se o neustále se rozvíjející a zdokonalující metody, které se odlišují především délkou čteného úseku, počtem čtených úseků během sekvenování, přesností samotného čtení a v neposlední řadě také cenou (Krak 2011, Kolísko 2017).

2. CÍLE PRÁCE

Druh *Allium scorodoprasum* (česnek ořešec) je relativně běžný, morfologicky dobře rozlišitelný druh s převažujícím vegetativním způsobem rozmnožování. Jedná se o polyploidní druh, u kterého byly zaznamenány tři ploidní úrovně (2x, 3x, 4x). Původ této série však zůstává nejasný.

V rámci teoretické části práce jsem se zaměřila na vypracování literární rešerše o studovaném druhu, polyploidii a jejím významu v souvislosti s evolucí rostlin.

Druhou část práce tvoří experimentální část, jejímž primárním cílem bylo osvojení si základních laboratorních technik využívaných v molekulární biologii.

Cíle experimentální části zahrnovaly:

- Izolaci DNA z rostlinného materiálu a testování jaderných a chloroplastových molekulárních markerů pro následnou biosystematickou studii.
- Zhodnocení vhodnosti vybraných molekulárních markerů pro studium genetické variability na vybraných, cytotypově uniformních populacích druhu *A. scorodoprasum* pocházejících z různých částí Evropy.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rod *Allium* L.

Rod *Allium* L., náležící do čeledi *Amaryllidaceae* (Kothari et al. 2019), je se svými přibližně 780 druhy (Friesen et al. 2006) jedním z největších rodů jednoděložných rostlin (Celep et al. 2012). Patří k taxonomicky poměrně složitým rodům, jehož vnitrorodová klasifikace prošla dlouhým vývojem (Traub 1968). Ve znalostech diference a evoluce rodu však stále přetrvává řada mezer, které je třeba vyřešit pomocí pokračujících fylogenetických studií (cf. Li et al. 2010). Rod *Allium* představuje monofyletickou skupinu (Li et al. 2010), v rámci které je dle nejnovějších fylogenetických studií rozlišováno 15 monofyletických podrodů a 72 sekcí (Friesen et al. 2006, Li et al. 2010, Wheeler 2011). Celkové rozšíření rodu je značně široké, přičemž většina druhů roste na severní polokouli (tzv. holarktický areál, Traub 1968, Li et al. 2010). Výjimkou je druh *A. dregeanum* Kunth, který se vyskytuje v jižní Africe (De Sarker et al. 1997). Hlavní centrum diverzity se nachází ve střední a v jihozápadní Asii (Celep et al. 2012).

Obecně taxonomii rodu komplikuje zejména velká morfologická podobnost druhů (málo diagnostických znaků, Ohri et al. 1998), a to zejména ve vegetativním stavu. Popisy druhů jsou často založeny pouze na herbářových dokladech, přičemž během sušení může dojít ke ztrátě některých znaků (např. barva okvětních lístků), případně některé znaky na položkách úplně chybí (např. dceřiné cibule). Určování druhů je tak mnohdy velmi obtížné. Rod zahrnuje vytrvalé, geofytní rostliny s výraznou vůní. Charakteristickým znakem je přítomnost podzemních zásobních orgánů (cibule, oddenky, Krahulec & Duchoslav 2010), často se tvoří i dceřiné cibule (Kawano et al. 2005). Cibule přisedají na krátký oddenek nebo jsou samostatné s oddenkem redukovaným na podpučí. Mohou být nahloučené či jednotlivé, složené z jedné až několika zásobních šupin (zdužnatělé báze listů), obvykle se kryjících (suknice), nebo méně často ze zdužnatělých kolaterálních pupenů (stroužků, Krahulec & Duchoslav 2010). Listy bývají ploché, bezřapíkaté, čárkovité, přízemní, přisedlé a často zakrývají květní stvol (Fritsch & Friesen 2002, Krahulec & Duchoslav 2010). Pochvy listů zpravidla vytváří zdánlivou lodyhu. Stvoly jsou většinou přímé nebo šikmo vzhůru směřující, oblé až hranaté, plné či duté. Květenství tvoří lichookolík, který je nejprve uzavřen v toulci (Krahulec & Duchoslav 2010), často se tvoří i pacibulky (Wheeler 2011). Květy jsou tvořeny šesti, obvykle kopinatými až (ob)vejčitými okvětními lístky (volné nebo na bázi srostlé), vnitřní často širší než vnější. V květech se

dále nachází šest tyčinek, které jsou volné nebo na bázi krátce rourkovitě srostlé s nitkami ve střední části nebo u vrcholu se dvěma postranními zoubky (Krahulec & Duchoslav 2010). Prašníky jsou různě zbarvené (obvykle žluté), čnělky gynobazické a pylová zrna monosulkátní (Özhatay & Kocyigit 2009, Krahulec & Duchoslav 2010). Plodem je zpravidla tobolka se třemi pouzdry, kdy v každém pouzdru bývají 1–2 semena. Semena jsou většinou černá, trojhranná nebo smáčklá, vzácněji kulovitá (Stearn 1980, Krahulec & Duchoslav 2010).

Poměrně častý je v rámci rodu výskyt polyploidie, a to od diploidů až po dekaploidy ($2x$ – $10x$, De Sarker et al. 1997, Fialová et al. 2014). Nejvyšší stupeň ploidie byl doposud zaznamenán u jihoafrického druhu *A. dregeanum* ($2n = 8x = 64$ a $2n = 10x = 80$, De Sarker et al. 1997). V rámci evropských druhů jsou vysoce polyploidní například druhy *A. oleraceum* L. (6 cytotypů, $3x$ – $8x$), *A. vineale* L. (2 cytotypy, $4x$ a $5x$) nebo *A. scorodoprasum* L. (3 cytotypy, $2x$ – $4x$, Májovský et al. 1987, Měsíček & Javůrková-Jarolímová 1992, Duchoslav et al. 2010, 2020, Krahulec & Duchoslav 2010). Nejčastějším základním chromozomovým číslem je $x = 8$ (přibližně 80 % druhů, Hanelt et al. 1992). Nalezneme však i skupiny druhů, které mají $x = 7, 9, 10$ nebo 11 (Traub 1968, Hanelt et al. 1992, Dolatyari et al. 2018), což dokládá vysokou karyologickou variabilitu v rámci rodu. Vysoký stupeň polyploidie se navíc odráží i ve vyšší morfologické, případně i ekologické variabilitě (Ohri et al. 1998). Rod *Allium* je tedy vhodný k evolučnímu studiu polyploidů, strukturu genomu nebo ke studiu změn v obsahu DNA (Labani & Elkington 1987, Ohri et al. 1998, Duchoslav et al. 2010).

Dalším typickým znakem tohoto rodu je rozmanitost v reprodukčních systémech, zejména ve vegetativním způsobu rozmnožování. Vegetativně se česneky rozmnožují pomocí oddenků, podzemních dceřiných cibulí nebo pacibulek (bulbillus) produkovaných v květenství (typické např. pro *A. scorodoprasum* L., Karpavičienė 2017). Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita v množství dceřiných cibulí a pacibulek často souvisí právě s polyploidí, tj. například vyšší produkce pacibulek se vzrůstajícím stupněm ploidie (Salmeri et al. 2016, Karpavičienė 2017). Jako příklad lze uvést zástupce okruhu *A. paniculatum* L., kdy diploidní druhy (tzn. *A. paniculatum* s.str., *A. tenuiflorum* Ten., *A. fuscum* Waldst. & Kit.) dceřiné cibule nevytváří, kdežto polyploidní druhy ($4x$ až $6x$, tzn. *A. savii* Parl., *A. pallens* L., *A. oleraceum*, *A. dentiferum* Webb & Berthel.) je tvoří (Salmeri et al. 2016). Rozdíly v tvorbě vegetativních propagulí byly pozorovány i mezi polyploidy. Příkladem je polyploidní druh *A. oleraceum*, kdy tetraploidní populace dceřiné cibule patrně vůbec nevytváří, zatímco u pentaploidů a hexaploidů byla jejich tvorba

nepravidelně prokázána (Fialová & Duchoslav 2014). V neposlední řadě se u některých druhů můžeme vzácně setkat i s apomixií s.str., například u čínského taxonu *A. tuberosum* Rottler ex Spreng. (Kojima & Nagato 1997).

Tradičně jsou některé druhy (cibule, česnek, pórek, pažitka, rakkyo) využívány jako užitkové rostliny (zelenina, okrasné rostliny apod.). Po mnoha staletí se využívá jejich štiplavosti, léčivých vlastností a chuťové hodnoty. V některých částech světa má jejich použití také náboženské konotace. V rodě nalezneme nejen ekonomicky důležité druhy, které se využívají jako zelenina či koření (Nayar et al. 1992), ale i druhy, které se používají jako terapeutické prostředky v tradiční medicíně (Kothari et al. 2019, 2020, Kurnia et al. 2021). Cibule rostlin jsou bohaté na dvě chemické skupiny látek prospěšné pro lidské zdraví. Jedná se o flavonoidy a alk-(en)-yl cysteinové sulfoxidy (Griffiths et al. 2002), které mají antioxidační, protirakovinné, hypolipidemické, antidiabetické, kardioprotektivní, neuroprotektivní a antimikrobiální účinky (Kothari et al. 2020). Některé druhy mohou dokonce pomoci předcházet šíření nádorů, kardiovaskulárním onemocněním a stárnutí (Štajner et al. 2006).

3.2 Rod *Allium* sect. *Allium*

Jedná se o monofyletickou sekci v rámci podrodu *Allium* (Hirschegger et al. 2010), která zahrnuje přibližně 115 druhů (Mathew 1996), včetně několika ekonomicky významných taxonů, například *A. porrum* L. (pór zahradní) nebo *A. sativum* L. (česnek kuchyňský, Mathew 1996). Tato sekce je rozšířena především v západní a severní Evropě, a také v jihozápadní Asii (Hanelt et al. 1992). Centrum diverzity leží v Íránu, Turecku a v oblasti bývalého Sovětského svazu (Mathew 1996). Jedná se o evolučně mladou skupinu (Hanelt et al. 1992), jejíž evoluce byla zásadně ovlivněna polyploidií (až 8x). Kromě toho byla u některých druhů zaznamenána aneuploidie, případně i výskyt B-chromozomů. Základní chromozomové číslo této sekce je $x = 8$ (Mathew 1996).

Mezi charakteristické morfologické znaky patří zřetelně diferencované, vejcovité až téměř kulovité cibule bez oddenku. Dále pochvy listů kryjící 1/4 až 2/3 výšky stvolu, často ztlustlé. Opadavý toulec, s jedním cípem tvořícím zobánek, nebo vytrvávající, se 2 až 4 cípy. Okvětí zvonkovitého až vejcovitého tvaru. Nitky vnějších tyčinek vždy bez postranních zoubků, nitky vnitřních tyčinek se dvěmi (vzácně více) zřetelnými postranními zoubky, často převyšujícími prašník (Mathew 1996, Krahulec & Duchoslav 2010).

Většina druhů se vyskytuje v širokém rozmezí nadmořských výšek, převážně na suchých stanovištích, a to včetně polopouští (Mathew 1996). Charakteristický je i růst během zimního období s letní dormancí (např. oblast Mediteránu, Hanelt et al. 1992).

3.3 Druh *Allium scorodoprasum* L.

Jedním z poměrně častých druhů sekce *Allium* je *A. scorodoprasum* L. (česnek ořešec, Obrázek 1a, b). Jedná se o téměř výhradně evropský druh, který se izolovaně vyskytuje i v Malé Asii a na Kavkazu (Meusel et al. 1965, Krahulec & Duchoslav 2010). Celkové rozšíření v Evropě sahá od severozápadu (Britské ostrovy), na sever po pobřeží Baltu v Německu a Švédsku, dále na východ přes Pobaltí, Bělorusko a na západní Ukrajinu. Směrem na jih zasahuje do jihovýchodní Francie, severní Itálie, po Bulharsko a evropskou část Turecka (Meusel et al. 1965, Duchoslav & Krahulec 2009, Krahulec & Duchoslav 2010). Tento druh byl v minulosti hojně pěstován jako zelenina, proto není zcela jasné, v kterých oblastech lze jeho výskyt považovat za původní (Krahulec & Duchoslav 2010).

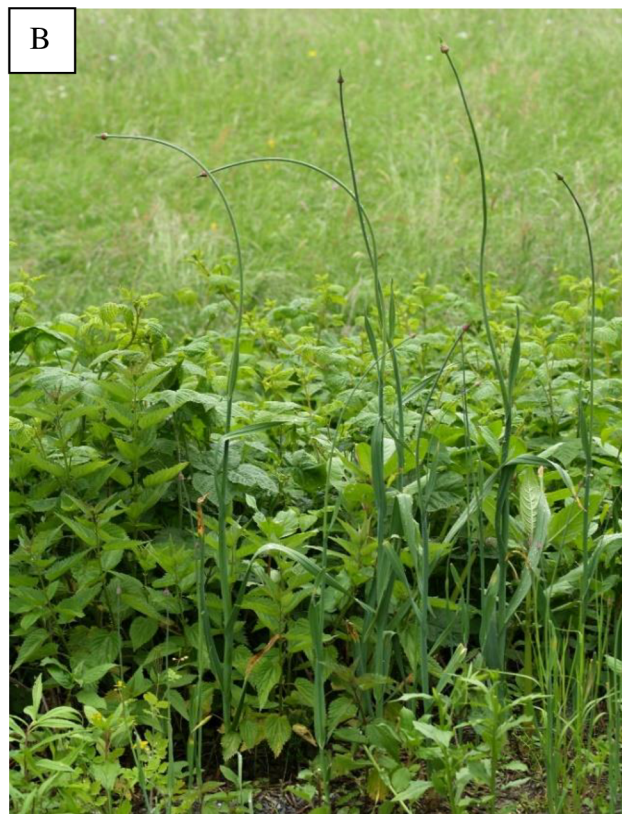
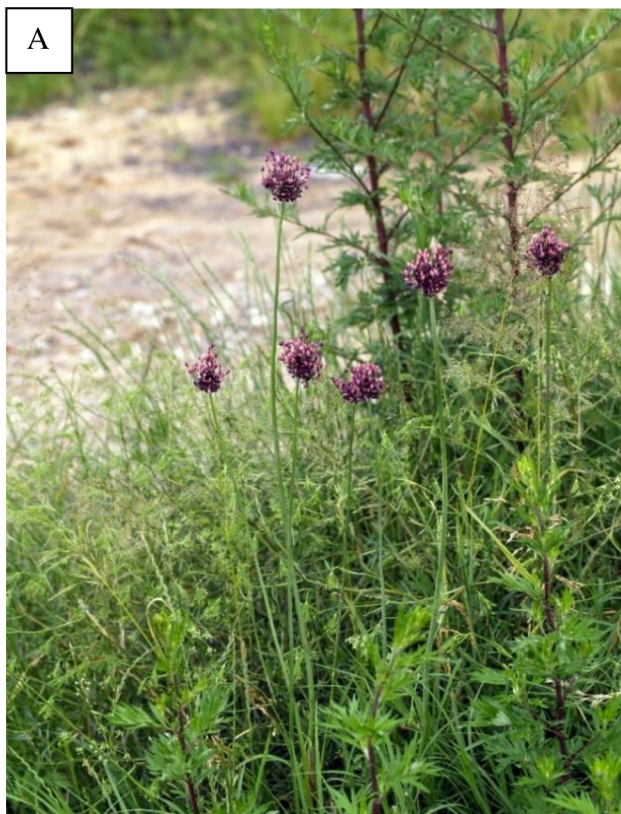
Morfologicky je tento druh charakteristický přítomností vejcovité cibule, 1–2 cm široké v průměru, s blanitými až mírně kožovitými, hnědými až šedavými vnějšími šupinami. Dceřiné cibulky bývají podlouhlé, vejcovité, černo-fialové, vyrůstající pod šupinami cibule a listovými pochvami. Listy v počtu 3 až 5, ploché mělce žlábkovité, na rubu kýlnaté, kratší než stvol a květenství (Obrázek 1c). Listová čepel čárkovitá, až 30 cm dlouhá a 4–30(–50) mm široká, pochvy lysé, zakrývající stvol přibližně z 1/3 jeho výšky. Stvol přímý, oblý, přibližně 40–80(–100) cm vysoký. Květenství tvoří kulovitý lichookolík, 1,5–3,0 cm v průměru, často nepravidelného tvaru, tvořený přisedlými, tmavě purpurovými pacibulkami a několika květy (v počtu 0–20, Obrázek 1d). Květní stopky 3–4 cm dlouhé, různé délky, zprohýbané, hladké a nafialovělé. Listeny na bázi stopek stříbřitě bílé, toulec 1,5–3,0 cm dlouhý, celistvý, na bázi vejcovitý, blanitý, opadavý, na vrcholu se zužující v zobánek až 1 cm dlouhý. Okvětí zvonkovitě vejcovité. Okvětní lístky 4–6 mm dlouhé, zašpicatělé, nachově zbarvené s tmavší střední žilkou, vnější podlouhlé, kýlnaté, drsné na kýlu, vnitřní podlouhle vejčité, širší než vnější. Tyčinky kratší než okvětí. Nitky 2,5–4,5 mm dlouhé, brvitě na bázi, u vnějších tyčinek trojúhelníkovitě šídlovité, bez postranních zoubků, u vnitřních tyčinek s 2 postranními zoubky, vyrůstajícími ve 3/4 délky nitky, 2x delšími než horní část nitky nad jejich oddělením, nepřesahujícími okvětí. Prašníky purpurové. Čnělka z okvětí nevyniká. Tobolka (spolu se semeny) se většinou nevytváří

(sterilní rostliny) nebo jen vzácně. Druh kvete od června do srpna (Mathew 1996, Krahulec & Duchoslav 2010).

Česnek ořešec se nejčastěji vyskytuje v teplejších až mírně teplejších klimatických oblastech. Roste na stinných, polostinných až plně osluněných, vlhkých či čerstvě zamokřelých až suchých stanovištích, jako jsou lužní lesy, vlhké louky, křoviny či vlhké, pobřežní lemy (Özhatay 1993, Krahulec & Duchoslav 2010). Preferuje jílovité, písčitohlinité, čerstvě vlhké až vysychavé půdy bohaté na živiny se slabě kyselou až neutrální reakcí (Krahulec & Duchoslav 2010). Běžně se vyskytuje i na narušovaných a ruderalních stanovištích, jako jsou okraje polí, mezí, vinice, příkopy cest, případně i poloruderalní křoviny a akátiny (Krahulec & Duchoslav 2009).

Česnek ořešec je také tradičně využíván jako léčivá rostlina. Například ve středověku na Balkánském poloostrově se tento druh využíval k léčbě kožních poranění a infekcí, díky hojivým, antimikrobiálním, antienzymatickým a antioxidačním vlastnostem (Stojanovic 2014, Đorđevski et al. 2022).

Blízce příbuzným druhem česneku ořešce je česnek kulovitý (*A. rotundum* L.). Ačkoliv se jedná o morfologicky odlišné, zároveň poměrně dobře rozpoznatelné druhy (cf. Krahulec & Duchoslav 2010), často bývají mezi sebou zaměňovány. Taxonomické postavení obou těchto druhů doznalo několika změn během druhé poloviny 20. století (Duchoslav & Krahulec 2009). Původně samostatně popsané druhy byly během zpracování souborného díla *Flora Europaea* (Stearn 1978, 1980), přeřazeny, společně s příbuznými druhy *A. jajlae* Vved. a *A. waldsteinii* G. Don, na úroveň poddruhu v rámci komplexního druhu *A. scorodoprasum* (Duchoslav & Krahulec 2009). V rámci celkové revize rodu tak Stearn učinil především na základě přítomnosti či nepřítomnosti pacibulek v květenství, tzn. druhy bez pacibulek hodnotil pouze jako poddruhy příbuzných pacibulkatých druhů (Duchoslav & Krahulec 2009). Poddruhy *A. scorodoprasum* dále odlišoval podle tvaru květenství, počtu květů, barvy okvěti a pacibulek a případné tvorby tobolk (Stearn 1980). Později se Mathew (1996), při zpracování díla o sekci *Allium*, vrátil zpět ke klasickému pojetí taxonů jako samostatných druhů, tj. *A. scorodoprasum* a *A. rotundum*, přičemž taxony *A. jajlae* a *A. waldsteinii* přeřadil na poddruhovou úroveň v rámci taxonu *A. rotundum* (Duchoslav & Krahulec 2009). Toto oddělení podporují i odlišné ekologické preference a geografický pattern česneku ořešce a česneku kulovitého (Duchoslav & Krahulec 2009). V rámci evropských flór však taxonomické pojetí obou druhů zůstává nejednotné (např. Pignatti 1982, Tasci & Koca 2015, Mollica et al. 2018, Demir et al. 2022).



Obrázek 1: Druh *Allium scorodoprasum*: a, b) celkový habitus, c) charakter listů d) detail květenství (foto: M. Duchoslav).

3.3.1 Cytotypová variabilita druhu *A. scorodoprasum*

Allium scorodoprasum je polyploidní druh, u kterého byly doposud zaznamenány tři ploidní stupně, a to diploidní ($2n = 2x = 16$), triploidní ($2n = 3x = 24$) a tetraploidní ($2n = 4x = 32$, Krahulec & Duchoslav 2010). Nejrozšířenějším cytotypem jsou diploidi, které nalezneme téměř v celé Evropě. Oproti tomu, rovněž poměrně častí, triploidi se vyskytují zejména ve střední a východní Evropě. Výjimečně se areály těchto dvou cytotypů prolínají a rostou sympatricky (např. na Slovensku nebo v Litvě, Murín & Feráková 1988, Karpavičienė 2013). Nejvzácnější jsou tetraploidi, jejichž výskyt byl ojedinele zaznamenán pouze v některých částech areálu, konkrétně v Bulharsku, Řecku, Turecku či v Íránu (Van Loon 1982, Özhatay 1990, Tzanoudakis 1992, Kuzmanov 1993, Özhatay 2002).

3.3.2 Morfologické a ekologické důsledky polyploidie u druhu *A. scorodoprasum*

Jak již bylo zmíněno výše, polyploidie často ovlivňuje morfologické vlastnosti či ekologické preference druhů, respektive jednotlivých cytotypů. Touto problematikou se u česneku ořešce doposud nikdo pořádně nezabýval, tzn. nebyla provedena žádná komplexní studie, která by porovnávala diploidní, triploidní a tetraploidní populace napříč celým areálem druhu. Byly publikovány pouze studie zaměřené na určitou část areálu, bohužel mimo oblast výskytu tetraploidů (tj. Slovensko, Finsko, Litva, Ukrajina), tudíž porovnávají pouze diploidní a triploidní populace (např. Murín & Feráková 1988, Åström & Hægström 2003, Karpavičienė 2013, 2017).

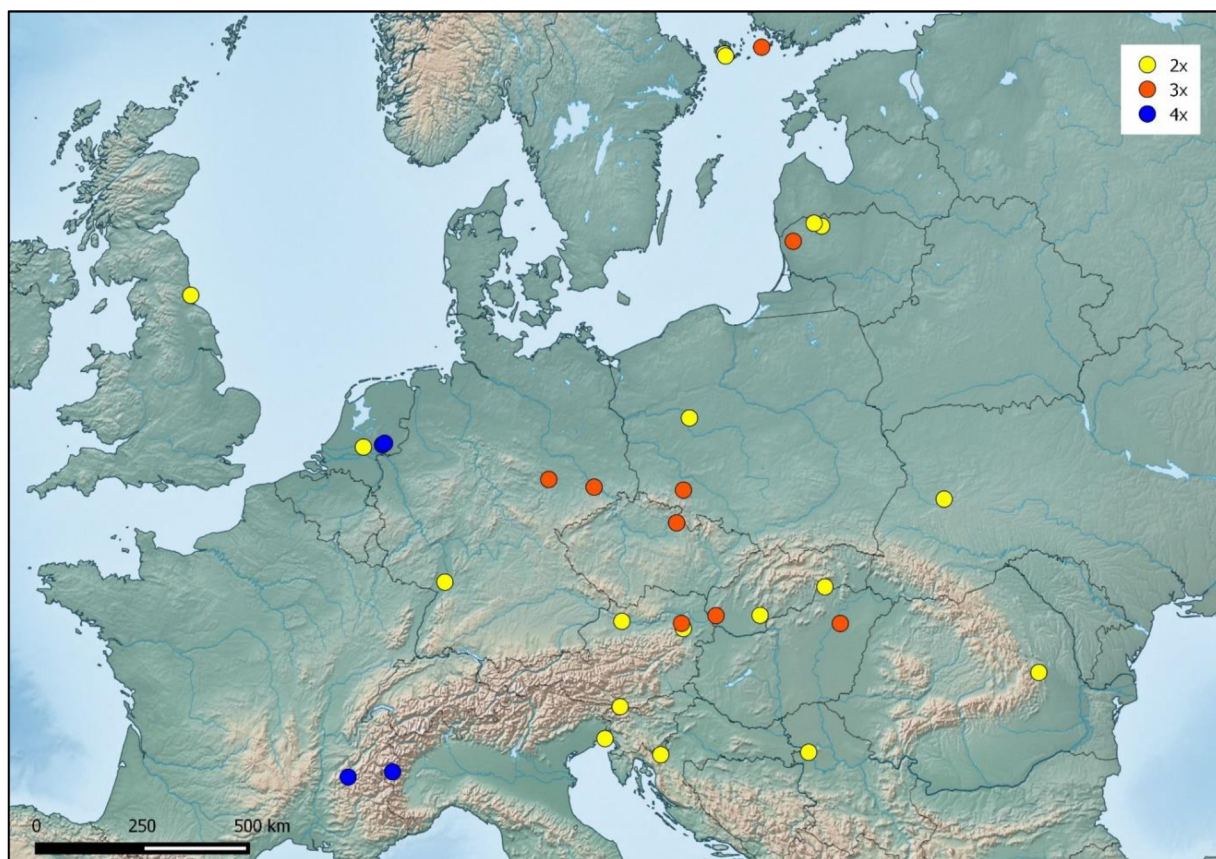
První z těchto prací porovnává morfologii diploidní a triploidní populace na Slovensku a poukazuje na menší průduchy, početnější květenství a vyšší produkci viabilního pylu u diploidů (Murín & Feráková 1988). Morfologické rozdíly mezi diploidy a triploidy byly pozorovány také v rámci karyologické studie populací v jihozápadním Finsku a na západní Ukrajině. Autoři zmiňují především velikost a robustnost rostlin, tj. triploidi nápadně vyšší, statnější (Åström & Hægström 2003). Doposud nejobsáhlejší studie, zahrnující i ekologickou a prostorovou diferenciaci cytotypů, byly provedeny na území Litvy (Karpavičienė 2013, 2017). V Litvě česnek ořešec roste především v údolích řek, ve vzácně zaplavovaných vysokohorských nivách, dále v lužních lesích a při jeho okrajích nebo na polosuchých a mesofilních pastvinách. Diploidní populace se vyskytují především na severu území, kdežto triploidní populace v západní části Litvy (Karpavičienė

2013). Obdobně jako v předchozích studiích, i zde byl potvrzen rozdíl v tvorbě a produkci květů, semen a pacibulek. Diploidi tvořili více květů a produkovali více, v průměru menších pacibulek, kdežto triploidi produkovali menší množství květů a pacibulek, které však byly rozměrově větší. Tvorba semen byla celkově extrémně vzácná a byla zaznamenána pouze u diploidů. Pozorované rozdíly v produkci semen/vegetativních propagulí jsou přisuzovány odlišným světelným podmínkám (Karpavičienė 2017). Žádné další ekologické (např. půdní reakce, typ vegetace) rozdíly však mezi cytotypy zjištěny nebyly (Karpavičienė 2013).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Rostlinný materiál

V předložené bakalářské práci bylo studováno celkem 90 jedinců pocházejících z 31 populací druhu *Allium scorodoprasum* (Tabulka 1). Všechny populace byly přivezeny z přirozených lokalit výskytu a následně byly přesazeny a kultivovány na experimentálním pozemku Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Výběr populací byl proveden tak, aby zahrnoval všechny ploidní stupně, tj. diploidní, triploidní a tetraploidní, a geograficky pokrýval širší část celkového areálu druhu. Navíc byly vybrány pouze populace, které jsou cytotypově uniformní (Obrázek 2). Analyzované rostliny byly souběžně podrobeny studiu morfologických a mikromorfologických znaků (Haničáková I. 2023).



Obrázek 2: Mapa Evropy s vyznačenými populacemi druhu *Allium scorodoprasum*, které byly vybrány pro účely předložené práce (žlutá kolečka: diploidi, červená kolečka: triploidi, modrá kolečka: tetraploidi, vytvořeno v programu QGIS).

Tabulka 1: Přehled studovaných populací druhu *Allium scorodoprasum*. Ploidie rostlin byla zjištěna pomocí průtokové cytometrie, která nebyla předmětem této práce (Kobrllová, Kalous, Duchoslav, nepubl. údaje).

ID populace	Stát	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Počet studovaných jedinců
Diploidní populace (2x)				
13/21	Slovinsko	46.46727778	13.95313889	2
15/278	Ukrajina	49.96294444	25.17722222	3
16/61	Německo	49.18141667	8.425	5
16/122	Itálie	45.806	13.43597222	3
16/142	Rakousko	48.03316667	16.11286111	3
16/231	Polsko	52.49561111	16.95547222	3
16/286	Slovensko	48.14902778	18.60525	2
16/296	Maďarsko	48.56402778	20.80261111	3
16/315	Rumunsko	45.9095	26.91244444	1
16/366	Rakousko	48.28038889	14.15963889	1
16/436	Velká Británie	54.80133333	-1.312888889	4
16/438	Litva	56.16027778	22.74111111	3
16/439	Litva	56.24611111	22.47222222	3
16/453	Finsko	60.09333333	19.93194444	2
16/455	Finsko	60.04611111	19.97194444	3
17/60	Nizozemsko	51.99111111	5.477527778	2
17/105	Chorvatsko	45.39425	15.10661111	3
17/187	Srbsko	45.12761111	19.57344444	3
Triploidní populace (3x)				
15/91	Česká republika	50.29861111	16.19	5
15/112	Slovensko	48.2425	17.19444444	4
16/143	Rakousko	48.14702778	16.06655556	5
16/227	Polsko	50.98011111	16.51594444	2
16/300	Maďarsko	47.74486111	21.11336111	4
16/440	Litva	55.94	21.56972222	4
16/464	Finsko	60.11638889	21.55277778	3
17/68	Německo	51.37319444	11.92725	2
18/56	Německo	51.17355556	13.47236111	1
Tetraploidní populace (4x)				
17/62	Nizozemsko	52.06402778	6.135138889	2
17/63	Nizozemsko	52.09886111	6.208388889	2
18/102	Itálie	45.11177778	6.965861111	4
18/107	Francie	44.95119444	5.639305556	3

4.2 Izolace genomické DNA

Pro účely izolace genomické DNA byl z každé rostliny odebrán jeden čerstvý, zdravý list, zpravidla nejvýše postavený na lodyze, který nevykazoval žádné (nebo téměř žádné) známky napadení patogenem (např. rzi) nebo jiná poškození. Izolace DNA byla provedena podle modifikovaného CTAB protokolu (Doyle & Doyle 1987).

- 1) Do popsaných 2 ml Eppendorf mikrozkuvek byl připraven extrakční pufr smícháním 700 μ l 2% CTAB (cetyltrimetylamonium bromid) pufru (0,1 M Tris HCl pH= 8,0; 0,02 M EDTA pH= 0,8; 1,4 M NaCl; s 1% PVP40) a 2 μ l merkaptoethanolu. Mikrozkuvky s připraveným roztokem byly přehřátý na termomixeru (65 °C).
- 2) Nastříhané čerstvé listy (asi 100 mg) byly homogenizovány v tekutém dusíku a následně přeneseny do připravených mikrozkuvek s přehřátým extrakčním pufrům. Vzorky byly inkubovány ca. 1 hodinu při teplotě 65 °C.
- 3) Po inkubaci byl přidán zhruba stejný objem (tj. 700 μ l) směsi chloroformu a isoamylalkoholu (24:1). Vzorky byly intenzivně protřepány a v předchlazené centrifuge centrifugovány po dobu 15 minut (10 °C, 13 000 rpm).
- 4) Horní fáze z mikrozkuvek (ca. 500 μ l) byla následně přenesena do nových mikrozkuvek obsahujících 500 μ l směsi chloroformu a isoamylalkoholu (24:1). Vzorky byly opět intenzivně protřepány a centrifugovány (15 minut, 10 °C, 13 000 rpm).
- 5) Horní fáze z mikrozkuvek byla poté přenesena do stejného objemu (tj. 400 μ l) ledového isopropanolu. Směs byla lehce promíchána a precipitována přes noc v mrazáku (-20 °C).
- 6) Po precipitaci (druhý den) byla směs centrifugována po dobu 15 minut při 4 °C a 13 000 rpm.
- 7) Obsah mikrozkuvek (supernatant) byl následně opatrně vylit tak, aby sediment (pelet) nevyjel ven z mikrozkuvek. Po mírném proschnutí sedimentu bylo přidáno 200 μ l 10x TE pufru. Posléze byl sediment odlepen, rozpuštěn na třepačce a ponechán po dobu 30 minut v ledničce.
- 8) Po precipitaci bylo do každého vzorku přidáno 5 μ l RNAsy (5 μ g/ml). Směs byla inkubována na třepačce po dobu 30 minut při 37 °C.
- 9) Poté bylo do mikrozkuvek přidáno 20 μ l NaAc (acetát sodný) a dvojnásobek objemu (tj. 440 μ l) ledového 96% ethanolu. Vzorky byly precipitovány alespoň 30 minut při 4 °C.

- 10) Následně byla provedena centrifugace (15 minut, 4 °C, 13 000 rpm). Po centrifugaci byl supernatant opatrně vylit a sediment byl promyt 80% ethanolem (700 µl) a opět centrifugován (15 minut, 4 °C a 13 000 rpm).
- 11) Supernatant byl opět vylit, sediment byl promyt 70% ethanolem (700 µl) a centrifugován (15 minut, 4 °C, 13 000 rpm).
- 12) Supernatant byl opatrně vylit a sediment byl následně vysušen v sušičce po dobu 30 minut při 35 °C.
- 13) Vysušený sediment byl nakonec rozpuštěn v dH₂O (100 µl).

4.3 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace a čistota extrahované DNA byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop Thermo ND – 1000. Před začátkem měření byly vzorky důkladně promíchány a stočeny na stolní centrifuze. K měření koncentrace bylo použito 1,5 µl DNA. Dle naměřených koncentrací byly všechny vzorky naředěny na koncentraci 50 ng/µl. U vzorků s nižšími koncentracemi byla pro účely PCR reakcí využita genomická DNA. Kvalita DNA byla odhadnuta na základě poměru hodnot absorbcí při 260 a 280 nm, přičemž poměr čisté DNA se pohybuje od 1,8 do 2,0. Poměr nižší než 1,8 poukazuje na možnou kontaminaci proteiny, kdežto poměr vyšší než 2,0 na kontaminaci organickými sloučeninami (např. chloroformem).

4.4 Gelová elektroforéza

Kvalita extrahované DNA byla současně ověřena pomocí 1% agarózové elektroforézy (1 g agarózy na 100 ml 0,5x TBE pufrem).

- 1) 1% agarózový gel byl připraven smícháním příslušného množství agarózy a 0,5x TBE pufrem.
- 2) Směs byla následně promíchána a rozvařena v mikrovlnné troubě tak, aby vznikl čirý roztok.
- 3) Po ochlazení bylo do směsi přidáno interkalační činidlo GelRed (1,5 µl na 100 ml gelu). Směs byla promíchána a nalita do elektroforetické vaničky s již připravenými hřebínky. Výsledný gel tuhl po dobu zhruba 30 minut.
- 4) Po ztuhnutí gelu byly vytaženy hřebínky a vanička byla vložena do elektroforetické vany, která byla naplněná 0,5x TBE pufrem.

- 5) Do jamek byly poté napipetovány 3 µl DNA smíchané s pufrem 5X Green Go Taq Buffer. Do první jamky každé řady byl vždy nanesen ladder (žebřík, 3 µl).
- 6) Separace vzorků byla provedena po dobu 30 minut při napájení 100 V.
- 7) Po ukončení elektroforézy byl gel opatrně vyjmut z elektroforetické vany a vložen do komory UV transilluminátoru Fire-Reader V4, kde proběhla vizualizace a následná fotografická dokumentace gelu.

4.5 Amplifikace vybraných oblastí DNA pomocí PCR reakce

Pro testování amplifikace byl vybrán jaderný úsek ITS (primery ITS1 a ITS4, White et al. (1990)) a dva chloroplastové úseky: *ndhJ-trnF* (primery: *ndhJ*, Shaw et al. (2007); *TabE*, Taberlet et al. (1991)) a *trnH-psbA* (primery: *trnH*, Tate & Simpson (2003); *psbA*, Sang et al. (1997)). Přehled amplifikovaných úseků a sekvence použitých primerů jsou zahrnuty v Tabulce 2.

Tabulka 2: Testované DNA markery. Tabulka zahrnuje název úseku, k němu použité primery a jejich sekvence, včetně příslušné citace.

Marker	Označení primerů	Sekvence	Reference
ITS	ITS1 – forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. (1990)
	ITS4 – reverse	TCCTCCGCTTAATTGATATGC	White et al. (1990)
<i>ndhJ-trnF</i>	<i>TabE</i> – forward	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	Taberlet et al. (1991)
	<i>ndhJ</i> – reverse	ATGCCYGAAAGTTGGATAGG	Shaw et al. (2007)
<i>trnH-psbA</i>	<i>psbA</i> – forward	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang et al. (1997)
	<i>trnH</i> – reverse	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	Tate & Simpson (2003)

Před samotnou přípravou PCR reakce byly jednotlivé komponenty vždy rozmrazeny, pečlivě promíchány a stočeny na centrifuze. Nejprve byl připraven PCR premix (viz Tabulka 3), který obsahoval všechny komponenty reakce kromě DNA. Tento premix byl opět promíchán a krátce centrifugován. Následně byl PCR premix rozpipetován do připravených a popsaných mikrozkušavek (stripů), které byly umístěny na ledu. Do každé mikrozkušavky bylo vždy napipetováno 14 µl PCR premixu. Poté byl do každé mikrozkušavky přidán 1 µl DNA vzorku. Takto připravené vzorky byly opět krátce

stočeny na stolní centrifuze. Poté byly umístěny do termocycleru se zvoleným programem, kde probíhala PCR reakce (Tabulka 4).

Úspěšnost PCR reakce byla ověřena pomocí 1% agarózovém gelu (kapitola 4.4). Pokud PCR reakce proběhla, vzorek na výsledné fotografické dokumentaci jasně světélkoval.

Tabulka 3: Protokol pro přípravu PCR premixu. Uvedené objemy platí pro přípravu 1 vzorku.

Komponenty PCR premixu	Popetovaný objem
Sterilní dH ₂ O	8,9 µl
Reakční pufr (GoTaq Buffer)	3 µl
MgCl ₂	1,25 µl
Forward primer	0,25 µl
Reverse primer	0,25 µl
dNTPs	0,25 µl
Taq polymeráza	0,1 µl
Celkový objem	14 µl

Tabulka 4: Podrobný popis programů pro PCR reakce testovaných lokusů.

	ndhJ–trnF, trnH–psbA (36 cyklů)		ITS (35 cyklů)	
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	95 °C	5 min
Denaturace	95 °C	30 s	95 °C	30 s
Annealing (nasedání primerů)	52 °C	30 s	56 °C	45 s
Elongation (prodlužování primerů)	72 °C	30 s	72 °C	45 s
Final elongation (finální prodloužení)	72 °C	15 min	72 °C	5 min
Konec reakce	4 °C	∞	8 °C	∞

4.6 Příprava vzorků na sekvenaci

Všechny vzorky byly před odesláním na sekvenaci přečištěny a zbaveny zbytků nežádoucích nukleotidů a primerů. Přečištění vzorků probíhalo za pomoci enzymů, a to exonukleázy (EXO I) a termosenzitivní alkalické fosfatázy (FastAP). Složení premixu pro tuto reakci je uvedeno v Tabulce 5. K 5 μl PCR produktu bylo přidáno 3,75 μl tohoto premixu. Vzorky byly následně stočeny a vloženy do termocycleru, kde probíhala daná reakce (tzn. inkubace 37 °C, 15 minut, zahřívání směsi na 85 °C, 15 minut). Přečištěné vzorky byly pipetovány do 96 jamkových PCR desek, vždy 5 μl vzorku na jamku společně s 5 μl primeru (forward nebo reverse). Takto nachystané desky byly následně odeslány na sekvenaci, která probíhala komerčně s využitím firmy Macrogen (Amsterdam, Nizozemsko).

Tabulka 5: Protokol premixu na přečištění PCR produktu. Uvedené objemy platí pro přípravu 1 vzorku.

Komponenty reakce	Pipetovaný objem
EXO I (Exonuclease I)	0,1 μl
FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase)	0,0375 μl
Buffer FastAP	0,5625 μl
Sterilní dH ₂ O	3,05 μl
Celkem na 1 vzorek	3,75 μl

4.7 Zpracování sekvencí a fylogenetické analýzy

Získané sekvence byly upraveny a zpracovány v programu Geneious® 7.1.7 (Kearse et al. 2012). Nejprve byly ořezány nečitelné části (konce) sekvencí a následně byl vytvořen alignment, tj. homologními úseky byly sekvence zarovány pod sebe. Výsledný alignment byl uložen ve formátu FASTA. Vzhledem k nízké variabilitě použitých primerů (viz níže) byly provedeny pouze ilustrační analýzy, za cílem seznámit se s používanými programy při zpracování sekvenačních dat.

V první řadě byla zjištěna haplotypová diverzita pomocí webového nástroje FaBox (Villesen 2007), za použití modulu “DNA to haplotype collapser and converter“. Následně byla v programu MEGA 6 (Tamura et al. 2013) provedena analýza maximální

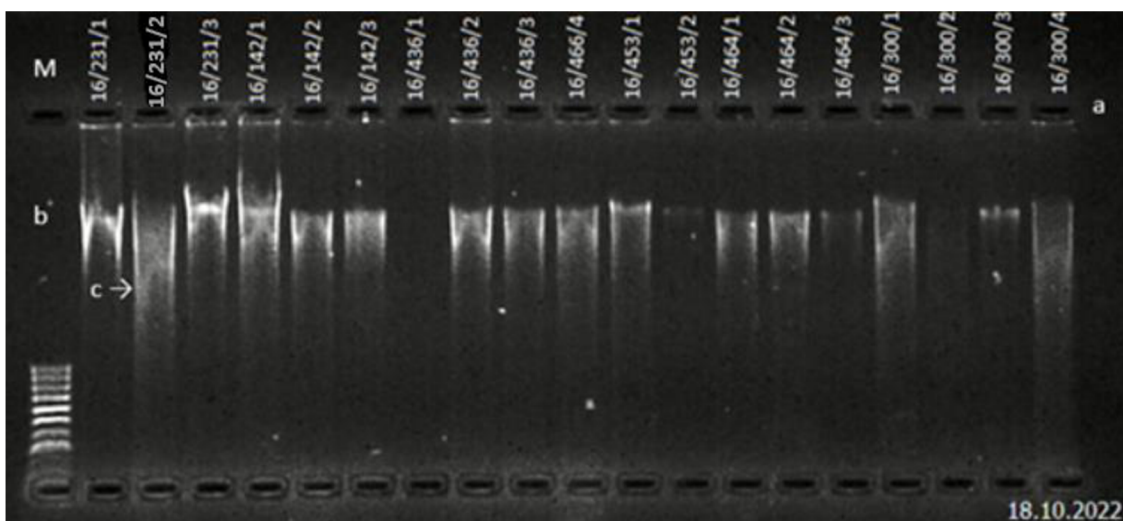
věrohodnosti (Maximum likelihood = ML). Nejprve byly vybrány vhodné substituční modely evoluce sekvencí DNA pomocí modulu “Find Best DNA Model“ (Tabulka 6) pro následné vytvoření stromů metodou ML.

Tabulka 6: Vybrané modely u metody maximální věrohodnosti (Maximum likelihood = ML) pro jednotlivé testované lokusy. JC = Jukes-Cantor model (Jukes & Cantor 1969); přítomnost nevariantních míst (+ I; Shoemaker & Fitch 1989); T92 = Tamura 3-parametrový model (Tamura 1992).

Marker	Substituční model
ITS	JC + I
trnH-psbA	T92
ndhJ-trnF	T92

5. VÝSLEDKY

Pro izolaci DNA bylo použito 90 jedinců z 31 cytotypově uniformních populací (2x: 18 populací, 3x: 9 populací a 4x: 4 populace). Genomická DNA byla vyizolována za pomoci modifikovaného CTAB protokolu (Doyle & Doyle 1987). V první řadě byla kvalita DNA ověřena pomocí gelové elektroforézy (Obrázek 3). Izolace DNA nebyla u všech vzorků zcela úspěšná. Velká část vzorků měla získanou DNA degradovanou (fragmentovanou). Pěkný band vyizolované DNA je patrný například u vzorku 16/300/3, a naopak degradovanou DNA lze vidět u vzorku 16/231/2 (Obrázek 3). Následně byla stanovena i koncentrace a čistota extrahované DNA. Naměřené hodnoty koncentrace DNA se pohybovaly v rozmezí 13,7–1953,5 ng/μl (Tabulka 7). Vzorky s nízkou koncentrací DNA pod 70 ng/μl se dále neředily a pracovalo se přímo s genomickou DNA. V ostatních případech byly vzorky naředěny na koncentraci 50 ng/μl. Na základě poměru hodnot absorbcí při 260 a 280 nm byla odhadnuta kvalita DNA. Tento poměr se u většiny vzorků pohyboval v rozmezí hodnot 1,8–2,0, případně byl o pár desetín nižší (viz Tabulka 7), což vypovídá o tom, že u většiny vzorků byla DNA čistá (v rozmezí 1,8–2,0), popřípadě lehce kontaminovaná proteiny (poměr nižší než 1,8).



Obrázek 3: Příklad výsledné gelové elektroforézy vyizolované genomické DNA (DNA Ladder (100 bp), a – start jamky, kde byla napipetována DNA, b – vyizolovaná genomická DNA, c – degradovaná DNA).

Tabulka 7: Koncentrace a čistota vyizolované genomické DNA diploidních, triploidních a tetraploidních populací *A. scorodoprasum*.

ID vzorku	Koncentrace (ng/μl)	260/280	260/230
Diploidní populace (2x)			
13/21/1	158,9	1,73	0,6
13/21/2	60,6	1,41	0,46
15/278/1	86,3	1,71	0,46
15/278/2	97,5	1,74	0,58
15/278/3	178,2	1,83	0,85
16/61/1	264,4	1,84	0,93
16/61/2	255	1,87	0,81
16/61/3	319,4	1,96	0,97
16/61/4	241,4	1,89	0,82
16/61/5	281,6	1,92	0,98
16/122/1	217,8	1,79	0,56
16/122/2	123,3	1,7	0,56
16/122/3	200,6	1,81	0,65
16/142/1	131,7	1,83	0,52
16/142/2	114,4	1,94	0,64
16/142/3	119,1	2	0,5
16/231/1	98,8	1,71	0,63
16/231/2	1953,5	1,75	1,17
16/231/3	81,2	1,74	0,46
16/286/1	407	1,98	0,81
16/286/2	67	1,64	0,48
16/296/1	167,9	1,79	0,77
16/296/2	107,8	1,95	0,6
16/296/3	184,5	1,8	0,66
16/315/1	179,5	1,56	0,67
16/366/1	134,5	1,72	0,61
16/436/1	161,4	1,81	0,68
16/436/2	13,7	1,69	0,46
16/436/3	143,4	1,82	0,68
16/436/4	145	1,86	0,68
16/438/1	274,5	1,76	0,91
16/438/2	120,3	1,71	0,7
16/438/3	275,6	1,79	0,75
16/439/1	150,5	1,76	0,68
16/439/2	106,4	1,82	0,78
16/439/3	188,8	1,78	0,68

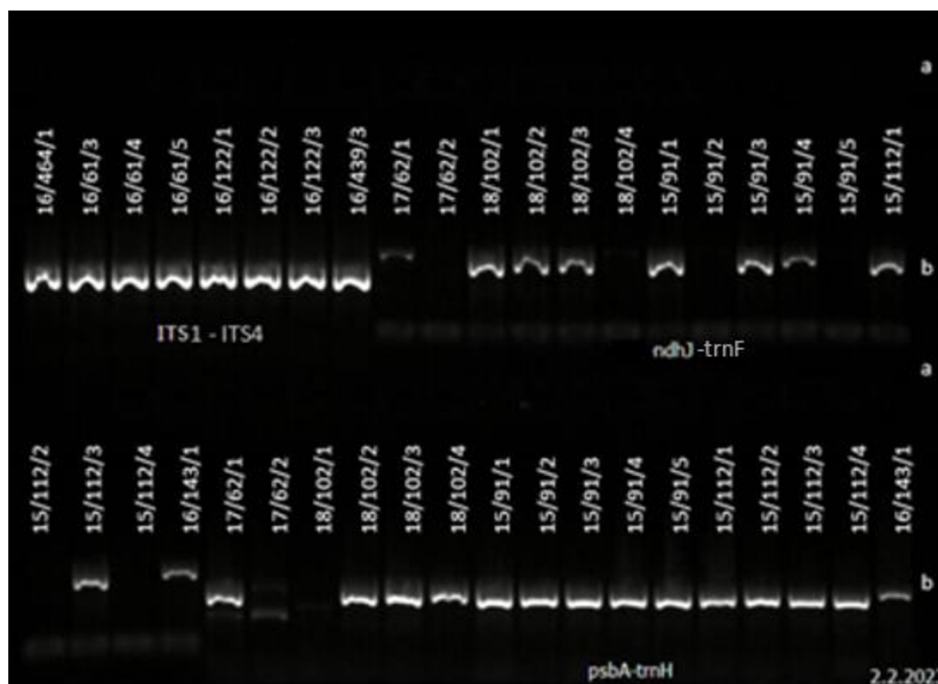
Tabulka 7: pokračování.

ID vzorku	Koncentrace (ng/μl)	260/280	260/230
16/453/1	313,3	1,96	0,85
16/453/2	368,9	1,74	0,91
16/455/1	300,8	1,87	0,95
16/455/2	374,5	1,85	1,1
16/455/3	296,4	1,89	1
17/60/1	351,7	1,88	0,95
17/60/2	503,8	1,84	1,11
17/105/1	144,6	1,72	0,65
17/105/2	29,5	1,48	0,24
17/105/3	308,3	1,78	0,68
17/187/1	440,3	1,84	0,83
17/187/2	393,6	1,84	0,66
17/187/3	369,3	1,83	0,82
Triploidní populace (3x)			
15/91/1	283,2	1,87	0,91
15/91/2	204,2	1,98	0,69
15/91/3	682,6	1,85	0,97
15/91/4	117,5	1,78	0,62
15/91/5	48	1,45	0,69
15/112/1	178,9	1,82	0,73
15/112/2	89,3	1,82	0,82
15/112/3	256,4	1,94	1,35
15/112/4	224,6	1,83	0,84
16/143/1	32,7	1,6	0,41
16/143/2	230,2	1,9	0,71
16/143/3	241,7	1,85	0,94
16/143/4	145,8	1,85	0,68
16/143/5	270,8	1,84	1,15
16/227/1	31,4	1,6	0,64
16/227/2	227,2	1,73	0,76
16/300/1	81,1	1,76	0,62
16/300/2	218,2	1,88	0,7
16/300/3	237,7	1,75	0,64
16/300/4	250,9	1,69	0,66
16/440/1	75	1,56	0,41
16/440/2	175,3	1,62	0,77
16/440/3	85	1,7	0,51
16/440/5	69	1,54	0,59

Tabulka 7: pokračování.

ID vzorku	Koncentrace (ng/μl)	260/280	260/230
16/464/1	37,1	1,46	0,29
16/464/2	120,1	1,91	0,64
16/464/3	123,4	1,81	0,62
17/68/1	382,7	1,87	1,02
17/68/2	23,2	1,86	0,66
18/56/1	185,9	1,61	0,59
Tetraploidní populace (4x)			
17/62/1	127,1	1,76	0,9
17/62/2	61,1	1,61	0,52
17/63/1	108	1,77	0,78
17/63/2	201,2	1,79	0,89
18/102/1	374,4	1,9	1,07
18/102/2	160,8	1,87	0,99
18/102/3	172	1,92	0,87
18/102/4	223,2	1,78	0,86
18/107/1	180	1,76	0,84
18/107/2	328,8	1,91	1,08
18/107/3	363,7	1,9	0,96

Následně byla u všech vzorků provedena PCR reakce. PCR reakce byla úspěšná a proběhla u všech tří testovaných molekulárních markerů (ITS, ndhJ-trnF a trnH-psbA, Obrázek 4). U některých vzorků nebyla amplifikace za standardních podmínek (Tabulka 3) úspěšná. Tyto vzorky byly následně znovu amplifikovány s upraveným PCR premixem, tj. zvýšení objemu MgCl₂ (1,5–2 μl) a DNA (2 μl). Následně již PCR reakce proběhla u všech vzorků.

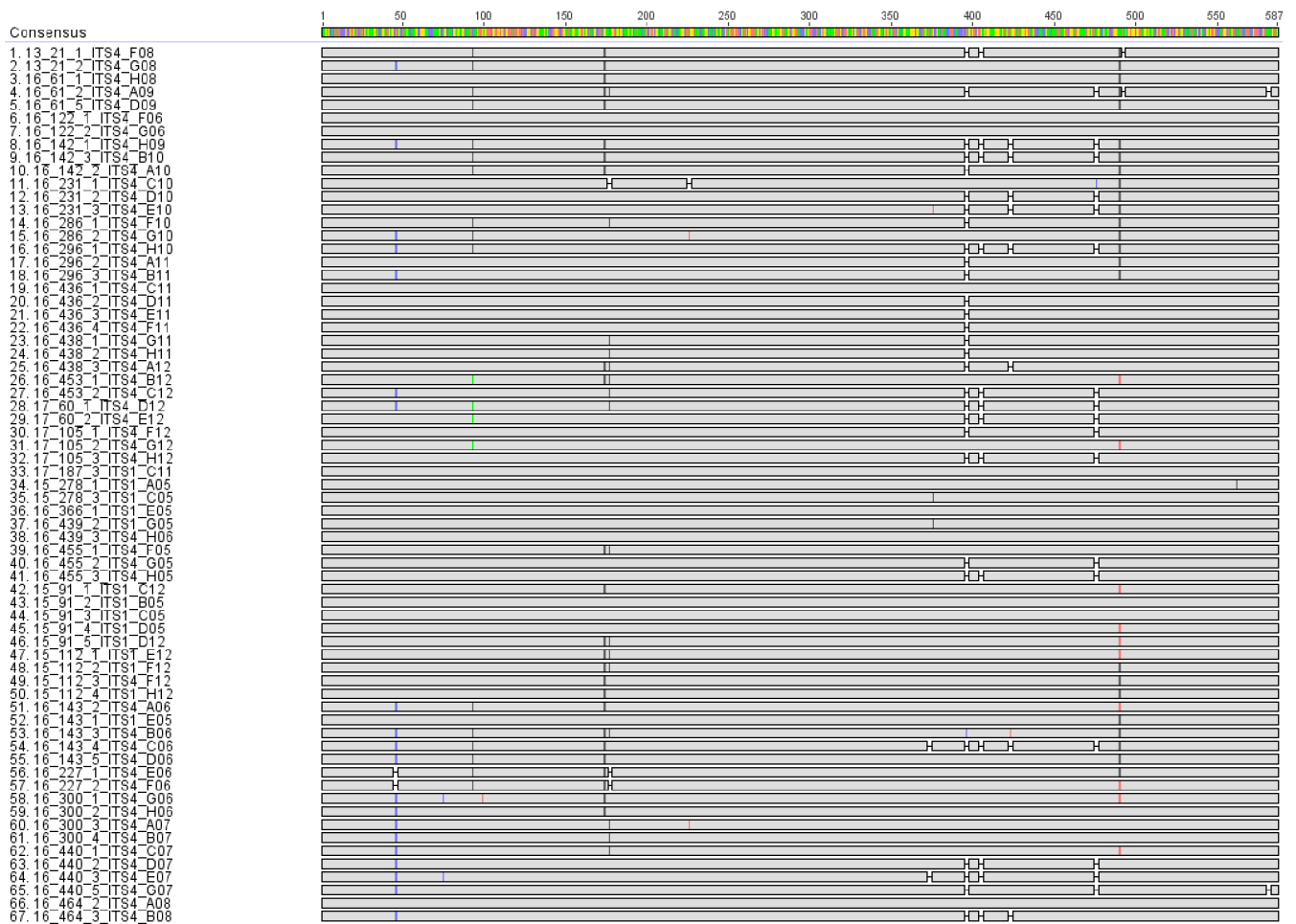


Obrázek 4: Výsledek agarozové elektroforézy testovaných markerů (ITS, ndhJ-trnF, trnH-psbA).

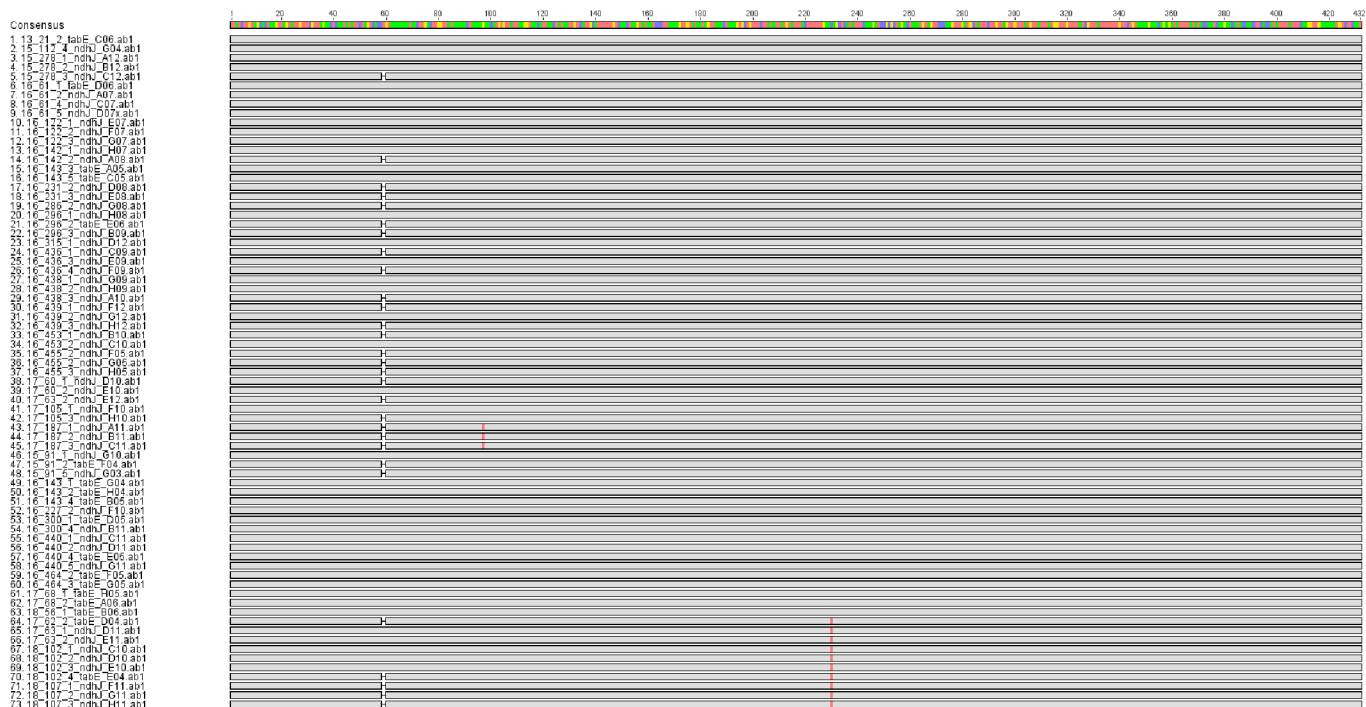
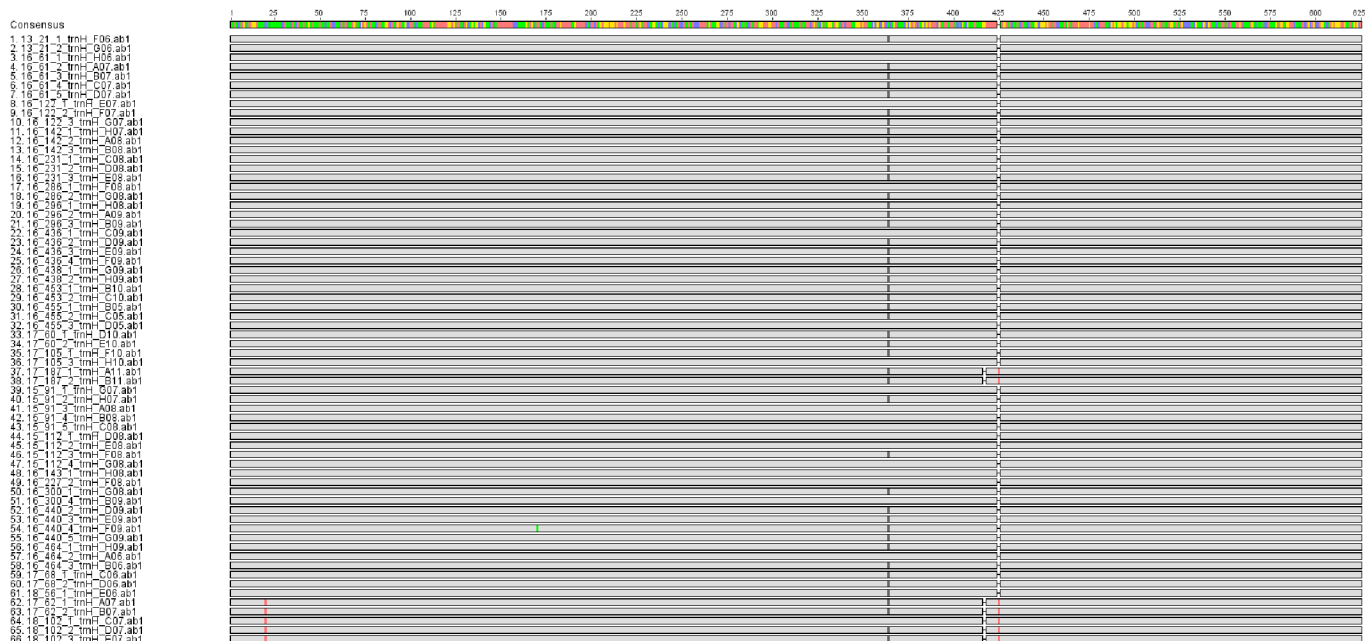
Vzhledem k nízké variabilitě testovaných markerů (Obrázek 5, 6) nebyly na zkoumaném datasetu prováděny detailní fylogenetické analýzy. V případě jaderného lokusu ITS byly navíc pozorovány překrývající se peaky na chromatogramu (Obrázek 7), které poukazují na neúplnou homogenizaci daného úseku (viz diskuze). Bohužel některé vzorky byly doposud sekvenovány pouze s jedním primerem (reverse), proto bude nutné u všech doplnit i sekvenci s použitím forward primeru. Pro chloroplastový marker trnH-psbA bylo získáno 38 sekvencí od diploidů, 22 sekvencí od triploidů a 5 sekvencí od tetraploidů. Pro chloroplastový marker ndhJ-trnF pak 44 sekvencí od diploidů, 17 sekvencí od triploidů a 10 sekvencí od tetraploidů. A nakonec pro jaderný marker ITS bylo získáno od diploidů 40 sekvencí, od triploidů 28 sekvencí a od tetraploidů 9 sekvencí (Obrázek 8).

Pro účely bakalářské práce byla otestována alespoň haplotypová diverzita studovaného souboru populací (vzhledem k neúplnosti dat ribotypová diverzita testována nebyla, viz Příloha 1) a sestaveny (pouze ilustrační) stromy pro všechny tři markery (Obrázek 8).

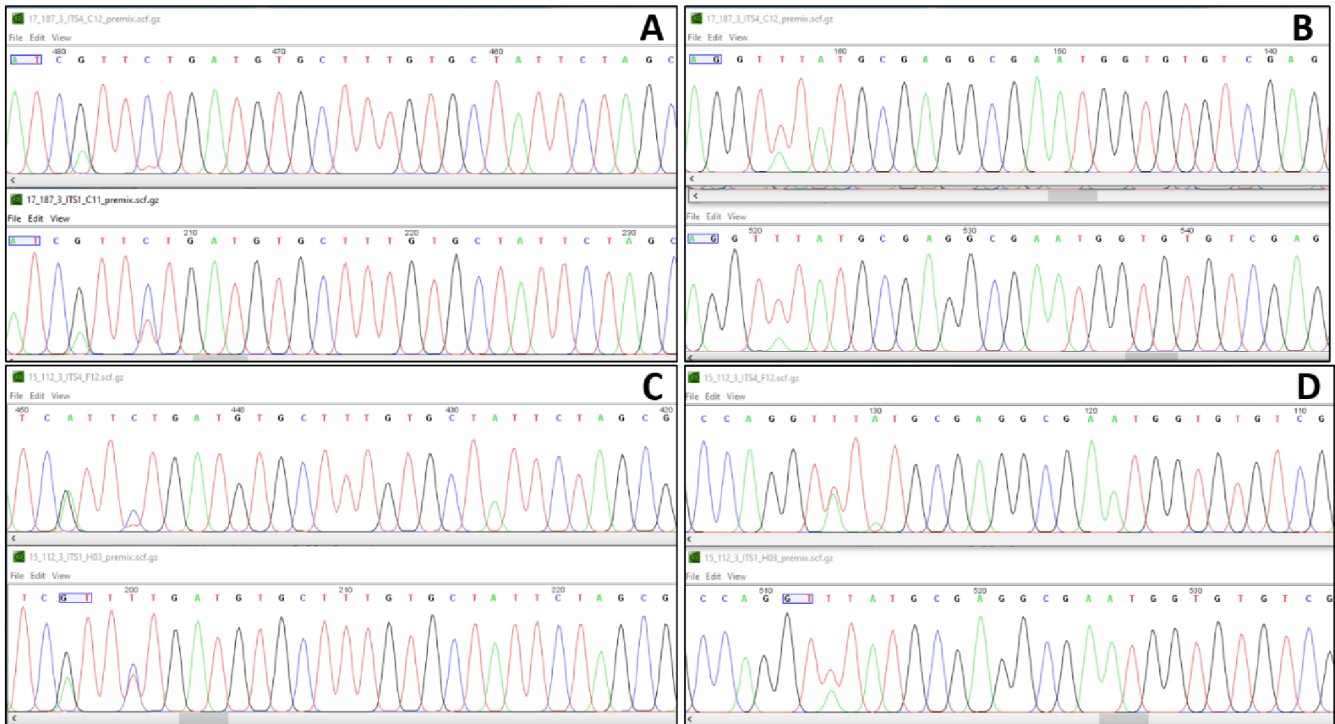
Vzhledem k nízké variabilitě testovaných markerů není na výsledných fylogenetických stromech patrný téměř žádný patern. Za zmínku stojí pouze rozlišení tetraploidních jedinců (Obrázek 8).



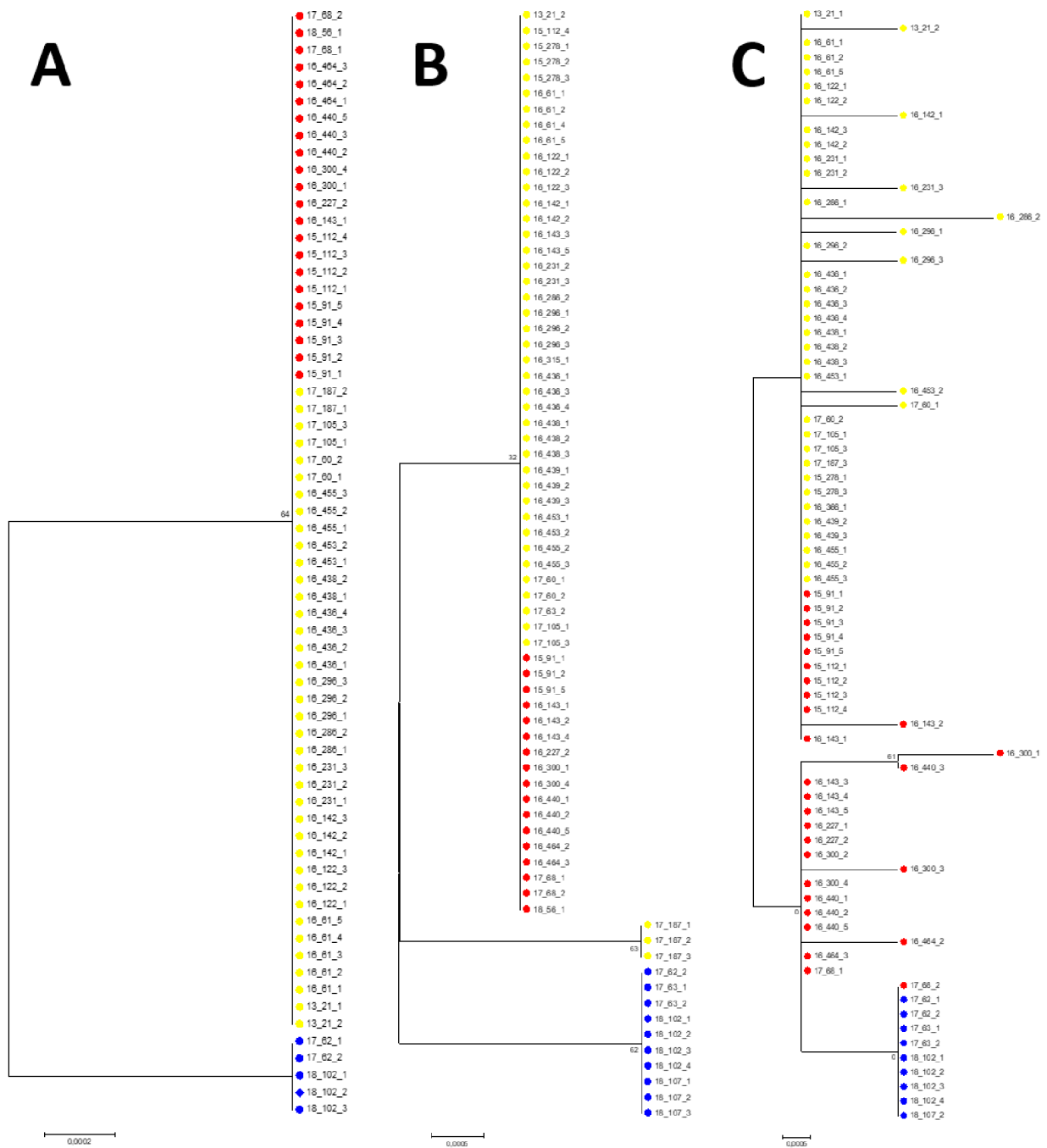
Obrázek 5: Výsledný alignment sekvenovaného jaderného lokusu ITS. Čísla v konsenzuální sekvenci reprezentují pořadí nukleotidů ve výsledném elignmentu. Zobrazeny jsou pouze odlišné části (SNP) studovaných sekvencí, šedá barva zobrazuje shodu se sekvencí konsenzuální, ostatní barvy představují jednotlivé, odlišné nukleotidy (zelená = T, červená = A, modrá = C, žlutá = G), prázdné místo („gap“) pozici, ve které chybí daný úsek přítomný v ostatních sekvencích.



Obrázek 6: Výsledný alignment dvou sekvenovaných chloroplastových lokusů *trnH-psbA* (horní část obrázku) a *ndhJ-trnF* (dolní část obrázku). Čísla v konsenzuální sekvenci reprezentují pořadí nukleotidů ve výsledném elignmentu. Zobrazeny jsou pouze odlišné části (SNP) studovaných sekvencí, šedá barva zobrazuje shodu se sekvencí konsenzuální, ostatní barvy představují jednotlivé, odlišné nukleotidy (zelená = T, červená = A, modrá = C, žlutá = G), prázdné místo („gap“) pozici, ve které chybí daný úsek přítomný v ostatních sekvencích.



Obrázek 7: Ukázky chromatogramů sekvencí jaderného lokusu ITS ilustrující pozorovanou nehomologii v tomto úseku. a, b) diploidní jedinec 17/187/3; c, d) triploidní jedinec 15/112/3.



Obrázek 8: Sestavené fylogenetické stromy pomocí metody maximální věrohodnosti pro všechny tři markery: a) trnH-psbA; b) ndhJ-trnF; c) ITS (žlutá kolečka: diploidi, červená kolečka: triploidi, modrá kolečka: tetraploidi).

6. DISKUZE

V dnešní době představuje izolace genomické DNA téměř rutinní laboratorní záležitost. Některé firmy dokonce nabízí komerční izolační kity umožňující v několika rychlých krocích extrahovat DNA. Nevýhodou je však poměrně vysoká cena a mnohdy i nízká kvalita získané DNA. Zejména u rostlin obsahující vysoké množství sekundárních metabolitů, polysacharidů, slizových látek apod. (např. *Cactaceae* Juss., *Crassulaceae* J. St.-Hil., *Euphorbiaceae* Juss.) je nutné volit „složitější“, mnohdy modifikované izolační protokoly (např. CTAB, Sorbitol, Doyle & Doyle 1987). Například u rodu *Opuntia* Mill. je vyizolovaná DNA kontaminována slizem a pektinem. Zatímco pektin je jednou z hlavních složek buněčných stěn, sliz je komplexní polysacharid s rozvětvenou strukturou. Tyto sloučeniny snižují výtěžky genomové DNA. Extrakce DNA bez pektinu a slizu je tak klíčovým krokem pro následné analýzy založené na PCR reakci. Proto je nutné použití protokolů, které izolují DNA bez těchto inhibičních sloučenin a tím ovlivní i vyšší výtěžnost DNA (Martínez-González et al. 2017).

Pro izolaci DNA je možné použít rostlinný materiál jak čerstvý, tak i mražený, sušený nebo uchovávaný chemicky (Weising et al. 2005, Flegr 2009). Jako nejvhodnější materiál k izolaci česneků se zdají být čerstvé a zdravé listy (ze sušených listů bývá DNA fragmentovaná, Kobrlová, pers. com.). Stav listů, ze kterých chceme izolovat, je velice důležitý, protože nám ovlivňuje výslednou kvalitu DNA. Pokud je list například moc starý (suchý) může mít výsledná DNA nízkou koncentraci nebo může být degradovaná (fragmentovaná). Navíc pokud je list napadený patogenem (např. rzi, což je u česneků velmi časté), může být vyizolovaná DNA kontaminována.

V rámci této práce bylo studováno 31 cytotypově uniformních populací, dohromady celkem 90 jedinců. DNA byla získána u všech studovaných vzorků a u většiny byla spíše nízké kvality. Kvalitní vyizolovanou DNA lze pozorovat například u vzorku 16/231/3 (Obrázek 3), jeden jasný, svítící proužek (band). Naopak u většiny vzorků lze vidět fragmentovanou DNA (např. 16/231/2, Obrázek 3) jako šmouhu pod jamkou. Absence bandu, byla patrně zapříčiněna chybným pipetováním vzorku DNA do jamky gelu. Toto možno pozorovat například u vzorku 16/436/1, který na výsledném gelu nesvítí, ale koncentrace DNA na NanoDropu pro tento vzorek byla naměřena (161,4 ng/μl, Obrázek 3). Vysoké hodnoty koncentrace DNA jsou naměřeny u vzorků s fragmentovanou DNA, protože obvykle fragmenty zvyšují naměřenou koncentraci (např. u vzorku 16/231/2, Obrázek 3, Tabulka 7).

Vhodnost využití DNA pro následné molekulárně-genetické analýzy lze otestovat pomocí PCR reakce. Tato metoda dokáže vytvořit mnoho kopií daného úseku DNA za krátkou dobu (Kubista et al. 2006). Pro úspěšnou amplifikaci daného úseku mnohdy stačí malé množství DNA (obvykle 1–2 µl). V této práci byl vybrán a testován jeden jaderný (ITS) a dva chloroplastové (trnH-psbA a ndhJ-trnF) DNA markery, které se využívají při studiu genetické variability různých skupin rodu *Allium* v rámci olomoucké pracovní skupiny (Duchoslav a kol.). Amplifikace všech testovaných úseků pomocí PCR reakce se u některých vzorků na poprvé nezdařila, a proto byla opakována s optimalizací podmínek PCR reakce. Neúspěšnost amplifikace byla nejspíše zapříčiněna přítomností inhibitorů (např. polysacharidy), indelů nebo také horší kvalitou DNA. Možnou příčinou neproběhlé PCR reakce mohla být chyba při pipetování PCR premixu. PCR produkt byl v závěru získán od všech vzorků pro všechny tři použité markery (Obrázek 4).

Sekvenací DNA lze získat data, která poskytují určité informace o daném organismu a tato data se často využívají při rekonstrukci fylogeneze (Avice 1994). V této bakalářské práci byla využita Sangerova metoda sekvenování. Získaná sekvenční data vykazovala nízkou variabilitu testovaných markerů a také nehomologii jaderného úseku ITS. V sekvencích tohoto úseku se v určitých místech jednotlivé peaky překrývali, a tudíž nešlo jasně identifikovat o jakou bázi se jedná. S úsekem ITS je spojen pojem concerted evolution (koncertovaná evoluce), kdy v důsledku hybridizace se v genomu F1 generace hybridů vyskytují oba rodičovské typy sekvencí nrDNA. Následně v dalších generacích díky concerted evolution dochází k různému stupni homogenizace těchto sekvencí jako je eliminace jednoho rodičovského typu, udržování obou typů rodičovských sekvencí nebo vznik nového typu sekvencí, které jsou chimérami obou rodičovských typů (Krač 2011).

Ze získaných sekvencí byly sestaveny pouze ilustrační fylogenetické stromy, a to za pomoci metody maximální věrohodnosti (ML). Fylogenetický strom pro chloroplastový marker trnH-psbA spojuje diploidy a triploidy do jedné skupiny, a naopak tetraploidy řadí do odlišné skupiny. Toto rozdělení podporuje i strom pro chloroplastový marker ndhJ-trnF, který také ukazuje, že se jedna diploidní skupina 17/187 odděluje od zbytku diploidů do samostatné skupiny. Strom pro jaderný marker ITS shlukuje diploidy a část triploidů do jedné skupiny. Zbývá část triploidů je ve stromu postavená blíže k tetraploidům, kteří jsou vyčleněni opět do samostatné skupiny, ke které se navíc klastruje i jeden triploidní jedinec (17/68/2, Obrázek 8).

Původ této polyploidní řady však není jasný a stále zůstává neobjasněn. Dosavadní studie, že triploidí patrně nevznikli křížením diploidů a tetraploidů. Rovněž

i tetraploidi pravděpodobně vznikli nezávisle na triploidech (Murín & Feráková 1988, Karpavičienė 2013). V úvahu tak připadá možnost autopolyploidního vzniku triploidních jedinců z diploidů, jako u druh *Allium monanthum* Maxim., který tvoří také cytotypy 2x, 3x a 4x (Noda & Kawano 1988), potažmo i tetraploidů (fúze neredukovaných diploidních gamet).

Vzhledem ke spíše nízké kvalitě získané DNA se v navazující diplomové práci zaměříme na úpravu protokolu izolace DNA za použití sorbitolu, aby získaná DNA byla co nejlepší. Dále z důvodu nízké variability testovaných markerů, jejichž sekvenaci dokončíme, se ale zaměříme i na jiné molekulární metody, které by dokázaly lépe definovat genetické rozdílnosti mezi cytotypy. S největší pravděpodobností to bude metoda AFLP. Základem této metody je selektivní PCR amplifikace restrikčních fragmentů rozštěpené DNA (Vos et al. 1995). Hlavní výhodou této metody je její multilokusový charakter a hodnotí se variabilita na úrovni „celého“ genomu (Flegr 2009, Fér et al. 2011). Metoda AFLP se využívá při detekci DNA polymorfismu, a to například v rámci studia populační genetiky, klonality, hybridizace a polyploidie či fylogeografie a fylogenezi (Weising et al. 2005, Fér et al. 2011).

7. ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše o druhu *Allium scorodoprasum*, polyploidii a jejím významu v souvislosti s evolucí rostlin. V druhé experimentální části jsem si osvojila základní laboratorní techniky, které se využívají v molekulární biologii. V první řadě se jednalo o izolaci DNA a stanovení a vizualizaci její kvality. Vhodnost vyizolované DNA by dále ověřena pomocí PCR reakce. Testován byl jeden jaderný (ITS) a dva chloroplastové (trnH-psbA a ndhJ-trnF) markery. Amplifikace testovaných úseků byla úspěšná u všech vzorků. Vzhledem k nízké variabilitě testovaných markerů není na výsledných fylogenetických stromech patrný téměř žádný patern. Za zmínku stojí pouze oddělení tetraploidních jedinců od diploidních a triploidních, kteří se shlukují dohromady.

8. LITERATURA

- Åström, H., & Hægström, C.-A. (2003). Chromosome numbers of *Allium scorodoprasum* and *A. vineale* from SW Finland and W Ukraine. *Annales Botanici Fennici*, 40 (1), 1–3.
- Avise, J., C. (1994). Molecular markers, natural history and evolution. *Springer*, New York, 511 p.
- Beaulieu, J. M., Leitch I. J., Patel, S., Pendharkar, A., & Knight, C. A. (2008). Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytologist*, 179 (4), 975–986.
- Bennett, M. D. (2004). Perspectives on polyploidy in plants—ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82 (4), 411–423.
- Bretagnolle, F., & Thompson, J. D. (2001). Phenotypic plasticity in sympatric diploid and autotetraploid *Dactylis glomerata*. *International Journal of Plant Sciences*, 162 (2), 309–316.
- Briggs, D., & Walters, S. M. (2001). *Proměnlivost a evoluce rostlin*. Univerzita Palackého, Olomouc, 532 p.
- Brochmann, C., Brysting, A. K., Alsos, I. G., Borgen, L., Grundt, H. H., Scheen, A. C., & Elven, R. (2004). Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82 (4), 521–536.
- Burns, R., Mandáková, T., Gunis, J., Soto-Jiménez, L. M., Liu, C., Lysak, M. A., Novikova P. Y., & Nordborg, M. (2021). Gradual evolution of allopolyploidy in *Arabidopsis suecica*. *Nature Ecology & Evolution*, 5 (10), 1367–1381.
- Castro, M., Loureiro, J., Figueiredo, A., Serrano, M., Husband, B. C., & Castro, S. (2020). Different patterns of ecological divergence between two tetraploids and their diploid counterpart in a parapatric linear coastal distribution polyploid complex. *Frontiers in Plant Science*, 11, 315.
- Celep, F., Koyuncu, M., Fritsch, R. M., Kahraman, A., & Doğan, M. (2012). Taxonomic importance of seed morphology in *Allium* (Amaryllidaceae). *Systematic Botany*, 37 (4), 893–912.

- De Sarker, D., Johnson, M. A. T., Reynolds, A., & Brandham, P. E. (1997). Cytology of the highly polyploid disjunct species, *Allium dregeanum* (Alliaceae), and of some Eurasian relatives. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 124 (4), 361–373.
- Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H., & Güngör, H. (2022). Phenolic profile and investigation of biological activities of *Allium scorodoprasum* L. subsp. *rotundum*. *Food Bioscience*, 46, 101548.
- Dolatyari, A., Saeidi Mehrvarz, S., Shahzadeh Fazeli, S. A., Naghavi, M. R., & Fritsch, R. M. (2018). Karyological studies of Iranian *Allium* L. (Amaryllidaceae) species with focus on sect. *Acanthoprason*. 1. Mitotic chromosomes. *Plant Systematics and Evolution*, 304, 583–606.
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2 (9), 2233–2244.
- Dorđevski, N., Uba, A. I., Zengin, G., Božunović, J., Gašić, U., Ristanović, E., Ćirić, A., Nikolić, B., & Stojković, D. (2022). Chemical and Biological Investigations of *Allium scorodoprasum* L. Flower Extracts. *Pharmaceuticals*, 16 (1), 21.
- Doyle J. J. & Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Doyle, J. J., & Egan, A. N. (2010). Dating the origins of polyploidy events. *New Phytologist*, 186(1), 73–85.
- Doyle, J. J., & Sherman-Broyles, S. (2017). Double trouble: taxonomy and definitions of polyploidy. *New Phytologist*, 213 (2), 487–493.
- Dufresne, F., Stift, M., Vergilino, R., & Mable, B. K. (2014). Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: an overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools. *Molecular Ecology*, 23 (1), 40–69.
- Duchoslav, M., Jandová, M., Koblrová, L., Šafařová, L., Brus, J., & Vojtěchová, K. (2020). Intricate distribution patterns of six cytotypes of *Allium oleraceum* at a continental scale: niche expansion and innovation followed by niche contraction with increasing ploidy level. *Frontiers in Plant Science*, 11, 591137.

- Duchoslav, M., & Krahulec, F. (2009). Rozšíření druhů rodu česnek (*Allium*) v České republice. IV. Druhy sekce *Allium* (*A. scorodoprasum*, *A. rotundum*). *Zprávy České Botanické Společnosti*, 44, 53–88.
- Duchoslav, M., Šafařová, L., & Krahulec, F. (2010). Complex distribution patterns, ecology and coexistence of ploidy levels of *Allium oleraceum* (Alliaceae) in the Czech Republic. *Annals of Botany*, 105 (5), 719–735.
- Fawcett, J. A., & Van de Peer, Y. (2010). Angiosperm polyploids and their road to evolutionary success. *Trends in Evolutionary Biology*, 2 (1), e3.
- Fér, T. (2011). Dominantní (binární) molekulární markery a jejich využití v populační a systematické biologii. *Zprávy České Botanické Společnosti, Praha, Materiály*, 25, 61–78.
- Fialová, M., & Duchoslav, M. (2014). Response to competition of bulbous geophyte *Allium oleraceum* differing in ploidy level. *Plant Biology*, 16 (1), 186–196.
- Fialová, M., Jandová, M., Ohryzek, J., & Duchoslav, M. (2014). Biology of the polyploid geophyte *Allium oleraceum* (Amaryllidaceae): variation in size, sexual and asexual reproduction and germination within and between tetra-, penta- and hexaploid cytotypes. *Flora*, 209 (7), 312–324.
- Flegr, J. (2009). *Evoluční biologie*. Academia, Praha, 569 p.
- Friesen, N., Fritsch, R. M., & Blattner, F. R. (2006). Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany*, 22 (1), 372–395.
- Fritsch, R. M., & Friesen, N. (2002). Evolution, domestication and taxonomy. In: Rabinowitch, H. D. & Currah, L. (eds), *Allium crop science: recent advances*, Wallingford UK: CABI publishing, 5–30 pp.
- Fu, D., Wei, L., Xiao, M., & Hayward, A. (2013). New insights into helitron transposable elements in the mesopolyploid species *Brassica rapa*. *Gene*, 532 (2), 236–245.
- Gohil, N., Panchasara, H., Patel, S., & Singh, V. (2019). Molecular biology techniques for the identification and genotyping of microorganisms. In: Tripathi, V., Kumar, P., Tripathi, P., & Kishore, A. (eds), *Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems*, Singapore: Springer Singapore, vol. 1, 203–226 pp.

- Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., & Smith, B. (2002). Onions a global benefit to health. *Phytotherapy Research*, 16 (7), 603–615.
- Hamston, T. J., De Vere, N., King, R. A., Pellicer, J., Fay, M. F., Cresswell, J. E., & Stevens, J. R. (2018). Apomixis and hybridization drives reticulate evolution and phyletic differentiation in *Sorbus* L.: Implications for conservation. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1796 p.
- Hanelt, P., Schultze-Motel, J., Fritsch, R., Kruse, J., Maass, H. I., Ohle, H., & Pistrick, K. (1992). Infrageneric grouping of *Allium* – the Gatersleben approach. In: The genus *Allium* – taxonomic problems and genetic resources. *Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research*, Gatersleben, Germany, 107–123 pp.
- Hirschegger, P., Jakše, J., Trontelj, P., & Bohanec, B. (2010). Origins of *Allium ampeloprasum* horticultural groups and a molecular phylogeny of the section *Allium* (*Allium*: Alliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54 (2), 488–497.
- Husband, B. C. (2004). The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82 (4), 537–546.
- Husband, B. C., Baldwin, S. J., & Suda, J. (2013). The incidence of polyploidy in natural plant populations: major patterns and evolutionary processes. In: *Plant Genome Diversity. Vol. 2. Springer*, Vienna, 255–276 pp.
- Husband, B. C., & Sabara, H. A. (2004). Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist*, 161 (3), 703–713.
- Chester, M., Leitch, A. R., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2010). Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). *Genes*, 1 (2), 166–192.
- 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., Soltis, D. E., Clifton, S. W., Schlarbaum, S. E., Schuster, S. C., Ma, H., Leebens-Mack, J., & dePamphilis, C. W. (2011). Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*, 473 (7345), 97–100.

- Joachimiak, A. & Grabowska-Joachimiak, A. (2000). Stomatal cell length and ploidy level in four taxa belonging to the *Phleum* sect. *Phleum*. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 42 (1), 103–107.
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In ‘Mammalian Protein Metabolism’. (Ed. HN Munro.). *Academic Press*, New York, 1, 504–511, 21–132 pp.
- Kao, R. H. (2008). Implications of polyploidy in the host plant of a dipteran seed parasite. *Western North American Naturalist*, 68 (2), 225–230.
- Karpavičienė, B. (2013). Geographical separation of diploid and triploid cytotypes of *Allium scorodoprasum* in Lithuania. *Biologia*, 68 (4), 606–612.
- Karpavičienė, B. (2017). Causes of variation in sexual and asexual reproduction in diploid and triploid populations of *Allium scorodoprasum*. *Plant Systematics and Evolution*, 303, 105–115.
- Kawano, S., Nagai, Y., & Hayashi, K. (2005). Life-history monographs of Japanese plants. 3: *Allium monanthum* Maxim. (Alliaceae). *Plant species biology*, 20 (2), 155–165.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, Ch., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28 (12), 1647–1649.
- Kihara, H., & Ono, T. (1926). Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der *Rumex*-Arten. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 4 (3), 475–481.
- King, R. C., Mulligan, P. & Stansfield, W. (2006). *A dictionary of genetics*. (7 ed.). Oxford University Press, Oxford, 596 p.
- Kobřlová, L., Duchoslav, M. & Hroneš, M. (2022). Morphological, ecological and geographic differences between diploids and tetraploids of *Symphytum officinale* (Boraginaceae) justify both cytotypes as separate species. *AoB PLANTS*, 14 (4), plac028.
- Köhler, C., Scheid, O. M., & Erilova, A. (2010). The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. *Trends in Genetics*, 26 (3), 142–148.

- Kojima, A., & Nagato, Y. (1997). Discovery of highly apomictic and highly amphimictic dihaploids in *Allium tuberosum*. *Sexual Plant Reproduction*, 10, 8–12.
- Kolář, F., Čertner, M., Suda, J., Schönswetter, P., & Husband, B. C. (2017). Mixed-ploidy species: progress and opportunities in polyploid research. *Trends in Plant Science*, 22 (12), 1041–1055.
- Kolíško, M. (2017). Moderní metody sekvenování DNA. *Živa*, 3, 73–76.
- Kothari, D., Lee, W. D., & Kim, S. K. (2020). *Allium* flavonols: Health benefits, molecular targets, and bioavailability. *Antioxidants*, 9 (9), 888.
- Kothari, D., Lee, W. D., Niu, K. M., & Kim, S. K. (2019). The genus *Allium* as poultry feed additive: A review. *Animals*, 9 (12), 1032.
- Koutecký, P., Tuleu, G., Baďurová, T., Košnar, J., Štech, M., & Těšitel, J. (2012). Distribution of cytotypes and seasonal variation in the *Odontites vernus* group in central Europe. *Preslia*, 84 (4), 887–904.
- Krahulec, F., & Duchoslav, M. (2010). Alliaceae J. Agardh–česnekovitě. In: Chrtek, J., Kaplan, Z., Štěpánková, J. (eds), *Květena České republiky* 8, Academia, Praha, 647–677 pp.
- Krak, K. (2011). Využití sekvencí DNA při studiu evoluce rostlin. *Zprávy České Botanické Společnosti, Praha, Materiály*, 25, 95–125.
- Krasileva, K. V., Vasquez-Gross, H. A., Howell, T., Bailey, P., Paraiso, F., Clissold, L., Simmonds, J., Ramirez-Gonzalez, R. H., Wang, X., Borrill, P., Fosker, Ch., Ayling, S., Phillips, A. L., Uauy, C., & Dubcovsky, J. (2017). Uncovering hidden variation in polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (6), 913–921.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27 (2–3), 95–125.
- Kurnia, D., Ajiati, D., Heliawati, L., & Sumiarsa, D. (2021). Antioxidant properties and structure-antioxidant activity relationship of *Allium* species leaves. *Molecules*, 26 (23), 7175.
- Kuzmanov, B. (1993). Chromosome numbers of Bulgarian angiosperms: An introduction to a chromosome atlas of the Bulgarian flora. *Flora Mediterranea*, 3, 19–163.

- Kúr, P., Štech, M., Koutecký, P., & Trávníček, P. (2012). Morphological and cytological variation in *Spergularia echinosperma* and *S. rubra*, and notes on potential hybridization of these two species. *Preslia*, 84 (4), 905–924.
- Labani, R. M., & Elkington, T. T. (1987). Nuclear DNA variation in the genus *Allium* L. (Liliaceae). *Heredity*, 59 (1), 119–128.
- Leitch, I. J., & Bennett, M. D. (1997). Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science*, 2 (12), 470–476.
- Levin, D. A. (1975). Minority cytotype exclusion in local plant populations. *Taxon*, 24 (1), 35–43.
- Levin, D. A. (1983). Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist*, 122 (1), 1–25.
- Levin, D. A. (2002). The role of chromosomal change in plant evolution. *Oxford University Press*, Oxford, 240 p.
- Levin, D. (2011). Polyploidy and ecological transfiguration in *Achillea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (17), 6697–6698.
- Levy, A. A., & Feldman, M. (2002). The impact of polyploidy on grass genome evolution. *Plant Physiology*, 130 (4), 1587–1593.
- Li, Q. Q., Zhou, S. D., He, X. J., Yu, Y., Zhang, Y. C., & Wei, X. Q. (2010). Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Allieae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast rps16 sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. *Annals of Botany*, 106 (5), 709–733.
- Májovský, J., Murín, A., Feráková, V., Hindáková, M., Schwarzová, T., Uhríková, A., Váchová, M. & Záborský, J. (1987). *Karyotaxonomický prehľad flóry Slovenska*. Veda, Bratislava, 436 p.
- Mandáková, T., Joly, S., Krzywinski, M., Mummenhoff, K., & Lysák, M. A. (2010). Fast diploidization in close mesopolyploid relatives of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22 (7), 2277–2290.
- Mandáková, T., & Lysák, M. A. (2018). Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes. *Current Opinion in Plant Biology*, 42, 55–65.

- Martínez-González, C. R., Ramírez-Mendoza, R., Jiménez-Ramírez, J., Gallegos-Vázquez, C., & Luna-Vega, I. (2017). Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (Cactaceae). *Plant Methods*, 13 (1), 1–10.
- Mathew, B. (1996). A review of *Allium* sect. *Allium*. *Royal Botanic Gardens, Kew*, 182 p.
- Meirmans, P. G., Calame, F. G., Bretagnolle, F., Felber, F., & Den Nijs, J. C. M. (1999). Anthropogenic disturbance and habitat differentiation between sexual diploid and apomictic triploid *Taraxacum* sect. *Ruderalia*. *Folia Geobotanica*, 34, 451–469.
- Měsíček, J., & Javůrková-Jarolímová, V. (1992). *List of chromosome numbers of the Czech vascular plants*. Academia, Praha, 144 p.
- Meusel, H., Jäger, E. J., & Weinert, E. (1965). *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 583 p.
- Mollica, A., Zengin, G., Locatelli, M., Picot-Allain, C. M. N., & Mahomoodally, M. F. (2018). Multidirectional investigations on different parts of *Allium scorodoprasum* L. subsp. *rotundum* (L.) Stearn: Phenolic components, in vitro biological, and in silico propensities. *Food Research International*, 108, 641–649.
- Murín, A., & Feráková, V. (1988). Karyological variability of the species *Allium scorodoprasum* L. *Acta Facultatis rerum naturalium Universitatis Comenianae, Botanica*, 36, 65–77.
- Nayar, N. M., Ahmedulla, M., & Singh, R. (1992). *Alliums* in South Asia: importance, ethnobotanical uses, genetic resources, enumeration of species and distribution. In: The genus *Allium* - taxonomic problems and genetic resources. *Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research*. Gatersleben, Germany, 205–213 pp.
- Noda, S., & Kawano, S. (1988). The biology of *Allium monanthum* (Liliaceae) I. Polyploid complex and variations in karyotype. *Plant Species Biology*, 3 (1), 13–26.
- Ohri, D., Fritsch, R. M., & Hanelt, P. (1998). Evolution of genome size in *Allium* (Alliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 210, 57–86.
- Osborn, T. C., Pires, J. C., Birchler, J. A., Auger, D. L., Chen, Z. J., Lee, H. S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R. W., Colot, V., & Martienssen, R. A. (2003). Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics*, 19 (3), 141–147.

- Otto, S. P., & Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics*, 34 (1), 401–437.
- Özhatay, N. (1990). The genus *Allium* in European Turkey and around Istanbul. *Annales Musei Goulandris*, 8, 115–128.
- Özhatay, N. (1993). Comparative morphological, karyological and chemical studies on *Allium scorodoprasum* complex in European Turkey. *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, 29 (1), 31–42.
- Özhatay, N. (2002). Diversity of bulbous monocots in Turkey with special reference. Chromosome numbers. *Pure and Applied Chemistry*, 74 (4), 547–555.
- Özhatay, N., & Koçyiğit, M. (2009). Pollen morphology of *Allium* species (Liliaceae) in European Turkey and around Istanbul. *Phytologia Balcanica*, 15 (2), 199–208.
- Parisod, C. (2012). Polyploids integrate genomic changes and ecological shifts. *New Phytologist*, 193 (2), 297–300.
- Parisod, C., Holderegger, R., & Brochmann, C. (2010). Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist*, 186 (1), 5–17.
- Perrier, X., Jenny, C., Bakry, F., Karamura, D., Kitavi, M., Dubois, C., Hervouet, C., Philippson, G., & De Langhe, E. (2019). East African diploid and triploid bananas: a genetic complex transported from South-East Asia. *Annals of Botany*, 123 (1), 19–36.
- Petit, C., Bretagnolle, F., & Felber, F. (1999). Evolutionary consequences of diploid–polyploid hybrid zones in wild species. *Trends in Ecology & Evolution*, 14 (8), 306–311.
- Petit, C., & Thompson, J. D. (1997). Variation in phenotypic response to light availability between diploid and tetraploid populations of the perennial grass *Arrhenatherum elatius* from open and woodland sites. *Journal of Ecology*, 657–667.
- Pignatti, S. (1982). *Flora d'Italia. Vol. 3*. Edagricole, Roma, 1287 p.
- Pratt, C., Einset, J., & Clausen, R. T. (1958). Embryology, breeding behavior and morphological characteristics of apomictic, triploid *Rubus idaeus* L. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 242–254.

- Raboin, L. M., Pauquet, J., Butterfield, M., D'Hont, A., & Glaszmann, J. C. (2008). Analysis of genome-wide linkage disequilibrium in the highly polyploid sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics*, 116, 701–714.
- Ramsey, J. (2007). Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). *Heredity*, 98 (3), 143–150.
- Ramsey, J., & Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29 (1), 467–501.
- Ramsey, J., & Schemske, D. W. (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33 (1), 589–639.
- 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 (2), 265–273.
- Salmeri, C., Brullo, C., Brullo, S., Galdo, G. G. D., & Moysiyenko, I. I. (2016). What is *Allium paniculatum*? Establishing taxonomic and molecular phylogenetic relationships within *A.* sect. *Codonoprasum*. *Journal of Systematics and Evolution*, 54 (2), 123–135.
- Sang, T., Crawford, D. J., & Stuessy, T. F. (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, 84 (8), 1120–1136.
- Servick, S., Visger, C. J., Gitzendanner, M. A., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2015). Population genetic variation, geographic structure, and multiple origins of autopolyploidy in *Galax urceolata*. *American Journal of Botany*, 102 (6), 973–982.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., & Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94 (3), 275–288.
- Shoemaker, J. S., & Fitch, W. M. (1989). Evidence from nuclear sequences that invariable sites should be considered when sequence divergence is calculated. *Molecular Biology and Evolution*, 6 (3), 270–289.
- Skalická, K. (2005). Polyploidie dokáže s rostlinnými genomy pořádně zatřást. *Živa*, 2, 4956.

- Soltis, D. E., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Bell, C. D., Paterson, A. H., Zheng, C., Sankoff, D., dePamphilis, C. W., Wall, K., & Soltis, P. S. (2009). Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany*, 96 (1), 336–348.
- Soltis, D. E., Visger, C. J., & Soltis, P. S. (2014). The polyploidy revolution then... and now: Stebbins revisited. *American Journal of Botany*, 101 (7), 1057–1078.
- Sonnleitner, M., Hülber, K., Flatscher, R., García, P. E., Winkler, M., Suda, J., Schönswetter, P., & Schneeweiss, G. M. (2016). Ecological differentiation of diploid and polyploid cytotypes of *Senecio carniolicus* sensu lato (Asteraceae) is stronger in areas of sympatry. *Annals of Botany*, 117 (2), 269–276.
- Stearn, W. T. (1978). European species of *Allium* and allied genera of Alliaceae: a synonymic enumeration. *Annales Musei Goulandris*, 4, 83–198.
- Stearn, W. T. (1980): *Allium* L. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M. & Webb D. A. *Flora Europaea. Volume 5. Alismataceae to Orchidaceae*. Cambridge University Press, Cambridge, 49–69 pp.
- Stojanovic, G. (2014). In vitro antioxidant activity of methanol extract of *Allium scorodoprasum*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(5), 1130–1136.
- Suda, J. (2009). Darwinova “odporná záhada” po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí krytosemenných rostlin. *Živa*, 5, 204–208.
- Štajner, D., Milić, N., Čanadanović-Brunet, J., Kapor, A., Štajner, M., & Popović, B. M. (2006). Exploring *Allium* species as a source of potential medicinal agents. *Phytotherapy Research*, 20 (7), 581–584.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17 (5), 1105–1109.
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9 (4), 678–687.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12), 2725–2729.
- Tasci, B., & Koca, I. (2015). Use of *Allium scorodoprasum* L. subsp. *rotundum* as food. *Acta Horticulturae* 1143, 153–158.
- Tate, J. A., & Simpson, B. B. (2003). Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany*, 28 (4), 723–737.
- Te Beest, M., Le Roux, J. J., Richardson, D. M., Brysting, A. K., Suda, J., Kubešová, M., & Pyšek, P. (2012). The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany*, 109 (1), 19–45.
- Traub, H. P. (1968). The subgenera, sections and sub-sections of *Allium* L. *Plant Life*, 24, 1–4, 147–163.
- Trávníček, P., Eliášová, A., & Suda, J. (2010). The distribution of cytotypes of *Vicia cracca* in Central Europe: the changes that have occurred over the last four decades. *Preslia*, 82, 149–163.
- Tzanoudakis, D. (1992). Karyotype variation and evolution in the Greek *Allium*. In: The genus *Allium* - taxonomic problems and genetic resources. *Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research*. Gatersleben, Germany, 305–320 pp.
- Van de Peer, Y., Ashman, T. L., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2021). Polyploidy: an evolutionary and ecological force in stressful times. *The Plant Cell*, 33 (1), 11–26.
- Van de Peer, Y., Mizrachi, E., & Marchal, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics*, 18 (7), 411–424.
- Van Loon, J. C. (1982). In IOPB chromosome number reports LXXVII. *Taxon*, 31, 763–764.
- Villesen, P. (2007). FaBox: An online fasta sequence toolbox. *Molecular Ecology Notes*, 7, 965–968.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21), 4407–4414.

- Warner, D. A., & Edwards, G. E. (1993). Effects of polyploidy on photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 35, 135–147.
- Wei, X., Zhou, Y., Abbas, F., Yan, F., Zou, X., Yu, Y., Gao, T., He, J., Wang, Q., Yu, R., & Fan, Y. (2023). Distant heteroploid hybridization improved *Hedychium* floral scent, floral color and morphological traits. *Industrial Crops and Products*, 194, 116357.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). DNA fingerprinting in plants: Principles, Methods, and Applications. *Taylor & Francis Group*, 444.
- Wendel, J. F., Jackson, S. A., Meyers, B. C., & Wing, R. A. (2016). Evolution of plant genome architecture. *Genome Biology*, 17, 1–14.
- Wheeler, E. (2011). *Phylogenetic and phylogenomic studies of wild onions (Allium, Amaryllidaceae) at three taxonomic scales*. Doctoral Thesis, *University of Missouri, Columbia*, 105 p.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, 18 (1), 315–322.
- 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*, 106 (33), 13875–13879.
- Zozomová-Lihová, J., Malánová-Krásná, I., Vít, P., Urfus, T., Senko, D., Svitok, M., Kempa, M., & Marhold, K. (2015). Cytotype distribution patterns, ecological differentiation, and genetic structure in a diploid–tetraploid contact zone of *Cardamine amara*. *American Journal of Botany*, 102 (8), 1380–1395.

9. PŘÍLOHY

Příloha 1: Seznam haplotypů pro studované chloroplastové lokusy. V případě, že haplotyp není uveden (tj. -), nebyla pro daný vzorek získána použitelná sekvence.

ID jedince	Země	trnh-psbA haplotyp	ndhJ-trnF haplotyp
Diploidní populace (2x)			
13/21/1	Slovinsko	HAP 1	-
13/21/2	Slovinsko	HAP 2	HAP 1
15/278/1	Ukrajina	-	HAP 1
15/278/2	Ukrajina	-	HAP 1
15/278/3	Ukrajina	-	HAP 2
16/61/1	Německo	HAP 2	HAP 1
16/61/2	Německo	HAP 1	HAP 1
16/61/3	Německo	HAP 1	-
16/61/4	Německo	HAP 1	HAP 1
16/61/5	Německo	HAP 1	HAP 1
16/122/1	Itálie	HAP 2	HAP 1
16/122/2	Itálie	HAP 1	HAP 1
16/122/3	Itálie	HAP 1	HAP 1
16/142/1	Rakousko	HAP 1	HAP 1
16/142/2	Rakousko	HAP 1	-
16/142/3	Rakousko	HAP 1	-
16/231/1	Polsko	HAP 1	-
16/231/2	Polsko	HAP 1	HAP 2
16/231/3	Polsko	HAP 1	HAP 2
16/286/1	Slovensko	HAP 2	-
16/286/2	Slovensko	HAP 1	HAP 2
16/296/1	Maďarsko	HAP 1	HAP 1
16/296/2	Maďarsko	HAP 1	HAP 2
16/296/3	Maďarsko	HAP 1	HAP 2
16/315/1	Rumunsko	-	HAP 1
16/366/1	Rakousko	-	-
16/436/1	Velká Británie	HAP 2	HAP 2
16/436/2	Velká Británie	HAP 1	-
16/436/3	Velká Británie	HAP 1	HAP 1
16/436/4	Velká Británie	HAP 1	HAP 2
16/438/1	Litva	HAP 1	HAP 1
16/438/2	Litva	HAP 1	HAP 1

Příloha 1: Pokračování.

ID jedince	Země	trnh-psbA haplotyp	ndhJ-trnF haplotyp
16/438/3	Litva	-	HAP 2
16/439/1	Litva	-	HAP 2
16/439/2	Litva	-	HAP 1
16/439/3	Litva	-	HAP 2
16/453/1	Finsko	HAP 1	HAP 2
16/453/2	Finsko	HAP 1	HAP 1
16/455/1	Finsko	HAP 1	-
16/455/2	Finsko	HAP 1	HAP 2
16/455/3	Finsko	HAP 2	HAP 2
17/60/1	Nizozemsko	HAP 1	HAP 2
17/60/2	Nizozemsko	HAP 1	HAP 1
17/105/1	Chorvatsko	HAP 1	HAP 1
17/105/2	Chorvatsko	-	-
17/105/3	Chorvatsko	HAP 2	HAP 2
17/187/1	Srbsko	HAP 3	HAP 3
17/187/2	Srbsko	HAP 3	HAP 3
17/187/3	Srbsko	-	HAP 3
Triploidní populace (3x)			
15/91/1	Česká republika	HAP 2	HAP 1
15/91/2	Česká republika	HAP 1	HAP 2
15/91/3	Česká republika	HAP 2	-
15/91/4	Česká republika	HAP 2	-
15/91/5	Česká republika	HAP 2	HAP 2
15/112/1	Slovensko	HAP 2	-
15/112/2	Slovensko	HAP 2	-
15/112/3	Slovensko	HAP 1	-
15/112/4	Slovensko	HAP 2	HAP 1
16/143/1	Rakousko	HAP 2	HAP 1
16/143/2	Rakousko	-	HAP 1
16/143/3	Rakousko	-	-
16/143/4	Rakousko	-	HAP 1
16/143/5	Rakousko	-	-
16/227/1	Polsko	-	-
16/227/2	Polsko	HAP 2	HAP 1
16/300/1	Maďarsko	HAP 1	HAP 1

Příloha 1: Pokračování.

ID jedince	Země	trnh-psbA haplotyp	ndhJ-trnF haplotyp
16/300/2	Maďarsko	-	-
16/300/3	Maďarsko	-	-
16/300/4	Maďarsko	HAP 2	HAP 1
16/440/1	Litva	-	HAP 1
16/440/2	Litva	HAP 1	HAP 1
16/440/3	Litva	HAP 1	-
16/440/5	Litva	HAP 1	HAP 1
16/464/1	Finsko	HAP 1	-
16/464/2	Finsko	HAP 2	HAP 1
16/464/3	Finsko	HAP 1	HAP 1
17/68/1	Německo	HAP 1	HAP 1
17/68/2	Německo	HAP 1	HAP 1
18/56/1	Německo	HAP 1	HAP 1
Tetraploidní populace (4x)			
17/62/1	Nizozemsko	HAP 4	-
17/62/2	Nizozemsko	HAP 4	HAP 4
17/63/1	Nizozemsko	-	HAP 5
17/63/2	Nizozemsko	-	HAP 5
18/102/1	Itálie	HAP 5	HAP 5
18/102/2	Itálie	HAP 4	HAP 5
18/102/3	Itálie	HAP 4	HAP 5
18/102/4	Itálie	-	-
18/107/1	Francie	-	HAP 4
18/107/2	Francie	-	HAP 4
18/107/3	Francie	-	HAP 4