

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2015**

**Kateřina Vojtěchová**

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie a ornitologická laboratoř



**Genotypová variabilita a příbuznost vybraných  
taxonů polyploidních komplexů *Allium* sekce  
*Codonoprasum***

Genotypic variability and relationship of species from the polyploid complexes *Allium*  
sec. *Codonoprasum*

**Bakalářská práce**

Kateřina Vojtěchová

Studijní program: Biologie, studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Forma studia: prezenční

Vedoucí práce: RNDr. Martin Duchoslav, Ph.D.

Olomouc 2015

Prohlašuji, že jsem zadanou bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury a konzultací.

V Olomouci dne:

.....  
podpis

**Poděkování:**

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Martinovi Duchoslavovi, Ph.D. za poskytnuté materiály, ochotu a cenné rady při psaní této práce. Mé poděkování patří rovněž Mgr. Michaele Jandové za odbornou pomoc, rady a věcné připomínky, ale i za čas, který mi v celém průběhu vypracovávání bakalářské práce věnovala. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i laboratoři molekulárních markerů za umožnění provedení praktické části bakalářské práce v jejich laboratoři. Velký dík patří i mé rodině a přátelům za poskytnutí nejlepšího zázemí, jaké si člověk může přát.

**Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Kateřina Vojtěchová

Název práce: Genotypová variabilita a příbuznost vybraných taxonů polyploidních komplexů *Allium* sekce *Codonoprasum*

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra zoologie a ornitologická laboratoř, Přírodovědecká fakulta UP, 17. listopadu 50, 771 46 Olomouc

Vedoucí práce: RNDr. Martin Duchoslav, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt: Sekce *Codonoprasum* představuje v rámci rodu *Allium* jednu z taxonomicky nejkomplikovanějších sekcí. Jedná se o skupinu geofytních rostlin, jež svým rozšířením zasahuje od Středozevního moře po Kavkaz a která díky své rozmanitosti ve stupních ploidie vykazuje značnou diverzitu v morfologii, ekologii, reprodukčních systémech, či v karyologii. Teoretická část této bakalářské práce popisuje rovněž vznik polyploidních jedinců v populaci, zmíněn je i vliv polyploidie na rozmnožování, životaschopnost či celý genom jedince. Podrobně zpracovaný je i popis studovaných druhů rodu *Allium* sekce *Codonoprasum* s nástinem taxonomických přístupů k tomuto rodu. Nechybí ani přehled základních molekulárních metod, kterých se ke studiu fylogeneze vyšších rostlin, a zvláště pak polyploidních komplexů, využívá. V praktické části je následně popsána použitá metoda izolace genomové DNA a metoda AFLP, jež byla pro prvotní posouzení genotypové variability vybraných druhů rodu *Allium* sekce *Codonoprasum* z různých geografických populací použita.

Klíčová slova: *Allium*, sekce *Codonoprasum*, morfologie, polyploidie, genomová duplikace, AFLP

Počet stran: 96

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Kateřina Vojtěchová

Title: Genotypic variability and relationship of species from the polyploid complexes  
*Allium* sec. *Codonoprasum*

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Zoology and Lab of Ornithology Faculty of Science,  
Palacky University, 17. listopadu 50, 771 46 Olomouc

Supervisor: RNDr. Martin Duchoslav, Ph.D.

The year of presentation: 2015

Abstract: The section *Codonoprasum* within the genus *Allium* represents, due to greatly morphological similarity of the species, high number of polyploids and polyploid complexes, one of the taxonomically most complicated sections. This is a group of geophytes, which are spread from the Mediterranean to the Caucasus. Diversity in ploidy levels demonstrates a considerable diversity in morphology, ecological tolerances, reproductive systems, and karyology. The theoretical part of this thesis describes different pathways of the polyploid formation, the effect of this process on reproduction, viability, and genome evolution of polyploids. There is also a detailed description of the studied species with an overview of approaches to the taxonomy of the genus *Allium*. The chapter number 3.6 is devoted to the basic molecular marker methods which are suitable for the phylogenetic studies of the higher plants, and especially of polyploids complexes. The practical part of this thesis consists of description of the genomic DNA isolation method and AFLP method. These methods were used for an initial assessment of genotypic variability of selected species of the genus *Allium* section *Codonoprasum* from different geographic populations.

Keywords: *Allium*, section *Codonoprasum*, morphology, polyploidy, genome duplication, AFLP

Number of pages: 96

Number of appendices: 0

Language: Czech

## **OBSAH**

<b>1 ÚVOD</b> .....	9
<b>2 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE</b> .....	12
<b>3 LITERÁRNÍ REŠERŠE</b> .....	13
3.1 Vznik polyploidních jedinců .....	13
3.2 Projevy polyploidie u rostlin.....	15
3.3 Rod <i>Allium</i> L. ....	18
3.3.1 Taxonomické zařazení rodu <i>Allium</i> L. ....	19
3.3.2 Popis rodu <i>Allium</i> L. ....	20
3.4 Rod <i>Allium</i> sect. <i>Codonoprasum</i> REINCHENB.....	22
3.4.1 Polyploidní komplex <i>Allium paniculatum</i> .....	23
3.5 Zástupci rodu <i>Allium</i> ze sekce <i>Codonoprasum</i> .....	24
3.5.1 Charakteristika druhu <i>Allium carinatum</i> L.....	24
3.5.2 Charakteristika druhu <i>Allium fuscum</i> Waldst. & Kit.....	26
3.5.3 Charakteristika druhu <i>Allium dentiferum</i> Webb & Bethel. ....	26
3.5.4 Charakteristika druhu <i>Allium flavum</i> L. ....	28
3.5.5 Charakteristika druhu <i>Allium podolicum</i> Blocki ex Racib. & Szafer.....	29
3.5.6 Charakteristika druhu <i>Allium pallens</i> L.....	29
3.5.7 Charakteristika druhu <i>Allium oleraceum</i> L. ....	30
3.5.8 Charakteristika druhu <i>Allium paniculatum</i> L. ....	32
3.5.9 Charakteristika druhu <i>Allium convallarioides</i> Grossh. ....	33
3.5.10 Charakteristika druhu <i>Allium rupestre</i> Steven .....	34
3.5.11 Charakteristika druhu <i>Allium kunthianum</i> Vved. ....	35
3.5.12 Charakteristika druhu <i>Allium rhodopeum</i> Velen.....	35
3.6 Molekulární metody .....	37
3.6.1 Metoda RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	40
3.6.2 Metoda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) .....	41

3.6.3 Amplified fragment length polymorphism (AFLP) .....	42
<b>4 METODIKA</b> .....	<b>46</b>
4.1 Rostlinný materiál .....	46
4.2 Izolace genomické DNA .....	53
4.3 Měření koncentrace DNA .....	54
4.4 Gelová elektroforéza .....	54
4.5 AFLP .....	55
4.5.1 Restrikce .....	55
4.5.2 Ligace .....	56
4.5.3 Preamplifikace .....	56
4.5.4 Amplifikace .....	57
4.5.5 Separace a detekce AFLP PCR produktů .....	58
4.6 Vyhodnocování dat .....	60
<b>5 VÝSLEDKY</b> .....	<b>61</b>
<b>6 DISKUZE</b> .....	<b>65</b>
<b>7 ZÁVĚR</b> .....	<b>69</b>
<b>LITERATURA</b> .....	<b>71</b>



## 1 ÚVOD

Polyploidie neboli genomová multiplikace (Whole-genom duplication- WGD), je stav, kdy se v somatických buňkách určitého organismu nacházejí více než dvě identické nebo téměř identické sady chromozomů, přičemž druhy se třemi sadami se nazývají triploidní ( $2n= 3x$ ), se čtyřmi tetraploidní ( $2n= 4x$ ) (Suda 2009) atd. Výsledkem je pak polyploidní jedinec (tj. polyploid), který může být reprodukčně izolovaný od svých diploidních předků a následně tak tvořit i nový druh (Levy & Feldman 2002). Polyploidní jedinci mohou vznikat v rámci druhu opakovaně a rychlost duplikace genomu je buď stejná, nebo i rychlejší než rychlost genetické mutace (Husband et al. 2008).

Poprvé bylo na polyploidii upozorněno roku 1907, přičemž byla označena za fenomén cévnatých rostlin, jehož výskyt nebyl považován za příliš častý. Mnohdy byla dokonce považována za evolučně slepou uličku (Van de Peer et al. 2009). V současné době je však zřejmé, že spousta organismů je buď přímo polyploidních, nebo mají polyploidního předka. U mnoha druhů došlo během evoluce k sekundární „diploidizaci“ genomů, čili k opětovnému nabytí diploidního charakteru (Wood et al. 2009, Van de Peer et al. 2009). Genomová duplikace představuje jak starobylý, tak neustále pokračující proces a zaujímá tak důležitou roli v evoluci genomu všech eukaryot (Ramsey 2011, Chen 2007, Crow & Wagner 2006). Nicméně polyploidie není známa jenom v rostlinné říši. Ačkoliv je většina živočišných druhů diploidních, tj. s dvěma sadami homologních chromosomů, existují stovky známých polyploidních druhů v rámci bezobratlých i obratlovců. Nejvíce se objevuje zejména u obojživelníků a ryb, jsou však známy i druhy polyploidních hlodavců. Příkladem mohou být druhy osmáka pouštního (*Tympanoctomys barrerae*) a osmáka slaništního (*Pipanaoctomys aureus*) žijící v Argentině (Gallardo et al. 1999). Genomová duplikace byla prokázána také u jednobuněčných organismů (Van de Peer et al. 2009) a dokonce i lidské tělo obsahuje tkáň tvořenou polyploidními buňkami (například v játrech) (Suda 2009).

U krytosemenných rostlin představuje genomová duplikace naopak jeden z klíčových evolučních mechanismů a je považována za jeden z převládajících typů sympatrické speciace (Otto & Whitton 2000). Důležitou roli hraje i v mechanismu adaptace a diverzifikace rostlin (Thompson & Merg 2008). Frekvence polyploidů v rámci rostlinné říše je však stále nejasná (Suda 2009). Kupříkladu Stebbins (1950 sec.

Soltis et al. 2004) odhaduje, že 30-35 % krytosemenných rostlin je polyploidních. Grant (1963 sec. Soltis et al. 2004) označuje za polyploidní 47 % všech kvetoucích rostlin, přičemž vychází z předpokladu, že rostliny s chromozomovým číslem  $n = 14$  a výše jsou polyploidního původu. Dále rovněž odhaduje, že 58 % z nich patří mezi jednoděložné a 43 % mezi dvouděložné. Masterson (1994), který vycházel při svých odhadech ze studia průduchů fosilních a recentních taxonů, udává, že procesem polyploidizace prošlo 57-70 % krytosemenných druhů rostlin. V souvislosti s teorií sekundární diploidizace se však v současné literatuře stále častěji objevují názory, že až kolem 47-100 % kvetoucích rostlin vzniklo, nebo si během evoluce prošlo polyploidní událostí (Wood et al. 2009). Nejčastěji je polyploidie v rámci rostlinné říše zaznamenávána u kaprad'orostů, kde se odhady pohybují kolem 95 %, přičemž zde mohou počty chromozomů dosahovat až téměř stonásobku základní chromozomové sady. Tak je tomu na příklad u tropické kapradiny hadilky *Ophioglossum reticulatum*, jež obsahuje 1440 somatických chromozomů, tj. 96násobek základní chromozomové sady (Stace 2000, Suda 2009). Naopak nejmenší počet polyploidů (cca 5 %) se ukazuje u nahosemenných (cykasy, jinany a jehličnany) (Khoshoo 1959, Suda 2009). Mezi mechorosty je přibližně 79 % mechů a 11 % jätrovek považováno za polyploidní. U hlevíků se pak genomová duplikace objevuje mnohem vzácněji, a to v méně než 2 % případů (Wyatt et al. 1988, Przywara & Kuta 1995). Pro řasy se vzhledem k dosud zjištěným vysokým chromozomovým číslům, zejména u skupiny *Ceramiales* (*Rhodophyta*) (Kapuraun 2005), předpokládá vysoká míra polyploidizace (Suda 2009). Frekvence polyploidie u těchto organismů ale není v současnosti kvůli malému množství dat zcela odhadnutelná (Kapuraun & Freshwater 2012).

Polyploidy můžeme rozdělovat podle časového měřítka na paleopolyploidy, mesopolyploidy a neopolyploidy. Paleopolyploidie studuje taxony, k jejichž polyploidizaci došlo v evoluční minulosti a jejichž polyploidní či diploidní předkové buď vyhynuli, nebo se od svých potomků změnili do té míry, že je dnes již nemůžeme identifikovat (Levy & Feldman 2002, Bennett 2004). Znamky paleopolyploidie mohou být v taxonech dodnes jasně znatelné. Známým příkladem paleopolyploida v rostlinné říši je druh *Arabidopsis thaliana* (Jiao et al. 2011). Ty taxony, jež se jasně liší od svých existujících diploidních nebo polyploidních předků, ale přesto jsou s nimi stále blíže příbuzné tak, že by mohly být dokonce umístěny ve stejném rodě či ve stejné skupině, se nazývají mesopolyploidní (Mandáková et al. 2010, Bennett 2004). Neopolyploidie je

pak označením pro mladé taxony, které jsou velmi podobné svým blízkce příbuzným diploidním, či polyploidním předkům. Jejich předky je tedy možné identifikovat (Bennett 2004).

Podle vzniku odlišili roku 1926 Kihara & Ono dva základními typy polyploidie, autopolyploidii a allopolyploidii (Leitch & Bennett 1997, Briggs & Walters 2001). Autopolyploidie je označení pro polyploidní druhy, které vznikly křížením v rámci jedné populace nebo mezi více populacemi jednoho druhu, a to zdvojnásobením strukturálně podobných, tzv. homologních, genomů (AAAA) (Ramsey & Schemske 1998, Parisod et al. 2010). V průběhu metafáze meiózy zde pak může docházet k tvorbě multivalentů (Levy & Feldman 2002). Naopak allopolyploidie je označení pro polyploidní jedince vzniklé mezidruhovou hybridizací a následným zdvojením nehomologních (tzv. homeologních) genomů (AABB) (Ramsey & Schemske 1998, Parisod et al. 2010). V průběhu metafáze meiózy se tedy tvoří bivalenty, neboť se nehomologní chromozómy nepárují, ale jsou udržovány jako samostatné chromozomové sady (Henry 2005, Levy & Feldman 2002). Autopolyploidní jedinci mají polysomickou dědičnost, tj. mohou mít vlivem nevyváženého počtu chromozomů sníženou plodnost. U allopolyploidů jsou naopak v buňce chromozomy přítomny vždy v páru, vykazují tedy disomickou dědičnost (Osborn et al. 2003, King et al. 2006). Toto rozdělení polyploidních jedinců však není absolutní. Mezi auto- a allopolyploidii existuje i mnoho mezičlánků, jako je například segmentální allopolyploidie. Segmentální allopolyploidie obsahují jak homologní, tak i nehomologní chromozomální segmenty a během meiózy tedy vytváří bivalenty i multivalenty, čímž vykazují jak smíšenou disomickou, tak i polysomickou dědičnost (Levy & Feldman 2002, Comai 2005).

## 2 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Sekce *Codonoprasum* je v rámci rodu *Allium* zřejmě jednou z taxonomicky nejkomplicovanějších sekcí. Pro bližší poznání fylogenetické příbuznosti mezi jednotlivými polyploidními komplexy těchto geofytů jsou tudíž nezbytné podrobnější molekulární a cytogenetické studie jednotlivých druhů. Proto jsem se v rámci teoretické části této bakalářské práce zaměřila na:

- Vypracování literární rešerše o rodu *Allium* s přehledem dřívějších i současných taxonomických přístupů k tomuto rodu. Podrobné zpracování studované sekce *Codonoprasum* včetně jednotlivých studovaných druhů.
- Zpracování literárních zdrojů týkajících se polyploidie u rostlin a jejím vlivu na evoluci rostlin.
- Poukázat na význam molekulárních DNA markerů, využívajících přirozeného polymorfismu DNA ke studiu rostlinné diverzity se zaměřením na polyploidní komplexy. Uvedení několika základních molekulárních metod využívaných v systematice a fylogenetických studiích vyšších rostlin.

Cíle experimentální části:

- Naučit se základní techniky používané v molekulární biologii (izolace DNA, PCR, AFLP).
- Získání dostatečného množství kvalitní DNA pro provedení metody AFLP. Zvládnutí techniky AFLP a jejího manuálního vyhodnocení.
- Prvotní posouzení genotypové - interspecifické a intraspecifické variability na vybraných vzorcích druhů rodu *Allium* sekce *Codonoprasum* pocházejících z různých geografických populací.

## 3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

### 3.1 Vznik polyploidních jedinců

Pro vznik polyploida je obecně zapotřebí genomová mutace, jež zapříčiní vznik polyploidního jedince, a následné přežívání tohoto jedince v populaci. Na vzniku polyploidního jedince se mohou podílet tři mutační procesy (Gerstein & Otto 2009). Prvním z nich jsou chyby v průběhu meiózy, kdy nedokonalost v chromozomové segregaci může vést k vytvoření „neredukovaných“ neboli  $2n$  gamet se somatickým uspořádáním chromozomů (Henry 2005). Produkce těchto gamet je zpravidla dědičná (Parisod et al. 2010, Levy & Feldman 2002), ale Bretagnolle & Thompson (1995) uvádí, že důležitou roli hrají též podmínky vnějšího prostředí, jakými jsou například expozice chladna, horka, UV záření, či stres (Ramsey & Schemske 1998). Jako příklad pak uvádí *Solanum tuberosum*, u něhož byla zjištěna signifikantně zvýšená produkce  $2n$  pylových zrn při pěstování na chladných pobřežních stanovištích (Bretagnolle & Thompson 1995). Druhým mechanismem je somatické zdvojení neboli vznik buňky s dvojnásobným počtem chromozomů způsobený chybou v mitóze. Třetím je pak polyspermie, kdy dochází k oplodnění vaječné buňky více než jedním jádrem spermatické buňky (Gerstein & Otto 2009). Pro vznik polyploidního jedince je však zapotřebí, aby daný jedinec v populaci přežil. To je podmíněno překonáním reprodukční bariéry, která se vyskytuje hlavně v prvních generacích po duplikaci (Leitch & Bennett 1997).

Vznik autopolyploidních jedinců je spojen se splynutím dvou neredukovaných gamet, a to buď tzv. bilaterální polyploidizací, kdy dojde ke splynutí dvou „neredukovaných“ neboli  $2n$  gamet, nebo unilaterální polyploidizací, při níž fúzí normální (redukované, tj.  $1n$ ) a neredukované ( $2n$ ) gamety vzniká triploidní potomstvo (Bretagnolle & Thompson 1995). Vzniklí triploidi mají však často z důvodu nevyváženého počtu chromozomů sníženou životnost a také vyšší míru neplodnosti (Ramsey & Schemske 1998). Jestliže si ale zachovají určitou míru fertility, kdy jsou schopni produkovat euploidní ( $n$ ,  $2n$  nebo  $3n$ ) gamety, mohou následně zpětným křížením s diploidními nebo s jinými triploidními jedinci vytvářet tetraploidní potomstvo. Tento proces, při němž dochází k přechodu z diploidie na tetraploidii, se nazývá „triploidní most“ (Husband 2004, Otto & Whitton 2000).

V případě allopolyploidie dochází v průběhu speciace k jeho postupnému oddělení od rodičovských druhů jak geneticky, tak i stavbou svých chromozomů (tj. chromozomové přestavby). Příkladem může být hybridizace mezi druhy s rozdílnými genomy AA a BB. Pokud jsou jednotlivé genomy (A a B) natolik odlišné, že se jejich chromosomy během meiózy nejsou schopny správně spárovat, vznikne zkřížením těchto dvou druhů zcela neplodný jedinec. Tato hybridní rostlina AB však může vytvořit i velmi malé procento neredukovaného (tj. AB) pylu a vaječných buněk, které mohou splývat. Výsledkem je rostlina s chromozomovou sádkou AABB, tedy jedinec s dvojnásobkem normální chromozomové sady, tzv. amfiploid (Briggs a Walters 2001), který je již plně fertilní (Levy & Feldman 2002). Briggs & Walters (2001) uvádí, že u allopolyploidů je, díky genomickému párování kdy se páruje A s A a B s B, průběh meiózy mnohem pravidelnější. Pokud je mezi genomy A a B zachován vysoký stupeň homologie, neboli mají-li blízkého společného předka, mohou se při párování dokonce vytvořit i skupiny složené ze tří a čtyř chromozomů, tzv. multivalenty (Briggs & Walters 2001).

Polyplodie nicméně zahrnuje rovněž změny genové exprese, přičemž větší změny vyvolává allopolyploidie než autopolyploidie. To naznačuje, že hybridizace má zřejmě větší vliv na expresi genů a fenotypové odlišení než genomová duplikace (Chen 2007). U allopolyploidů jsou všechny geny duplicitní, takže existuje celá řada možností další evoluce těchto duplikovaných genů. Buď mohou být obě kopie genů funkčně zachovány, nebo si svou původní funkci může zachovat pouze jedna kopie, zatímco funkce druhé kopie může být eliminována, nebo pomocí epigenetických mechanismů, tj. mechanismů, které nezahrnují změny genotypu (například methylace DNA), umlčena (Adams & Wendel 2005, Tate et al. 2006). Kromě eliminace genomové sekvence, která byla pozorována například u rodů *Triticum* (Feldman et al. 1997) a *Tragopogon* (Tate et al. 2006), může docházet i k chromozomálním přestavbám (Chen & Pikaard 1997). Ke změnám genové exprese dochází ihned po interspecifické hybridizaci či allopolyploidizaci (Chen 2007).

Všechny tyto změny se projevují snadno pozorovatelnými odlišnostmi ve fenotypu, jako je změna velikosti orgánů či doby kvetení (Adams & Wendel 2005). Může však dojít i k neofunkcionalizaci, kdy jedna kopie získá zcela novou funkci, či k subfunkcionalizaci, při níž oba dceřiné geny přijímají část funkce rodičovského genu. Pro plnou funkci genu musí být tedy zachovány obě kopie (Tate et al. 2006, Gerstein &

Otto 2009). Vznik nových polyploidů může tedy sama o sobě představovat zrychlující evoluční faktor (Feldman et al. 1997).

### 3.2 Projevy polyploidie u rostlin

Jak už bylo řečeno, genomová duplikace je následována velkým množstvím genomických přestaveb, jako jsou například umlčování, ztráty či eliminace genů. Vzhledem k masivnímu rozšíření polyploidů v přírodě je však zřejmé, že se jedná o změny, které své nositele mohou dlouhodobě či krátkodobě zvýhodňovat oproti diploidním předkům (Soltis & Soltis 2000). Důvodem může být vyšší míra heterozygotnosti a větší množství genů a alel, které mohou vytvořit mnohem více kombinací, než je tomu u diploidů (Hegarty & Hiscock 2007). Právě fixace heterozygotnosti, neboli takzvaná heteróze, je jednou z evolučních výhod polyploidů, neboť zvyšuje jejich fitness, vitalitu i produktivitu, a to hlavně u F1 generace (Comai 2005, Birchler et al. 2003). Zvláště patrná je zvýšená heterozygotnost u allopolyploidů, ale i u autopolyploidů je heterózní efekt silnější než u diploidních jedinců (Soltis & Soltis 2000, Comai 2005). Naopak míra inbrední deprese, jež roste se zvyšující se produkcí homozygotních jedinců a výrazně snižuje fitness a životnost jedince, je u polyploidů zřejmě nižší než u jejich diploidních předků (Lande & Schemske 1985). Vztah mezi stupněm ploidie a inbrední depresí ale zatím ukazuje na závislost s mnoha dalšími faktory, jako je počet a letalita škodlivých alel, stupeň dominance mezi alelami nebo stáří polyploida (Ronfort 1999, Pannell et al. 2004).

Genová duplikace má výrazný vliv rovněž na evoluci rozmnožovacích systémů. Vztah mezi polyploidí a samosprášením u rostlin byl středem zájmu po mnoho let, přičemž se předpokládalo, že s rostoucím stupněm polyploidie roste u jedinců schopnost samosprášení (Mable 2004). To potvrzují ve svých studiích Guggisberg et al. (2006) nebo Barringer (2007), který na tento vztah ve své studii testoval celkem 235 druhů rostlin. I přes zřejmou důležitost, nejsou však dodnes důvody této závislosti polyploidie a samosprášení zcela zjevné. Možným vysvětlením by mohlo být, že polyploidní jedinci mají, na rozdíl od svých diploidních příbuzných, sníženou autokompatibilitu, která eliminuje schopnost samosprášení (Barringer 2007). Mable (2004) však ve své studii žádnou spojitost mezi stupněm ploidie a autokompatibilitou nezjistil. Dalším z možných důvodů vyšší míry samosprášení, která je častá u neopolyploidů, může souviset s faktorem tzv. minoritní cytotypové nevýhody, kdy se nově vzniklí polyploidi mohou

vyskytovat na stanovištích společně se svými diploidními předky. Protože křížení polyploidů s diploidy často přináší potomky se sníženou fitness (triploidy), mohla by schopnost samosprašení eliminovat potřebu polyploidů najít cytoplazmaticky kompatibilního partnera a tím úspěšně vyprodukovat více potomků (Ramsey & Schemske 1998, Barringer 2007). K přežití triploidních jedinců přispívá i schopnost vegetativního rozmnožování, které je u polyploidních jedinců rovněž častější než u diploidů (Ramsey & Schemske 1998). Právě schopnost vegetativního rozmnožování (například pomocí dceřiných cibulí, pacibulek, oddenků či šlahounů), které umožňuje polyploidním jedincům rozmnožovat se i bez přítomnosti partnera vhodného cytotypu, spolu s vytrvávajícím způsobem života, který je u polyploidů také velmi častý, polyploidního jedince oproti jeho diploidnímu předku zvýhodňuje. Umožňuje mu totiž přežít v nepříznivých či měnících se vnějších podmínkách prostředí úspěšným rozšířením se do nových nik, aniž by musel čelit kompetici ze strany svých generativně se rozmnožujících diploidních předků (Fawcett & Van de Peer 2010). Vytrvávající způsob života pak tomuto jedinci může umožnit přetrvat po dostatečnou dobu k nalezení partnera s vhodným cytotypem (Otto 2007).

Obecně změna ploidie vyvolává u jedince prokazatelné morfologické a fyziologické změny. Mezi nejznámější projevy polyploidie patří tzv. „gigas efekt“, kdy je zdvojení počtu chromozomů příčinou zvětšení buněk rostliny a tím i její celkové velikosti (Levin 1983). Příkladem může být i korelace mezi stupněm ploidie a velikostí průduchů (Joachimiak & Grabowska-Joachimiak 2000, Hodgson et al. 2010). Na rozdíl od velikosti však množství průduchů na plochu listu se zvyšujícím se stupněm ploidie klesá (Li et al. 1996). To může mít vliv na hospodaření s vodou a oxidem uhličitým. Malé průduchy totiž umožňují rychlou reakci na vodní stres v suchém prostředí, zatímco jejich vysoká hustota poskytuje rostlině maximální difúzi oxidu uhličitého (Beaulieu et al. 2008). Rostliny s genomovou duplikací však na vodní stres či vysoké teploty většinou reagovat nemusí, neboť jak uvádí ve své studii Knight & Ackerly (2002), polyploidní genomy jsou méně časté v suchých prostředích s vysokými teplotami.

Polyploidní rostliny se od diploidních liší i svou květní morfologií. Květy polyploidů jsou často prokazatelně větší, než je tomu u diploidů. Obecně jsou delší, mírně širší a liší se od diploidních jedinců i svou barvou (Segraves & Thompson 1999). Také květní perioda se může u polyploidních druhů lišit, přičemž se obecně udává, že polyploidní druhy kvetou později než druhy diploidní (Levin 1983, Kim et al. 2012). Při



studiu korelace mezi genomem a velikostí semen, bylo prokázáno, že velikost genomu má určitý vliv na hmotnost semen u krytosemenných rostlin, přičemž druhy s velkým genomem mají zřídka kdy malá semena (Beaulieu et al. 2007). Nicméně, všechny tyto rozdíly mezi polyploidními a diploidními druhy, které přispívají k jejich diferenciaci, jsou velkou měrou ovlivněny rovněž geografii či vnějšími podmínkami, v nichž se daný polyploidní druh nachází.

Genomová duplikace může mít vliv i na interakce mezi rostlinami a živočichy (Kao 2008). Například změny v květní morfologii a fenologii u polyploidů mohou souviset s diferenciací opylovačů na diploidní, respektive polyploidní rostliny. Interakce opylovačů s druhy různé ploidie může pak přispívat k izolaci polyploidních krytosemenných rostlin při koexistenci na jedné lokalitě s jejich diploidními předky (Segraves & Thompson 1999, Thompson & Merg 2008). Spousta studií byla věnována i možné souvislosti mezi polyploidii u rostlin a jejich napadení herbivorem. Ukázalo se však, že zatímco některé druhy fytofágního hmyzu upřednostňují tetraploidní rostliny před diploidními (Thompson et al. 1997), jiní preferují diploidní rostliny před tetraploidními (Lou & Baldwin 2003). Existují ale i druhy fytofágního hmyzu napadající obě ploidie. Z toho vyplývá, že polyploidie zřejmě nemá na herbivory jednotný efekt (Nuismer & Thompson 2001).

Polyploidní rostliny často rovněž osídlují, pro své diploidní předky, nepříznivá a nestabilní prostředí, kde obsazují nové niky (Petit & Thompson 1997, Bretagnolle & Thompson 2001, Fawcett & Van de Peer 2010). Příkladem může být druh *Spartina pectinata*, jejíž tetraploidní jedinci obsazují méně narušené biotopy v blízkosti břehů potoka, zatímco hexaploidní jedinci kolonizují často ty nejvíce disturbované biotopy (Kim et al. 2012). Obecně se však předpokládá, že k diferenciaci stanoviště přispívá zejména variabilita polyploidů v morfologii, demografii a fenotypu (Soltis et al. 2004). Prokazatelně větší množství polyploidů je pozorováno i ve vyšších zeměpisných šířkách a nadmořských výškách (Hijmans et al. 2007, Pausas & Sáez 2000) nebo v arktických oblastech (Grundt et al. 2006). Podle Soltis (2005) je důvodem vyšší míra heterozygotnosti (genetické rozmanitosti) polyploidních jedinců, která jim umožňuje různě reagovat na různé selekční tlaky. Rostliny se zdvojeným genomem mají tudíž větší šanci na přežití v rychle se měnících ekologických podmínkách prostředí (Crow & Wagner 2006). Fawcett et al. (2009) dokonce datuje vznik polyploidie do období před zhruba 65 miliony lety, do období na rozhraní křída a terciéru, kdy na Zemi docházelo

vlivem rozsáhlých změn klimatu k velké extinkci druhů a polyploidizace tak mohla být pro rostliny klíčovým faktorem umožňující přežití.

### 3.3 Rod *Allium* L.

Rod *Allium* patří s cca 850 popsanými druhy mezi největší rody jak v čeledi *Alliaceae*, tak také v rámci celé třídy *Monocotyledonae* (Elez 1999, Mashayekhi & Columbus 2014). Svým rozsáhlým rozšířením, zejména v holoarktické oblasti, a svou rozmanitostí v morfologických, anatomických, karyologických, biochemických a ekologických vlastnostech slouží jako vhodný materiál pro studium taxonomických vztahů (Hanelt et al. 1992). Mimo jiné obsahuje rod *Allium* mnoho ekonomicky důležitých plodin. Příkladem může být druh *Allium cepa*, *Allium sativum* či *Allium schoenoprasum*, které se velmi často používají pro svou typicky výraznou vůni a chuť způsobenou produkcí cystein sulfoxidu jako zelenina nebo koření (Nguyen 2008, Štajner et al. 2008). Bezpočet druhů a kultivarů (například *Allium giganteum*, *Allium moly*, *Allium nigrum*) nachází uplatnění také jako okrasné rostliny (Krzymińska et al. 2008).

Rod *Allium* je přirozeně rozšířen pouze na Severní polokouli (s výjimkou jednoho druhu, *A. dregeanum*, vyskytujícího se v jižní Africe) a to hlavně v oblastech, která jsou sezónně suchá (Fritsch & Friesen 2002, Krahulec & Duchoslav 2010). Nejprůhodnějším klimatem je tzv. mediteránní klima, které je charakteristické teplými, suchými léty a chladným, vlhkým obdobím zimy (Fritsch & Friesen 2002, Wheeler 2011). Během evoluce však došlo k ekologické diverzifikaci, kdy se rostliny dokázaly adaptovat i na mnoho dalších ekologických nik. Příkladem mohou být různé typy lesů, či štěrková místa podél říčních toků. Jeden nebo dva druhy jsou dokonce nalézány i v oblasti subarktického pásu a několik druhů také roste v horách či vrchovinách v subtropických a tropických oblastech (Fritsch & Friesen 2002). Častý výskyt polyploidie byl pak pravděpodobně jedním z faktorů, které se podílely na charakteru současného rozšíření zástupců rodu *Allium*, neboť polyploidní rostliny mívají širší ekologickou toleranci než jejich diploidní předkové (Soltis & Soltis 2000), mimo jiné jsou i rychlejšími a účinnějšími kolonizátory nových území (Trewick et al. 2002, Wu et al. 2010). Mezi primární vývojová centra diverzity tohoto rodu patří horské oblasti jihozápadní až centrální Asie. Sekundárními a také menšími centry diverzity jsou pak oblasti na západě Severní Ameriky (Texas, Kalifornie) (Friesen et al. 2006, Nguyen et al. 2008).

### 3.3.1 Taxonomické zařazení rodu *Allium* L.

Taxonomické postavení rodu *Allium* a jeho blízkce příbuzných rodů je již dlouhou dobu předmětem sporů. Dříve byla tato skupina řazena do čeledi *Liliaceae* sensu lato (Melchior 1964 sec. Fritsch & Friesen 2002). Avšak zatímco někteří autoři (Cronquist 1981 sec. Chase et al. 2009) zahrnovali do této skupiny všechny její zástupce, jiní (Dahlgren et al. 1985 sec. Chase et al. 2009) tento taxon rozdělovali do množství řádů, které byly často složeny z velkého počtu malých, snad monofyletických čeledí. Toto velké množství čeledí však bylo založeno spíše na vybraných morfologických podobnostech a rozdílech, které často nevypovídaly nic o fylogenetických vztazích mezi jednotlivými taxony. Je tedy zřejmé, že čeleď *Liliaceae* představovala heterogenní skupinu, která v žádném případě nebyla monofyletická. (Chase et al. 2009).

Postupem času zahrnula tvorba klasifikačních systémů deskriptivní a srovnávací studie rostlinné anatomie, morfologie, palynologie, cytologie, mikromolekul (flavonoidů a terpenoidů) i makromolekul (proteinů). Srovnávací studia použil například Takhtajan (1997), kdy zařadil *Alliaceae* do řádu *Amaryllidales* blízko k *Hyacinthaceae* a *Amaryllidaceae*. Pohled na rostlinnou systematiku se následně změnil poté, co se začaly využívat molekulární metody typu RAPD, RFLP, AFLP. Rovněž rozvoj automatického sekvencování DNA umožnil porovnat velké množství dat jednotlivých taxonů zároveň a tím i objektivněji odvodit fylogenezi jednotlivých taxonů (Ricroch et al. 2005, Wheeler 2011). Moderní klasifikační systémy tedy vychází alespoň částečně z molekulárních fylogenetických analýz (Wheeler 2011). S přihlédnutím k molekulárním datům byl vytvořen i systém APG (*The Angiosperm Phylogeny Group*) (1998), kdy bylo uznáváno 29 malých čeledí řádu *Asparagales* (mnohé obsahovaly pouze 1-5 rodů). Protože však byly jednotlivé čeledě velmi úzce definované, byla tato taxonomie srozumitelná jen úzkému okruhu specialistů. To byl také důvod, proč bylo ve vydání APG II (2003) následně navrženo rozdělit řád *Asparagales* do dvou čeledí, *Asparagaceae* a *Alliaceae*, jež je blízkce příbuzná čeledi *Amaryllidaceae*. Obě čeledi byly rovněž na základě květenství snadno rozlišitelné, neboť okolíčnaté květenství je typické pro *Alliaceae*, narozdíl od hroznovitého květenství *Asparagaceae* (APG II 2003, Fritsch & Friesen 2002). V současné době Chase et al. (2009) zahrnuje rod *Allium*, spolu se čtrnácti dalšími rody, do čeledi *Amaryllidaceae*, podčeledi *Allioideae*. V tribu *Allieae* představuje rod *Allium* (zahrnuje také *Caloscordum* Herb., *Milula* Prain a *Nectaroscordum* Lindl.) jediný rod (Chase et

al. 2009). I přesto se však můžeme v literatuře setkat i s jinými klasifikacemi v závislosti na tom, kterou klasifikaci daný autor preferuje (Fritsch & Friesen 2002).

Taxonomie rodu *Allium* je komplikovaná i kvůli tomu, že obsahuje velké množství synonymických názvů a vnitrorodových skupin. Historie vnitrorodové klasifikace spadá až do doby Linnéovi (1753), kdy bylo rozlišováno 30 druhů ve třech aliancích. S dalšími autory se zvyšovaly počty skupin, například Regel (1887 sec. Ricroch et al. 2005) rozlišoval 6 sekcí a 285 druhů, Kamelin (1973 sec. Li et al. 2010) rozeznával šest podrodů a 44 sekcí a podsekcí, Hanelt et al. (1992) uspořádal 600-700 druhů do šesti podrodů a 50 sekcí na základě morfologických, anatomických, karyologických znaků a četných pozorování životního cyklu, rozšíření i ekologie.

V současné době je podle fylogenetických studií známo 15 monofyletických podrodů a 72 sekcí rodu *Allium* (Friesen et al. 2006, Li et al. 2010, Wheeler 2011, Rola 2014). Morfologické studie i molekulárně-fylogenetické analýzy podporují rozdělení rodu *Allium* do tří evolučních linií (Fritsch & Friesen 2002, Friesen et al. 2006). První evoluční linie zahrnuje tři podrody: *Amerallium*, *Nectaroscordum* a *Microscordum*. Druhá linie obsahuje podrody: *Melanocrommyum*, *Caloscordum* a *Anguinum*. Poslední, třetí, linie pak zahrnuje celkem sedm podrodů, a to *Rhizirideum*, *Buromissa*, *Cepa*, *Allium*, *Reticulobulbosa*, *Cyathophora* a *Polyprason* (Fritsch & Friesen 2002, Wheeler 2011). Každý podrod se následně na základě morfologie, schopnosti křížení a karyotypu rozděluje na jednotlivé sekce (Havey 1991).

### **3.3.2 Popis rodu *Allium* L.**

Rod *Allium* zahrnuje vytrvalé, geofytní byliny, které jsou na různá stanoviště specificky adaptovány svými zásobními orgány – cibulemi nebo oddenky. Cibule obvykle přisedají na krátký oddenek, nebo jsou samostatné s oddenkem redukováným jen na podpučí, přičemž se vyskytují buď jednotlivě, nahloučeně, nebo jsou složené z jedné až několika zdužnatělých bází listů, které se často kryjí. Zřídka jsou tvořeny zdužnatělými kolaterálními pupeny, tzv. stroužky (Krahulec & Duchoslav 2010, Friesen et al. 2006). Jednotlivé rostliny mnohdy tvoří dceřiné cibule (Kawano et al. 2005). Listy jsou většinou čárkovité, ploché, bezřapíkaté, přízemní, mnohdy zakrývající květní stvol. Pochvy listů často vytvářejí zdánlivou lodyhu. Stvoly jsou trvalé, přímé až šikmo vzhůru směřující, oblé až hranaté, plné nebo duté (Fritsch & Friesen 2002, Krahulec & Duchoslav 2010, Elez 1999).

Květenství tvoří vrcholový dostředivě kvetoucí lichookolík, který je zprvu zcela uzavřen v listenovém toulci (Elez 1999, Krahulec & Duchoslav 2010, Stearn et al. 1980). Velmi často se tvoří pacibulky (Wheeler 2011). Květy mají celkem 6 okvětních lístků, které vytrvávají a jsou buď volné, či na bázi krátce srostlé. Tyčinky jsou v počtu 6 volné, či na bázi krátce rourkovitě srostlé a někdy přirostlé k bázi okvěti (Krahulec & Duchoslav 2010). Prašníky jsou různě (nejčastěji žlutě) zbarvené stejně jako pylová zrna, která jsou zpravidla monosulkátní (Elez 1999, Özhatay & Kocyigit 2009). Čnělka je gynobazická. Rostliny jsou entomogamní nebo alogamní. Plodem jsou tobolky, pukající švy, se 3 pouzdry, přičemž mají v každém pouzdru 1-2 semena (zřídka více). Semena jsou obvykle černá, 3hranná nebo zploštělá, vzácně mohou být kulovitá (Krahulec & Duchoslav 2010, Stearn et al. 1980).

Existuje zde velká rozmanitost v reprodukčních systémech. Tyto rostliny se rozmnožují jak generativně, tj. v podobě semen, tak vegetativně, tvorbou dceřiných cibulí nebo pacibulek, které mnohdy začínají pučet ještě v květenství. Tvorba pacibulek často koreluje s výskytem polyploidie (Brat 1965, Briggs & Walters 2001). Při šíření jedinců v přírodních populacích pak tento typ rozmnožování hraje důležitou roli (Kawano et al. 2005). Apomiktický typ rozmnožování jako je diplosporie, partenogeneze nebo pseudogamie, byl pozorován například u druhu *Allium senescens* nebo *Allium tuberosum* (Kojima & Nagato 1997, Kim et al. 1999). Interspecifická hybridizace není u tohoto rodu vzácná, i když i zde existují mezi jednotlivými skupinami silné reprodukční bariéry, a to i v rámci fylogeneticky si blízkých skupin (Budylin et al. 2014, Chuda & Adamus 2009, Fritsch & Friesen 2002). Interspecifických hybridizací se využívá zejména u hospodářsky významných druhů rodu *Allium*, kdy jsou považovány za rychlou a účinnou metodu pro zvýšení kvality a kvantity výnosu plodin či pro vznik nové plodiny (Chuda & Adamus 2009, Yanagino et al. 2003, Umehara et al. 2006). Interspecifické křížení může také například rostlině zajistit rezistenci proti plísňovým chorobám (Alan et al. 2003, Scholten et al. 2007).

U většiny druhů rodu *Allium* je základní chromozomové číslo  $x = 8$ , ale objevují se i jiná chromozomová čísla ( $x = 7, 9$ ) a velké množství polyploidů (Levan 1932, Duchoslav et al. 2013, Fialová et al. 2014). Velká rozmanitost ve stupních ploidie (od  $2x$  po  $8x$ ) odráží v rámci tohoto rodu značnou diverzitu v morfologii, ekologii, reprodukčních systémech i karyologii (Ohri et al. 1998). Díky tomu se stal rod *Allium* vhodným subjektem ke studiu evoluce polyploidů, změn v obsahu jaderné DNA či

strukturu genomu (Labani & Elkington 1987, Ohri et al. 1998, Duchoslav et al. 2010). Existuje spousta studií zabývajících se vlivem genomové duplikace na variabilitu rostlin. Publikovány byly například studie zabývajících rozdílnými ekologickými a geografickými rozdíly v závislosti na stupni ploidie rostliny (Duchoslav et al. 2010, 2013).

### **3.4 Rod *Allium* sect. *Codonoprasum* REINCHENB**

Díky značné morfologické podobnosti a vysokému procentu polyploidie se jedná o taxonomicky jednu z nejkomplicovanějších sekcí v rámci rodu *Allium*, s neustáleným taxonomickým členěním. Stearn et al. (1980) ve Flora Europaea uvádí celkem 21 druhů řazených do této sekce, z nichž má řada z nich dva i více poddruhů. V současnosti se tato sekce řadí mezi nejpočetnější sekce v podrodu *Allium*. Kocyigit & Özhatay (2011) uvádí celkem 49 taxonů řazených do sekce *Codonoprasum*.

Charakteristickými morfologickými znaky této skupiny jsou zřetelně morfologicky diferencované vejčité cibule s listy kryjící svou pochvou ze 2/3 stvol (Stearn et al. 1980, Krahulec & Duchoslav 2010). Samotné stvoly jsou duté a v místě nasedání na podpučí ztenčené. Toulec při bázi lichookolíku je tvořen dvěma nestejně dlouhými listeny s vejčitou, silně žilnatou bází. Oba listeny vytrvávají i během květu a svou délkou přesahují stopky jednotlivých květů (Stearn et al. 1980, Krahulec & Duchoslav 2010). Okvětí je zvonkovitého, nálevkovitého, válcovitého či obvejčitého tvaru (Brullo et al. 1996b). Tvar pylových zrn je protáhlý až eliptický v distálním pohledu, kruhovitý v pohledu polárním. Jasně zřetelný zářez se táhne po celé délce pylového zrna, přičemž se směrem k pólům rozšiřuje a jeho konce se zaoblují (Özhatay & Kocyigit 2009, Kocyigit & Odabasi 2014). Semeník může obsahovat nenápadná nektária, vajíčka jsou po dvou v každém pouzdru. Semena jsou zploštělá (Stearn et al. 1980). Tyto rostliny mají typickou česnekovou vůni, nicméně neobsahují sloučeniny palčivé chuti jako většina ostatních druhů z rodu *Allium* (Krahulec & Duchoslav 2010).

Samotná sekce *Codonoprasum* je typicky mediteránní skupinou s letní dormancí, která je dobře adaptována na mírné, vlhké zimy a horká, suchá léta (Hanelt 1996, Ohri & Pistrick 2001). Svými druhy zasahuje od Středozevního moře po Kavkaz (Hanelt 1996). V rámci podrodu *Allium* byly na základě morfologických znaků sekce *Scorodon*,

*Brevispatha* a *Codonoprasum* brány za ucelenou skupinu (Hanelt et al. 1992). Molekulární studie, založené například na RFLP chloroplastové DNA (von Berg et al. 1996, Mes et al. 1997, Samoylov et al. 1999), nebo na ITS sekvencích jaderné ribozomální DNA (Freisen et al. 2006), však tento postoj nepodporují a ukazují na



Obrázek 1: Morfologický příklad druhu ze sekce *Codonoprasum* - *Allium paniculatum* (převzato z: <http://www.jardincanario.org/-/especie-allium-paniculatum-1->, navštíveno 10. 4. 2015)

oddělené postavení sekce *Codonoprasum* vůči ostatním sekcím podrodu *Allium*. Na základě morfologických znaků je často velmi obtížné některé druhy zařadit do konkrétní sekce, neboť leží na pomyslné hranici mezi dvěma sekcemi (Brullo et al. 2001, Tzanoudakis & Kyriotakis 2008). Skutečný obraz fylogenetické příbuznosti jednotlivých sekcí bude proto zřejmě získán až na základě podrobnějších molekulárních a cytogenetických studií jednotlivých druhů (Ohri et al. 1998).

### 3.4.1 Polyploidní komplex *Allium paniculatum*

Sekce *Codonoprasum* v sobě zahrnuje neoficiální polyploidní komplex *Allium paniculatum*. Pro všechny druhy spadající do tohoto komplexu platí, že jejich cibule

jsou kulaté až podlouhle vejčité. Vnější obal cibule je nejprve bílý, později tmavne. Lodyha je zhruba do své poloviny kryta listovými pochvami. Listy jsou úzké, ploché, semicylindrické až kulaté. Žilnatina a okraje listů jsou často zdrsňelé. Květenství je skryto v zeleném toulci, jehož listeny se zužují do ostrého hrotu, který je často několikanásobně delší než samotné květenství. Toulec se skládá ze dvou listenů, které jsou během kvetení zahnuté směrem dolů. Květenství obsahuje buď malé, nebo velké množství květů. Květní stopky jsou často nestejně dlouhé, většinou však několikrát delší než květy (Levan 1937). Květy, často bílé až po purpurově růžové, jsou před rozkvetem vztyčené, v období květu se stávají převislými (Brullo et al. 1996a, Levan 1937). Okvětí je často zvonkovité nebo polokulovité. Okvětní lístky jsou elipticky vejčité, na vrcholu tupé či zašpičatělé, často s kýlem. Semeník je vejčitý (Levan 1937).

Komplex *Allium paniculatum* je složen z polyploidních zástupců se základním chromozomovým číslem  $x = 8$  (Sagona 2006), přičemž se karyotyp tohoto neformálního komplexu skládá z metacentrických a submetacentrických chromozomů. Vznik jednotlivých druhů tohoto komplexu zřejmě spočíval ve vzestupu stupně ploidie pomocí křížení blízké příbuzných diploidních druhů (Levan 1937). Zástupci tohoto neformálního komplexu rostou od nejzápadnější části Makaronésie, severní Afriky a Pyrenejského poloostrova až po oblast celého Středomoří (Brullo et al 1996a) a Evropy, Íránu a jihozápadní Sibíře (Stearn 1980, Malyshev & Peshkova 1987).

### **3.5 Zástupci rodu *Allium* ze sekce *Codonoprasum***

#### **3.5.1 Charakteristika druhu *Allium carinatum* L.**

Druh *Allium carinatum* spadá do polyploidního komplexu *A. paniculatum* (Levan 1937). Jedná se o byliny s vejčitou, v průměru asi 1 cm širokou cibulí s černými až hnědými blanitými šupinami na povrchu, které se někdy podélně rozpadají na svazečky vláken. Z cibule vyrůstají 2-4 listy s čárkovitou čepelí, která je na líci mírně žlábkovitá, avšak na rubu žebrovaná. Stvol je přímý, oblý, vysoký cca 25-45 cm, směrem k bázi se zužující. Do více jak poloviny je obalen drsnými či hladkými listovými pochvami. Květenství je kryto třikrát delším toulcem, který je na bázi kopinatý a na vrcholu tvoří svými nestejně dlouhými listeny dlouhý, štíhlý, často dolů zakřivený přívěsek. Lichookolík je řídký (obsahuje 0-30 květů). Mohou se tvořit vřetenovité pacibulky. Okvětí je vejčité, přičemž fialové okvětní lístky jsou podlouhle eliptické o rozměrech 4-



6 mm × 1,5-2 mm. Tyčinky vyčnívající z květů mají nachové prašníky, které obsahují žlutá pylová zrna. Pestíky vyčnívají z květů a jejich semeníky jsou úzce obvejčité. Pět milimetrů velké tobolky se tvoří jen vzácně. Kvete v období července až srpna (Krahulec & Duchoslav 2010, Stearn et al. 1980, Komarov 1935).

Typická stanoviště tvoří subxerothermní trávníky, sušší slatinné louky, lesní lemy či okraje křovin s hlubší, minerálně silnou, vysychavou půdou se slabě kyselou až slabě zásaditou reakcí (Krahulec & Duchoslav 2010). Podle Flora Europaea zahrnuje tento druh dva poddruhy (Stearn et al. 1980).

Pro *Allium carinatum* jsou známy dva cytotypy, diploidní ( $2n = 2x = 16$  subsp. *pulchellum*) (Speta 1984, Vosa 1976, Murín et al. 2000) a triploidní ( $2n = 3x = 24$  subsp. *carinatum*) (Murín et al. 2000). Karyotyp tohoto druhu může obsahovat také jeden až dva B chromozomy, jak uvádí ve své studii Blagojević et al. (2007). Sledované B chromozomy, které jsou vždy kratší než nejmenší chromozom v karyotypu, byly dvojího typu, větší (velikosti do 2  $\mu\text{m}$ ) byl metacentrický, zatímco menší akrocentrický (Blagojević et al. 2007).

Pro *Allium carinatum* L. subsp. *pulchellum* Bonnier & Layens ( $2n = 2x = 16$ ) je typickým znakem květenství, které netvoří pacibulky. Charakteristický je také hladký semeník (Duchoslav M., osobní sdělení). Díky těmto znakům byl v minulosti taxonomy různě klasifikován. Někteří řadili *Allium pulchellum* na základě květenství k *Allium flavum* (Regel 1875 sec. Levan 1937, Koch 1907 sec. Levan 1937), zatímco jiní jej správně klasifikovali jako poddruh druhu *Allium carinatum*. Po dlouhou dobu byl také uváděn jako samostatný druh *Allium pulchellum* G. Don (Vosa 1996, Levan 1937). Místa jeho výskytu jsou: Jižní Francie, Pyrenejský poloostrov, Itálie a Balkánské státy, dále pak Malá Asie, Kavkaz, Palestina, či Jižní Afrika (Levan 1937).

Druhým poddruhem je *Allium carinatum* L. subsp. *carinatum* ( $2n = 3x = 24$ ) (Levan 1937). Ten, na rozdíl od předchozího poddruhu, má ve svém květenství obsaženy pacibulky a jeho semeník obsahuje papily (Duchoslav M., osobní sdělení). Svým areálem pokrývá jižní a střední Evropu, nejseverněji zasahuje do jižního Švédska a Estonska (Krahulec & Duchoslav 2010). Tento poddruh se vyskytuje i v České republice, je zde však poměrně vzácný (Zeidler 1999).

### 3.5.2 Charakteristika druhu *Allium fuscum* Waldst. & Kit.

Dalším druhem spadajícím do komplexu *Allium paniculatum* je *Allium fuscum*. Tento druh je charakteristický vejčité-eliptickými cibulemi o rozměrech 10-15 mm × 8-12 mm, jejichž vnější šupiny jsou zbarveny světle až tmavě hnědě, zatímco vnitřní blanitá strana je bělavá. Stvol je vysoký až 40 cm, lysý a přímý, do 2/3 pokryt listovou pochvou. Listy vyrůstající v počtu 4-6 jsou hladké a více jak 30 cm dlouhé. Květenství je kryto vytrvávajícím toulcem, jenž svými dvěma listeny tvoří ve vrcholové části dlouhý přívěsek a svou velikostí přesahuje samotné květenství. Polokulovité květenství obsahuje 15-40 květů. Květní stopky jsou dlouhé 10-30 mm a nejsou rovné. Okvětí je zvonovité s eliptickými a na vrcholu zaoblenými okvětními lístky, které jsou zbarvené do zeleno-bíla až purpurovo-hněda. Okvětní lístky jsou 5-6,5 mm dlouhé 2,2-3 mm široké. Tyčinky, které srůstají při bázi do prstence, mají bílé nitky a eliptické, na vrcholu zakulacené, bělavé prašníky. Semeník je zeleno-žlutý, podlouhle obvejčitý, v horní části bradavčitý. Čnělka je bílá, cca 1 mm dlouhá. Tvoří tobolek o rozměru 6-6,2 mm × 5,8-6 mm (Brullo et al. 1996a, Kocyigit & Özhatay 2010).

Jedná se o diploidy s  $2n = 2x = 16$ , jejichž karyotyp je charakterizován sedmi páry metacentrických chromozomů s jedním makrosatelitem a 0-3 mikrosatelity. Nejčastějším místem výskytu jsou hlavně vápencová podloží v jihozápadním Rumunsku a severozápadním Bulharsku (Brullo et al. 1996a). V minulosti byl tento druh často zařazen jako varieta či poddruh druhu *Allium paniculatum* (Stearn et al. 1980), nebo *Allium oleraceum* (Fiori 1923 sec. Brullo et al. 1996).

### 3.5.3 Charakteristika druhu *Allium dentiferum* Webb & Bethel.

*Allium dentiferum* je díky souboru typických morfologických znaků, které jsou rozeznatelné jak u živého, tak i u herbářového materiálu, dobře rozpoznatelným druhem (Brullo et al. 2008). Typické jsou vejčité cibule o rozměru 1,5-2,5 cm × 1-2 cm s velkým množstvím dceřiných cibulek. Vnitřní šupiny cibulí jsou hnědé, zatímco vnější jsou tmavě hnědé. Z cibule vyrůstá 5-6 listů, které jsou semicylindrické, na abaxiální straně žebrované a kryjí polovinu stvolu. Stvol dosahuje 40-90cm délky. Toulec má dva nestejně dlouhé listeny, jež svou délkou přesahují délku květenství, které kryjí. Květenství je kompaktní, zašpičatělé vejčité a nese velké množství květů. Okvětí je zvonovité s okvětními lístky zbarvenými do žluto-zelena či zřídka růžovo-zelena. Okvětní lístky mají rozměry 5,5-6 mm × 2,5-3 mm. Tyčinky, s nažloutlými, vejčité-

eliptickými prašníky a bílými nitkami s postranními zoubky, srůstají do prstence a z okvětí vyčnívají. Semeník je válcovitý, na vrcholu zúžený, s papilami v horní části. Tvoří obvejčité tobolky o velikosti 5-6 mm × 4,5 mm. (Kocyigit & Özhatay 2010). Kvete v období června až července (Kocyigit & Özhatay 2011).

Tento druh je polyploid s dvěma možnými stupni ploidie. Nejrozšířenější je tetraploidní cytotyp s  $2n = 4x = 32$ , druhým cytotypem je pentaploidní cytotyp s  $2n = 5x = 40$ , nicméně toto rozdělení nesouvisí s geografickým rozdělením a oba stupně ploidie se často nachází ve stejném regionu (Brullo et al. 1991 sec. Kocyigit & Özhatay 2010). U tetraploidů se objevují kromě čtyř párů téměř submetacentrických hlavně metacentrické chromozomy. U pentaploidů je uspořádání chromozomů podobné. Podle celkového uspořádání karyotypu se zřejmě jedná o allopolyploidy (Brullo et al. 2008).

Jedná se o synantropní druh, jehož výskyt je spojen s nitrofilními stanovišti, kde se vyskytuje v malých roztroušených populacích. Roste zejména na ruderalních místech, při okrajích silnic, na obdělávaných polích nebo loukách, kde se vegetativně rozmnožuje pomocí dceřiných cibulí. Vysoce rozšířen je tento druh v mediteránu (Portugalsko, Španělsko, Baleárské ostrovy, Francie, Kostarika, Sicílie, Itálie, Slovinsko, Chorvatsko, Řecko, Kréta, Turecko, Kypr, Izrael), je uváděn i z Maroka, Alžíru, Tuniska. Tento druh byl nalezen i na Kanárských ostrovech a Madeiře (Brullo et al. 2008).

Taxonomie tohoto druhu není dosud zcela jasná. V literatuře i v herbářových kolekcích často dochází k záměně s jinými druhy (Brullo et al. 2008, Kocyigit & Özhatay 2011). *Allium dentiferum* má také celou řadu synonym, jako například *A. monspessulanum* Willd., *A. parnassicum* (Boiss.) Halácsy subsp. *minoicum* Zahar., *A. amansii* Boreau (Kocyigit & Özhatay 2010). Brullo et al. (2008) na základě studia herbářových kolekcí a literatury udává, že byl tento druh často špatně identifikován a následně přiřazen k příbuzným taxonům ze sekce *Codonoprasum*, a to hlavně k druhům *Allium paniculatum*, *Allium fuscum* a *Allium pallens*. Avšak aktuálnější morfologická, karyologická a kladistická studie (Brullo et al. 2008) jasně ukazuje, že se jedná o samostatný druh. Velmi blízké příbuzenské vztahy vykazuje v kladistických studiích rovněž s druhem *Allium galileum*, se kterým má podobné geografické rozšíření avšak s rozdílným biotopem. Existuje také domněnka, že *Allium dentiferum* vzniklo

hybridizací mezi diploidními druhy *Allium galileum* a *Allium paniculatum* s. l. (Brullo et al. 2008).

### 3.5.4 Charakteristika druhu *Allium flavum* L.

Dalším druhem, který je součástí komplexu *Allium paniculatum*, je *Allium flavum*. Pro morfologii tohoto druhu je typická cibule, jež má v průměru 1-1,5 cm, s vnějšími blanitými šupinami, nepravidelně se tvoří i dceřiné cibule. Sivě ojíňený stonek vyrůstá do velikosti 8-50 cm. Typické jsou 2-3 pevné, ojíňené, hladké listy, které do 1/3-1/2 pokrývají svou pochvou stvol a jež dorůstají do výšky 20 cm, přičemž jsou v průměru 2 mm široké. Květenství je kryto toulcem, jenž je tvořen dvěma nestejně dlouhými listeny, které se ve vrcholové části spojují do dlouhého přívěsku. Lichookolík je zašpičatělý nebo polokulovitý, řídký, bez pacibulek, s 9-60 květy na různě dlouhých stopkách. Okvětní lístky jsou jasně žluté, 3-25 mm dlouhé, za plodu vzpřímené. Samotné okvěti je vejcovité. Z okvěti výrazně vynikají svými žlutě zbarvenými prašníky tyčinky, jejichž nitky nemají postranní zoubky. Semeník je polokulovitý a na bázi zúžený do velice krátké stopky, čnělka vyniká z okvěti. Tobolky jsou dlouhé asi 4 mm (Stearn et al. 1980, Kubát 2010, Krahulec & Duchoslav 2010). Období květu je od července až začátku září (Krahulec & Duchoslav 2010).

V Evropě byly u tohoto druhu zaznamenány, v závislosti na zeměpisném rozšíření i ekologických nárocích, celkem dva stupně plodie: diploidní ( $2n = 16$ ) a tetraploidní ( $2n = 32$ ) (Draghia et al. 2013), přičemž v karyotypu převažují velké, metacentrické chromozomy (Vujošević et al. 2013). Karyologická studie provedená u diploidní populace z horské oblasti Galičica (Makedonie) uvádí, že jsou v karyotypu pravidelně nacházeny také B chromozomy s subterminální pozicí centromery (Šopova 1970 sec. Vujošević 2013). U tetraploidních jedinců *Allium flavum* byly B chromozomy rovněž pozorovány, představují však jen přibližně 1 % z tetraploidního genomu (Vujošević et al. 2013).

Charakteristická stanoviště zahrnují skalní stepi, xerothermní trávníky a vřesoviště či výslunné křovinaté stráně. Typické jsou bazické až ultrabazické podklady (Krahulec & Duchoslav 2010). Tento druh je rozšířen v následujících oblastech: Provence, Chorvatsko, Dalmácie, Hercegovina, jižní Morava, Halič, jižní Rusko, Kavkaz, západní Asie (Levan 1937), přičemž tetraploidní jedinci jsou nacházeny zejména v Polsku (Mizianty & Frey 1973), Španělsku (Ruiz Rejon et al. 1986) a Řecku (Tzanoudakis &

Vosa 1988). Oba cytotypy jsou registrovány v Rakousku, Řecku a Bulharsku (Vujošević et al. 2013).

Druh *Allium flavum* objeven už roku 1749 Hallerem a následně popsán Linném roku (1753) (Levan 1933). Flora Europaea rozděluje na základě odlišného stupně ploidie v tomto druhu dva poddruhy: diploidní *Allium flavum* subsp. *flavum* a tetraploidní *Allium flavum* subsp. *tauricum* (Stearn et al. 1980).

### **3.5.5 Charakteristika druhu *Allium podolicum* Blocki ex Racib. & Szafer**

Tento druh je v rámci rodu *Allium* a sekce *Codonoprasum* součástí komplexu kolem druhu *Allium paniculatum*. Jedná se o druh, jehož cibule má v průměru 0,5-1 cm, přičemž vnější šupiny jsou blanité. Stvol měří 15-50 cm a je do více jak poloviny své délky obklopen listovými pochvami. Tři až pět nitkovitých listů dosahuje délky asi 14 cm, přičemž jsou 0,4-1 mm široké. Vytrvávající toulec, který kryje květenství, je tvořen dvěma nestejně dlouhými listeny, jež jsou delší než samotné květenství a které jsou na bázi kopinaté, avšak na vrcholu tvoří dlouhý, štíhlý přívěsek. Lichookolík má v průměru 2,5-4,5 cm, netvoří pacibulky a obsahuje velké množství květů. Květní stopky jsou nestejně dlouhé. Okvětí je zvonovité, přičemž jasně růžové, eliptické, zaoblené okvětní lístky mají rozměry 4,5-5 mm × 2 mm. Tyčinky, se žlutými prašníky a nitkami o velikosti cca 5 mm nevyčnívají z květů, jsou při bázi srostlé do mezikruží. Semeník je elipsoidní, dvakrát delší než široký. Tvoří tobolky o velikosti cca 5 mm (Stearn et al. 1980). Jedná se o diploidní druh s  $2n = 2x = 16$  (Speta 1984, Dobrochaeva et al. 1999).

Vyskytuje se zejména ve světlých lesích nebo na suchých stepích a kamenitých svazích v oblastech východního Maďarska, severního Rumunska, severozápadní až západní Ukrajiny a střední a jižní evropské části Ruska (Dobrochaeva et al. 1999, Kell 2013). Tento druh by nejprve popsán jako varieta k druhu *Allium paniculatum*, tj. *Allium paniculatum* L. var. *podolicum* Asch. et Graebn (Rubanovska & Solomaha 2012). Až v roce 1919 byl uznán za samostatný druh (Krytska et al. 2000).

### **3.5.6 Charakteristika druhu *Allium pallens* L.**

Do komplexu *paniculatum* patří i *Allium pallens*. Typickými morfologickými znaky jsou cibule o průměru 1-1,5 cm s vnějšími blanitými, bělavými šupinami, na vnitřní straně tmavě hnědými. Stonek o délce 10-30 cm je do své 1/3-1/2 pokryt listy. Tři až čtyři nitkovité až lineární listy dosahují délky 6-16 cm a šířky 0,5-2 mm. Květenství

obaluje vytrvávající toulec tvořený dvěma nestejně dlouhými listeny, který svou délkou přesahuje květenství. Lichookolík má v průměru 1,5-3,5 cm a obsahuje velké množství květů (10-70). Květní stopky jsou téměř rovné o délce 5-15 mm. Bílé až růžové okvěti je zvonkovité. Okvětní lístky jsou eliptické, protáhlé až protáhle vejčité, na vrcholu zaoblené. Jsou 4-4,5 mm dlouhé a 1,2-2,5 mm široké. Součástí z květů vyčnívajících tyčinek jsou žlutě zbarvené, eliptické, na vrcholu zakulacené prašníky. Nitky tyčinek jsou dlouhé 3,5-4 mm a samotné tyčinky jsou při bázi srostlé do mezikruží. Semeník je elipsoidní, dvakrát až třikrát delší než široký. Čnělka je bílá, dlouhá 0,7-2 mm. Tvoří vejčité, 4-4,5 mm × 4-4,5 mm velké tobočky (Brullo et al. 2003, Stearn et al. 1980). Kvete od června do července (Kocyigit & Özhatay 2011). Jedná se o tetraploidní druh ( $2n = 4x = 32$ ). Karyotyp tohoto druhu je charakteristický 14 metacentrickými páry chromozomů (u některých párů se vyskytují mikrosatelity) a dvěma chromozomovými páry submetacentrickými (Brullo et al. 2003).

Tento druh je ve většině případů nalézán na nitrofilních stanovištích, jako jsou obdělávaná nebo opuštěná pole, okraje cest nebo louky. Široce rozšířený je tento druh v mediteránní oblasti, konkrétně v Portugalsku, Španělsku, na Baleárských ostrovech, Sicílii, Kypru, ve Francii, Itálii, Řecku, západním a jižním Turecku, Sýrii, Lisabonu, Egyptě či Maroku (Brullo et al. 2003, Kocyigit & Özhatay 2011). Podle Flora Europaea zahrnuje tento druh tři poddruhy: *Allium pallens* subsp. *pallens*, subsp. *tenuflorum* a subsp. *siciliense* (Stearn et al. 1980).

### **3.5.7 Charakteristika druhu *Allium oleraceum* L.**

*Allium oleraceum* je rovněž z komplexu *paniculatum*. Zásobními orgány jsou téměř kulovité cibule o průměru 1-1,5 cm s vnějšími hnědavými až šedavými blanitými šupinami, které se rozpadají ve vlákna. Rostlina během roku vytváří také dceřiné cibule (Duchoslav et al. 2010). Stvol dosahuje 25-100cm výšky a je do své  $\frac{1}{2}$ - $\frac{2}{3}$  kryt listy. Listy vyrůstají v počtu 1-4 a jejich čepel je čárkovitá až nitkovitá, asi 30 cm dlouhá. Na líci jsou listy žlábkovité, na rubu žebrované s chrupavčitými zoubky (Duchoslav et al. 2010, Krahulec & Duchoslav 2010). Květenství obaluje vytrvávající toulec tvořený dvěma nestejně dlouhými listeny. Lichookolík je polokulovitý až kulovitý, řídký, s 0-20 oboupohlavními květy a tvoří buď několik, nebo velké množství (10-60) pacibulek (Duchoslav 2001, Šafářová & Duchoslav 2010, Šafářová 2011). Okvěti je zvonkovité s bělavými okvětními lístky s různě barevným nádechem (růžovým, červeným,

zeleným) a s výrazně tmavší střední žilkou. Okvětní lístky jsou 5,5-7 mm dlouhé a přibližně 2,2-3 mm široké. Květní stopky jsou různě dlouhé (15-60 mm), vnější za květu ohnuté dolů. Tyčinky jsou kratší popřípadě stejně dlouhé jako okvěť, nitky dosahují délky 4,5-5,5 mm. Tyčinky, které jsou na bázi krátce rourkovitě srostlé, mají žluté prašníky. Pestík vyčnívá z květu, semeník je úzce obvejčitý, asi čtyřikrát delší než široký. Tvoří 6-7 mm velké tobolky, které obsahují malý počet semen (Ohryzek 2007, Duchoslav 2000). Tento druh se rozmnožuje jak pohlavně (pomocí semen), tak i vegetativně, a to dceřinými cibulemi či pacibulkami (Duchoslav 2001, Stearn et al. 1980, Krahulec & Duchoslav 2010, Komarov 1935). Kvetे v období července až září (Krahulec & Duchoslav 2010).

*Allium oleraceum* vykazuje v rámci celého rodu vysoký stupeň polyploidie. Doposud bylo popsáno celkem šest cytotypů, od triploidů po oktoploidy ( $2n = 24, 32, 40, 48, 56, 64$ ) (Duchoslav et al. 2010, Šafářová et al. 2011), přičemž existují studie zabývající se korelacemi mezi různými polyploidními stupni a změnou ekologických nároků tohoto druhu. Hexaploidní cytotypy se většinou vyskytují na lokalitách ovlivněných lidskou činností, jako jsou okraje polí, cest, a ve vyšších nadmořských výškách. Pentaploidní jedinci byli pozorováni zejména v teplejších oblastech nižších a středních nadmořských výšek, přičemž rostou na širokém rozmezí biotopů (vysoce mineralizované půdy i půdy s vysokým pH). Tetraploidní jedinci jsou pak vázáni na přírodní stanoviště, jako jsou skalní stepy či stepní louky teplejších oblastí (Duchoslav et al. 2010). Rostliny různých cytotypů se liší rovněž v množství květů a jejich sušině, jak zdokumentovali ve své studii se třemi cytotypy (4x, 5x a 6x) druhu *Allium oleraceum* Fialová & Duchoslav (2014), přičemž se zvyšujícím se ploidním stupněm dochází ke snížení množství květů v květenstvích a tím i jejich sušiny. Tato studie se rovněž zabývala vztahem mezi stupněm ploidie a poměrem vyprodukovaných sexuálně a asexuálně vzniklých propagulí, kdy bylo zjištěno, že s rostoucím ploidním stupněm klesá i množství sexuálně vytvořených propagulí, neboli semen. Jedinci vzniklí z asexuálně vzniklých propagulí (pacibulek) jsou následně větší, kvetou dříve, produkují více propagulí a celkově přežívají lépe ve srovnání s jedinci vzniklými ze semen, kteří mají však naopak mnohem vyšší genetickou variabilitu. To je zřejmě důvodem dominantní role vegetativního rozmnožování tohoto druhu při zakládání nové populace či při osídlování disturbovaných míst (Fialová & Duchoslav 2014).

Obecně roste tento druh v širokém spektru stanovišť a na různých typech substrátů, v křovinách, příkopech, na okrajích lesů, mezích, na skalách či na stinných stanovištích, kde často zůstává ve vegetativním stavu a vytváří spíše rozvolněné porosty (například v luzích a akátinách) (Kubát 2010, Krahulec & Duchoslav 2010). Rozšířen je hlavně po západní, střední i východní Evropě a na jihu Skandinávie, vzácně se však objevuje v jižní části Balkánského poloostrova a v jižní Itálii. V České republice patří mezi běžně rostoucí druhy s optimem v nadmořské výšce mezi 300 až 500 m. n. m. (Duchoslav et al. 2010, Krahulec & Duchoslav 2010).

*Allium oleraceum* představuje v komplexu *Allium paniculatum* jediný druh, u kterého není znám diploidní cytotyp (Duchoslav et al. 2010). To je také důvodem, proč není u tohoto druhu dosud známý jeho původ. Jako první se touto problematikou zabýval Levan (1937), který označil tento druh za autopolyploidní poté, co po zkřížení diploidních jedinců druhu *Allium paniculatum* získal tetraploidní rostliny, které byly svou morfologií téměř shodné s druhem *Allium oleraceum*. Protože však bylo zjištěno, že použití diploidní jedinci jsou dnes klasifikováni za samostatné druhy *Allium podolicum* a *Allium paniculatum*, jedná se pravděpodobně o druh s allopolyploidním původem (Duchoslav et al. 2010). Allopolyploidní původ tohoto druhu předpokládal, po použití techniky C-banding, která je založena na vizualizaci oblastí konstitutivního heterochromatinu chromozómů, i Vosa (1976).

### **3.5.8 Charakteristika druhu *Allium paniculatum* L.**

*Allium paniculatum* je bazálním druhem polyploidního komplexu *paniculatum*, skupiny v rámci sekce *Codonoprasum* (Levan 1937). Jedná se o druh s cibulí o průměru 1-2,5 cm, s vnější šedavou, blanitou membránou. Stvol dosahuje výšky 30-70 cm a do své 1/3-1/2 je pokryt hladkými listovými pochvami. Listy vyrůstají v počtu 3 až 4, jsou 1-2 mm široké, hladké až drsné, svrchu často žlábkovité a zesponu žebrované. Dosahují výšky cca 25 cm. Polokulovitý až vejčitý lichookolík měří v průměru 3,5-7 cm a obvykle obsahuje velké množství květů, tvoří pacibulky. Květenství je kryto toulecm, který je obvykle dvakrát až čtyřikrát delší než samotné květenství. Toulec je tvořen dvěma nestejně dlouhými listeny, které jsou oválné, na bázi kopinaté. Oba listeny se na vrcholu spojují do dlouhého přívěsku. Okvětí je zvonkovité, s okvětními lístky o rozměrech 4,5-7 mm × 1,5-2,5 mm. Květní stopky nejsou stejně dlouhé a jsou několikrát delší než okvětí. Okvětní lístky tvoří úzce zvonkovité růžové až tmavě



růžové lesklé okvěti s tmavě zbarvenou žilkou. Netvoří se pacibulky. Tyčinky, srůstající na bázi do prstence, mají nitky o délce 5 mm, které nepřerůstají okvěti, a žlutě zbarvené prašníky. Semeník je elipsoidní, dvakrát delší než široký. Čnělka o velikosti 1-2 mm z květu částečně vyčnívá. Tobolky dosahují velikosti cca 5 mm (Komarov 1935, Stearn et al. 1980). Kvete v období července až srpna (Komarov 1935).

Podle Flora Europaea zahrnuje tento druh čtyři poddruhy, lišící se počtem chromozomů: subsp. *paniculatum* ( $2n = 24, 32$ ), subsp. *fuscum* ( $2n = 16, 32$ ), subsp. *euboicum* a subsp. *villosulum* (= *Allium rhodopeum*) ( $2n = 16$ ) (Stearn et al. 1980). Tento taxon roste především na stepních a písčnatých stanovištích (Komarov 1935). Je rozšířen především ve Středomoří, na Krymu, v Íránu a střeasijských zemích, dále pak na jihu a východě Slovenska a ve středním Rusku (Stearn et al. 1980, Dobrochaeva et al. 1999).

### **3.5.9 Charakteristika druhu *Allium convallarioides* Grossh.**

Tyto rostliny mají vejčité cibule o rozměrech 15-20 mm × 12-18 mm, s blanitým bílým obalem, na vnější straně obvykle tmavě hnědě zbarveným. Někdy tvoří i dceřiné cibule. Stonek je vysoký 40-70 cm, válcovitý, lysý, krytý do své 1/3-1/2 listovou pochvou. Zelené, žebrované listy mohou být až 15 cm dlouhé a 1-2 mm široké, vyrůstají v počtu 4-5. Podobně jako u ostatních zástupců sekce *Codonoprasum* má i tento druh vytrvávající toulec složený ze dvou nestejně dlouhých listenů, které svou délkou přesahují květenství. Květenství je kulovité až polokulovité, v průměru dosahuje 3-5 cm. Obsahuje mnoho květů s nestejně dlouhými květními stopkami dlouhými 10-28 mm. Okvěti je zvonkovité s rovnými, bílými, podlouhlými a na vrcholu zaoblenými okvětními lístky. Tyčinky vyčnívající z okvěti, mají bílé, nestejně dlouhé nitky o délce 2,5-3 mm. Prašníky jsou žluté, eliptické, na vrcholu zašpičatělé (Brullo et al. 2003). Čnělka pestíku vyčnívá z květu (Komarov 1935). Semeník je elipsoidní, hladký, bílý s nádechem do zelena. Tvoří obvejčité tobolky o velikosti cca 4,5 mm × 4,5 mm (Brullo et al. 2003). Období květu je podle Komarova (1935) v rozmezí června až července.

Jedná se o diploidní druh s  $2n = 2x = 16$ , který je svým karyotypem je značně podobný příbuznému druhu *Allium pallens*. Chromozomový komplement je značně homogenní, je složen ze 7 metacentrických párů, u kterých nese jeden pár na svém krátkém raménku makrosatelit, a jedním párem submetacentrickým (Brullo et al. 2003). Místem výskytu tohoto druhu jsou převážně skalnatá místa, křoviny, či stepní stráně.

Objevuje se rozptýleně po celé Střední Asii, tj. Kavkaz, Krym, Irán, Irák (Brullo et al. 2003, Takhtajan 2006).

Tento druh je, díky svým morfologickým, ale i karyologickým znakům, považován za fylogeneticky blízce příbuzný druhu *Allium pallens* a *Allium coppoleri* Tineo (Brullo et al. 2003). Dříve byl pro svou morfologii dokonce mylně považován za synonymum k *Allium myrianthum* Boiss. (Kollmann 1984 sec. Brullo et al. 2003). Avšak Brullo et al. (1995) ve své morfologické, ekologické i karyologické studii jasně ukázal, že se jedná o dva zcela odlišné druhy.

### **3.5.10 Charakteristika druhu *Allium rupestre* Steven**

*Allium rupestre* se vyznačuje vejčitou cibulí o průměru 1 cm s vnější žluto-bílou blanitou membránou. Stonek o délce 25-40 cm s 2-3 nitkovitými listy, které dosahují délky 12 cm a šířky 0,5-1 mm, je do své 1/3 až 2/3 kryt zdrsňelou nebo vzácněji hladkou listovou pochvou. Polokulovité květenství má v průměru 2-3 cm obsahuje malé množství květů (5-20). Květenství je kryto toulcem, jenž svou délkou přesahuje samotné květenství a jenž se skládá z téměř stejně dlouhých, anebo nestejně dlouhých listenů. Okvětní stopky jsou téměř stejně dlouhé (5-10 mm). Okvěti je úzce zvonkovité a jednotlivé okvětní lístky jsou světle růžové až bílé, někdy na okrajích zabarvené do hnědo-fialova, s fialovou střední žilkou, úzce eliptické, tupé a měří 5-6 mm × 1,5 mm (Stearn et al. 1980, Özdemir et al. 2011). Tyčinky jsou buď stejné délky jako okvětní lístky, nebo je jen krátce přerůstají. Prašník je fialový. Podle palynologické studie provedené Gülerem & Pehlivanem (2006) obsahují pylová zrna tohoto druhu rýhu zrnité struktury, víčko však chybí. Z květů vyčnívá i pestík (Komarov 1935). Plodem je tobolka o rozměrech 4 mm × 2 mm (Özdemir et al. 2011). Při studii klíčivosti se ukázalo, že na rozdíl od většiny zástupců rodu *Allium*, kteří nejvíce klíčí při teplotách od 5 do 16 °C, u tohoto druhu vyklíčilo vysoké procento semen i při teplotě 26 °C (Specht & Keller 1997). Období květu je u tohoto druhu od srpna do října (Oganesian & Agababian 2001).

Jedná se o triploidní druh s  $2n = 3x = 24$  (Ohri et al. 1998), který je přirozeně rozšířen hlavně na písčitých či skalnatých stanovištích a na kamenitých svazích evropské části Kavkazu, jihozápadní Asie (sever Turecka), Krymu. Zde roste v nadmořských výškách okolo 1600-2000 metrů nad mořem (Komarov 1935, Stearn et al. 1980, Takhtajan 2006, Oganesian & Agababian 2001, Özdemir et al. 2011).

Ze současné literatury nejsou názory na příbuzenské vztahy tohoto druhu s ostatními druhy zcela zřejmé. Brullo et al. (2004) naznačuje, na základě celkového habitatu rostliny a společných znaků v květenství, možnou příbuznost s druhem *Allium exaltatum* (Meikle) Brullo ze sekce *Codonoprasum*. Mnoha významnými znaky, jako jsou velikost květenství, barva okvětí, či ploidie, se však od sebe liší.

### **3.5.11 Charakteristika druhu *Allium kunthianum* Vved.**

Tento druh má vejčité cibule o délce 0,5-1,5 cm a průměru 0,8-1,3 cm s hnědavými až černavými, papírovitými vnějšími obaly. Stonek vyrůstá do délky 8-25 cm a je do své 1/2 až 2/3 kryt listovými pochvami. Listy rostou po 2-4, jsou cca 1 mm široké, rýhované, hladké nebo na krajích zdrsňelé, často přerůstající stvol. Vytrvávající toulec, který je tvořen dvěma nestejně dlouhými listeny, je stejně jako u ostatních zástupců této sekce delší než květenství. Květenství je polokulovité, obsahuje spíše malý počet květů a netvoří pacibulky. Květní stopky jsou téměř stejně dlouhé, obvykle kratší než okvětí. Okvětí je zvonkovité, tmavě růžové s tmavě fialovou střední žilkou. Okvětní lístky jsou podlouhlé, 5-8 mm dlouhé a 0,8-1,5 mm široké. Tyčinky mají žluté prašníky a nepřechňávají květy. Tobolka je 1,5-2,5 mm dlouhá a 1-2 mm široká (Özdemir et al. 2011, Komarov 1935). Období květu spadá do intervalu od srpna do září (Komarov 1935).

Tento druh roste zejména na loukách a skalnatých místech ve vysokých horách Kavkazu a jihozápadní Asie (Irán) (Komarov 1935, Takhtajan 2006). Özdemir et al. (2011) uvádí přírodní populace v Turecku. *Allium kunthianum* je blízce příbuzné s druhem *Allium rupestre*. Tyto dva druhy se však liší svou geografickou polohou, kdy *Allium kunthianum* se vyskytuje, na rozdíl od *Allium rupestre*, zejména ve vysokých polohách (Takhtajan 2006).

### **3.5.12 Charakteristika druhu *Allium rhodopeum* Velen.**

*Allium rhodopeum* patří na základě morfologických znaků do sekce *Codonoprasum*, přičemž vykazuje těsné vztahy s polyploidním komplexem *Allium paniculatum* (Brullo et al. 1998).

Tento druh se vyznačuje vejčitými cibulemi o velikosti 1,5-2,2 mm × 1-1,5 mm, které netvoří dceřiné cibule. Vnější obaly jsou kožovité, světle hnědé, zatímco vnitřní jsou blanité a bělavé. Lysá, tuhá lodyha měří 15-35 cm, šířka se pohybuje v rozmezí 1-

3,5 mm. Lodyha je krytá listovými pochvami do ½ nebo do 2/3 délky. Deset až třicet centimetrů dlouhé listy mají 0,3-0,8 mm dlouhé chlupy. Květenství je volné, s 15-35 květy s nestejně dlouhými květními stopkami (5-25 mm). Květenství je kryto vytrvalým toulcem se dvěma listeny, které jsou v horní části zúžené a tvořící dlouhé, chlupaté přívěsky. Okvětí je zvonkovité, tvořené 5-6 mm dlouhými, 2-2,7 mm širokými, nestejnými, podlouhlými okvětními lístky, jež jsou na vrcholu kruhové až jemně zašpičatělé a obsahují množství chlupů. Tyčinky mají nestejně dlouhé nitky, na vrchní části bílé a ve spodní části fialové, jež jsou na vnějším okraji květu často kratší než uvnitř květu. Prašníky jsou zbarveny do žluto-bíla a jsou jemně protažené (rozměry 1-1,2 mm × 0,5-0,6 mm). Zelený semeník, dosahující délky 2,5-3 mm, má dlouhou bílou čnělku. Tobolka se otvírá třemi chlopněmi. Její tvar je obvejčitý, přičemž se směrem k bázi výrazně zužuje. Kvete od července do začátku srpna. Zástupci tohoto druhu mají diploidní chromozomovou sadku s  $2n = 2x = 16$ . Karyotyp je obvykle uniformní, obsahuje 8 metacentrických chromozomových párů, přičemž u některých z nich se objevují sekundární konstriktce. (Brullo et al. 1998)

Vyskytuje se převážně na suchých skalnatých místech a to zvláště u borovicových lesů a macchií nebo na svazích, které jsou exponovány na sever, a to do 300-400 metrů nad mořem. *Allium rhodopeum* zahrnuje dva poddruhy, které se liší morfologicky, geografickým rozšířením, dobou kvetení, i karyologicky. Prvním z nich je subsp. *rhodopeum*. Tento poddruh má obvykle tři až čtyři široce žlábkovité listy. Toulec je tvořen dvěma listeny, přičemž větší listen obsahuje 5-7 žilek a menší 3-5 žilek. Prašníky jsou na vrcholu zaoblené, semeník je podlouhlý. Roste v oblastech jižního Bulharska, severního a středního Řecka. Kvete od července do začátku srpna. Druhým poddruhem je subsp. *turcicum*, který má na rozdíl od předchozího poddruhu 4-6 plochých a cca 2 mm širokých listů. Větší listen toulce obsahuje 7-9 žilek, zatímco menší 5 žilek. Prašníky jsou na vrcholu zašpičatělé, semeník je ve střední části zaškrčený. Tato subspecie roste v oblastech severovýchodního Řecka, v evropské části Turecka a v severozápadní části Malé Asie. Kvete od konce srpna do září. Karyologicky se od sebe oba poddruhy liší přítomností sekundární konstriktce u chromozomových párů. U subsp. *rhodopeum* se satelit vyskytuje na krátkém raménku u pátého chromozomového páru, popřípadě na dlouhém raménku čtvrtého páru. U subsp. *turcicum* se sekundární konstriktce nachází vždy u posledního chromozomového páru. (Brullo et al. 1998).

Po dlouhá léta byl tento druh označován jako poddruh k druhu *Allium paniculatum*, tj. *Allium paniculatum* subsp. *villosulum* (Barina & Pifko 2011). Od tohoto druhu se však odlišuje ochlupenými listy. Díky tomuto znaku je přiřazován spíše k druhu *Allium pilosum* Sibth. & Sm., nebo k druhu *Allium archeotrichon* Brullo, Pavone & Salmeri, se kterým sdílí i znaky ve stavbě květu (Brullo et al. 1998, 1999, 2001).

### 3.6 Molekulární metody

Metody molekulární genetiky se zaměřují na vyhledávání rozdílů v sekvencích DNA a identifikaci polymorfizmů v celkové genomové, chromozomové, mitochondriální, chloroplastové, či plazmidové DNA anebo polymorfizmů specifických genů, případně jejich částí (Šmarda et al. 2010). Data, která pomocí těchto metod získáme, je poté možno využít pro rozpoznávání jednotlivých druhů organismů, jejich třídění, či ke studiu rostlinné diverzity (Karp et al. 1996), zjišťování genealogické příbuznosti jedinců v rámci populace či druhu a rekonstrukci fylogeneze druhů nebo vyšších taxonů bez zkreslujících vlivů například z vnějšího prostředí (Agarwal et al. 2008). Využitím molekulárních dat pro účely fylogenetiky a systematické biologie se v současnosti zabývá samostatný vědní obor, tzv. molekulární fylogenetika (Flegr 2009).

V molekulárních studiích se používá tzv. molekulárních DNA markerů, které využívají přirozeně se vyskytujícího polymorfismu DNA (inserce, delece, translokace, duplikace a bodové mutace) (Kumar et al. 2009, Mondini et al. 2009). Tyto markery jsou definovány jako identifikovatelné sekvence DNA, nacházející se v určitých místech genomu, které mohou, ale nemusí souviset s fenotypovým projevem znaku (Jonah et al. 2011, Mondini et al. 2009). Různé molekulární DNA markery mají také různé genetické vlastnosti. Rozlišuje se u nich například dominantní (RAPD, AFLP), či kodominantní (RFLP, SSRs) charakter, přičemž kodominantní markery jsou na rozdíl od dominantních schopny rozlišit heterozygotnost od homozygotnosti a tím stanovit genotyp a frekvenci alel v lokusu (Mondini et al. 2009, Kumar et al. 2009). Kodominantní markery jsou ale vyjádřeny pouze v případě, že se u daného jedince vyskytují obě alely. V porovnání s dominantními markery tak přinášejí méně informací, neboť na rozdíl od multilokusových technik analyzují pouze jeden lokus (Kumar et al. 2009).

Kromě molekulárních markerů je genetická diverzita hodnocena také pomocí morfologických a biochemických analýz. Morfologie ale často podléhá fenotypové

plasticitě, a proto je vhodnější k posouzení variability organismů v přítomných podmínkách vnějšího prostředí. Biochemické analýzy, založené na separaci proteinů, jsou zase omezeny pouze na několik enzymů, pro zhodnocení celé diverzity jsou proto nevhodné. Z hlediska systematiky a fylogenetiky mají tedy molekulární markery celou řadu výhod. Kromě toho, že nemohou být ovlivněny faktory vnějšího prostředí, mají molekulární markery i tu výhodu, že se vztahují na všechny části genomu, nevykazují pleiotropní ani epistatické účinky. Dále jsou schopny rozlišit polymorfismus, který nezpůsobuje změnu fenotypu, a pozitivem většiny z nich je i kodominantnost (Mondini et al. 2009). Významnou výhodou molekulárních markerů je jejich stálost a detekovatelnost bez závislosti na velikosti, či diferenciaci (Agarwal et al. 2008). Molekulární markery mají také na rozdíl od většiny markerů morfologických kvalitativní charakter, což umožňuje jejich přepis například do alfabetských znaků a jejich předání bez jakékoli ztráty či zkreslení informace (Flegr 2009). Díky všem svým výhodám se ukázaly být velmi dobrým nástrojem k hodnocení genetické variability a k objasnění jak vnitrodruhových, tak mezidruhových vztahů (Chakravarthi & Naravaneni 2006).

K vyhodnocování DNA polymorfismů se používá různých druhů technik, které jsou obecně klasifikovány do dvou kategorií: 1) techniky založené na hybridizaci a 2) techniky založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) (Mondini et al. 2009). První technika je založena na využití enzymů, restrikčních endonukleáz, které rozštěpí danou DNA na přesně definovaných úsecích na různě dlouhé fragmenty, které jsou následně vizualizovány pomocí elektroforézy a hybridizací DNA se značenou sondou (Zeisek 2007). Tyto metody jsou však časově náročné a pracné, neboť vyžadují hybridizaci a Southern blotting (Schulman 2007), kterým se relativní poloha jednotlivých fragmentů DNA z gelu přenesou na pevné médium (nitrocelulózní nebo nylonová membrána) pro následné zvýraznění definovaných genů či segmentů (Briggs & Walters 2001). Naopak techniky založené na PCR využívají amplifikace určitých sekvencí DNA *in vitro*, pomocí specificky či libovolně vybraných primerů a termostabilní DNA polymerázy. Výsledné amplifikované fragmenty jsou následně elektroforeticky separovány a buď barvením, či autoradiografií detekovány (Kumar et al. 2009).

S rozvojem technik založených na polymerázové řetězové reakci se od 80. let 20. století začaly ve velké míře používat tzv. mikrosatelity (Balloux & Lugon-Moulin 2002). Ty jsou známé také pod zkratkou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) a představují

úseky DNA, které se skládají z opakujících se krátkých tandemových sekvencí o velikosti od 2 do 6 párů bází (Jarne & Lagoda 1996, Mondini et al. 2009). Pomocí PCR amplifikace se zvýrazňují rozdíly v délkách tandemových sekvencí, které mohou být následně detekovány pomocí gelové elektroforézy a jsou známkou polymorfismu (Provan et al. 2001, Kumar et al. 2009, Jonah et al. 2011). Tyto úseky jsou velmi rozšířené v celém genomu a na základě rozdílů v počtu opakujících se jednotek zobrazují úroveň polymorfismu (Jonah et al. 2011, Jarne & Lagoda 1996). Pro svůj kodominantní charakter, obrovský rozsah alelické diverzity, snadnost hodnocení velikostních změn SSR pomocí PCR, či vysokou reprodukovatelnost se mikrosatelity staly velice populárními genetickými markery (Agarwal et al. 2008). Na druhou stranu však vývoj metod, které využívají mikrosatelitů, vyžaduje rozsáhlé znalosti sekvencí DNA, a proto jsou vyvinuty především pro komerční plodiny než pro planě rostoucí druhy (Mondini et al. 2009). I přesto, že mikrosatelity představují kodominantní markery, může vést mutace v místě nasedání primerů ke zkreslení odhadu alelických frekvencí a tím k podhodnocení heterozygotnosti. Nehodí se proto ke studiu vyšších taxonomických úrovní (Kumar et al. 2009). Obecně jsou mikrosatelity díky svému vysokému stupni polymorfizmu používány k populačně genetickým studiím či ke genovému mapování (Röder et al. 1998).

Významnými molekulárními markery, jež jsou založené na vyhodnocování variability mikrosatelitních sekvencí, jsou například SNPs (Mondini et al. 2009). SNPs neboli „*Single nucleotide polymorphism*“ představují molekulární markery, které jsou v genomech zastoupeny ve velkém množství a to jak v kódujících, tak i nekódujících oblastech. Tyto markery jsou obvykle bialelické, neboť jsou založeny na detekci bodové mutace, tj. pouze jedné zaměněné báze (A, T, C nebo G), v sekvenci dané rostlinné či živočišné DNA, přičemž pravděpodobnost změny dvou bází v jedné pozici je velmi nízká. Nejčastěji detekovanými mutacemi jsou transverze, to znamená mutace, při nichž dochází k záměně purinové báze za pyrimidinovou či naopak, nebo tranzice, kdy se vymění buď purinová báze za jinou purinovou bázi, nebo naopak pyrimidinová báze za jinou pyrimidinovou bázi (Vignal et al. 2002). Velké množství SNP markerů se používá zejména k vytváření genetických map živočichů nebo k analýze lidského genomu (především při studiu dědičných onemocnění) (Wang & Moulton 2001). Široké uplatnění nachází rovněž při studiu rostlin, kde například slouží k identifikaci odrůd plodin (Deleu et al. 2009, Ganai et al. 2009).

Příkladem dalších molekulárních metod, kterých se běžně používá jak v ekologických, evolučních, taxonomických, fylogenetických, tak i genetických studiích, jsou již zmíněné fingerprintingové metody RFLP, RAPD a AFLP. Stále se však objevují nové pokročilejší techniky, které jsou vyvíjeny na základě starších metod a které umožňují zvýšení citlivosti starších metod (Agarwal et al. 2008, Mondini et al. 2009).

### **3.6.1 Metoda RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Metoda RFLP, kterou použili Botstein et al. (1980) ke konstrukci první genetické mapy, se stala první molekulární markerovou technikou detekce DNA polymorfismu založené na hybridizaci. Jedná se o metodu polymorfizmu délky restričních fragmentů, která využívá k charakterizaci dané jaderné, mitochondriální či plastidové DNA polymorfizmu v délkách restričních fragmentů, tj. těch fragmentů, které byly z komplexní DNA vyštěpeny pomocí restričních enzymů (Šmarda et al. 2010, Flegr 2009).

Přírozenou funkcí restričních enzymů je rozeznat specifické sekvence DNA o velikosti 4, 5 nebo 6 bází a podle této rozpoznané sekvence následně danou DNA rozštěpit. Tyto endonukleázy jsou produkovány různými prokaryotními organizmy (například bakteriemi), u kterých slouží jako ochrana před cizorodou DNA. Každý takovýto enzym má svou specifickou, většinou palindromickou, rozpoznávací sekvenci, přičemž bakterie svou DNA před zkrácením (například methylací cytosinu či adeninu) v této sekvenci chrání (Weising et al. 2005). Rozdíly ve velikosti restričních fragmentů u různých jedinců následně svědčí o polymorfismu, který nastává poté, co mutace způsobí ztrátu daného restričního místa nebo se vytvoří restriční místo nové. To může být způsobeno inzercí či delecí v rámci restričního fragmentu nebo přesmykem DNA (Sabir et al. 2014). Přítomné polymorfismy lze následně snadno detekovat gelovou elektroforézou, při které se výsledné fragmenty separují podle velikosti (Šmarda et al. 2010, Weising et al. 2005, Botstein et al. 1980). Gelová elektroforéza může být také doplněna Southernovou hybridizací například s radioaktivními nebo chemiluminiscenčními sondami specifickými pro polymorfní oblasti genomu, přičemž selektivní hybridizace umožní snazší interpretaci výsledků snížením počtu srovnávaných fragmentů (Botstein et al. 1980, Šmarda et al. 2010).



Metoda RFLP má řadu modifikací a variant. Například pro genomy s nízkou komplexitou (genomy bakterií a organel) je možné použít k elektroforetické separaci v agarózovém či polyakrylamidovém gelu DNA po restrikci a polohu DNA fragmentů v gelu detekovat fluorescenčním barvivem, respektive ethidiumbromidem (Flegr 2009). Pro komplexnější genomy je však vhodnější po naštípání DNA provést radioaktivní označení konců fragmentů a po ukončení elektroforézy jejich umístění detekovat pomocí autoradiografie. Tato metoda se označuje jako tzv. metoda taxoprintů (Fedorov et al. 1992 sec. Grechko et al. 1997).

Tato metoda je uznávána hlavně pro svůj kodominantní charakter a vysoký polymorfismus (Kumar et al. 2009, Weising et al. 2005). Typická je rovněž její vysoká reprodukovatelnost a schopnost zpracovat velké množství vzorků najednou (Mondini et al. 2009). Na druhou stranu je však potřeba velké množství purifikované DNA s vysokou molekulovou hmotností. Kvůli časové a finanční náročnosti a používání radioaktivních či toxických činidel však tato metoda nepatří mezi nejpoužívanější (Agarwal et al. 2008, Amini-Bavil-Olyaei et al. 2013). Podobně jako jiné metody je nejvhodnější pro studium fylogenetických vztahů mezi blízkými příbuznými druhy, ke studiu hybridizace a introgrese, či ke studiu diverzity (Kumar et al. 2009). Je však možné ji použít i na intraspecifické studie, kde se však musí počítat s její sníženou použitelností danou jejím multilokusovým charakterem, který znemožňuje použití této metody k analýze genotypové skladby populace (Flegr 2009).

### **3.6.2 Metoda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Metoda náhodné amplifikace polymorfní DNA vyvinuta Williamsem et al. (1990), představuje cenově a časově efektivnější alternativu RFLP analýzy (Penner et al. 1993a). Základem této metody je PCR reakce dané DNA, při které se však použije jediný PCR-primer libovolné sekvence s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA o délce kolem 10 nukleotidů (Bardakci 2001, Šmarda et al. 2010). Za těchto podmínek nasedá primer s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích chromozomové nebo plazmidové DNA (Šmarda et al. 2010). Při PCR se pak tyto úseky s určitým náhodně vybraným primerem amplifikují a po provedení agarózové elektroforézy je jejich přítomnost a poloha možné buď barvením stříbrem, nebo použitím fluorescenčního barviva zviditelnit (Sabir et al. 2014).

Hlavní výhodou této metody je její jednoduchost a rychlost. Také díky PCR reakci není potřeba velké množství templátové DNA (obvykle stačí 5- 50 ng/μl) (Williams et al. 1993). Výhodou je i možnost použití různých primerů i jejich kombinací či použití již předem restrikcí endonukleázami naštípané DNA (Flegr 2009). I přesto je však důležité počítat s tím, že používané markery jsou dominantní, a k vytváření genetických map je proto nutné použít zpětné křížení nebo rekombinantní inbrední populace. (Karp et al. 1996, Bardakci 2001). Velmi často je této metodě vytýkána nízká spolehlivost a reprodukovatelnost (Schierwater & Ender 1993), neboť výsledek PCR je velmi citlivý i na drobné změny v reakčních podmínkách, které se mohou lišit i mezi jednotlivými laboratořemi (Kumar et al. 2009, Mondini et al. 2009, Agarwal et al. 2008). Takovými změnami jsou například denaturační teplota umožňující rozvolnění dvoušroubovice DNA, zvolený primer, vhodným způsobem získaná DNA či přesný průběh amplifikačního programu (Hilton et al. 1997, Micheli et al. 1994, Penner et al. 1993a). Díky tomu je také nemožné porovnávat výsledky RAPD z různých pracovišť a dokonce je nevhodné porovnávat i výsledky získané na jednom pracovišti, avšak v nezávislých pokusech (Hilton et al. 1997, Penner et al. 1993a).

I přes velké nevýhody je však tato metoda stále využívána při vytváření genetických map, v populačních analýzách, fylogenetických studiích, v molekulární ekologii i taxonomii (Micheli et al. 1994, Karp et al. 1996). Příkladem úspěšného využití metody RAPD je identifikace polymorfismů spojených s geny rezistence onemocnění ovsa (Penner et al. 1993b) a mapování genomu u *Arabidopsis thaliana* (Reiter et al. 1992), či druhů tilapií (*Oreochromis niloticus* a *Oreochromis aureus*) (Naish et al. 1995). V rámci studia rodu *Allium* se tato metoda využívá zejména pro odhalení intraspecifické a infraspecifické diverzity (Ebrahimi et al. 2009, Mukherjee et al. 2013, Tedeschi et al. 2014).

### **3.6.3 Amplified fragment length polymorphism (AFLP)**

Molekulární metodu AFLP, která důmyslně kombinuje RFLP analýzu s PCR, publikoval roku 1995 Vos et al. Jedná se o techniku založenou na selektivní amplifikaci celkové genomové DNA, která je aplikovatelná na všechny organismy a to i bez předchozí znalosti jejich nukleotidové sekvence (Vos et al. 1995). Protože jsou její výsledky vysoce informativní, stala se jednou z metod k detekci polymorfismu DNA,

které se využívá jak v diagnostice, či populační genetice, tak pro fylogenetické a taxonomické studie (Weising et al. 2005).

Průběh AFLP se skládá ze čtyř základních kroků: 1) restrikce DNA restrikčními endonukleázami, 2) ligace s oligonukleotidovými adaptory, 3) preselektivní a selektivní amplifikace restrikčních fragmentů pomocí selektivních primerů a 4) elektroforetická separace amplifikovaných fragmentů v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu (Šmarda et al. 2010).

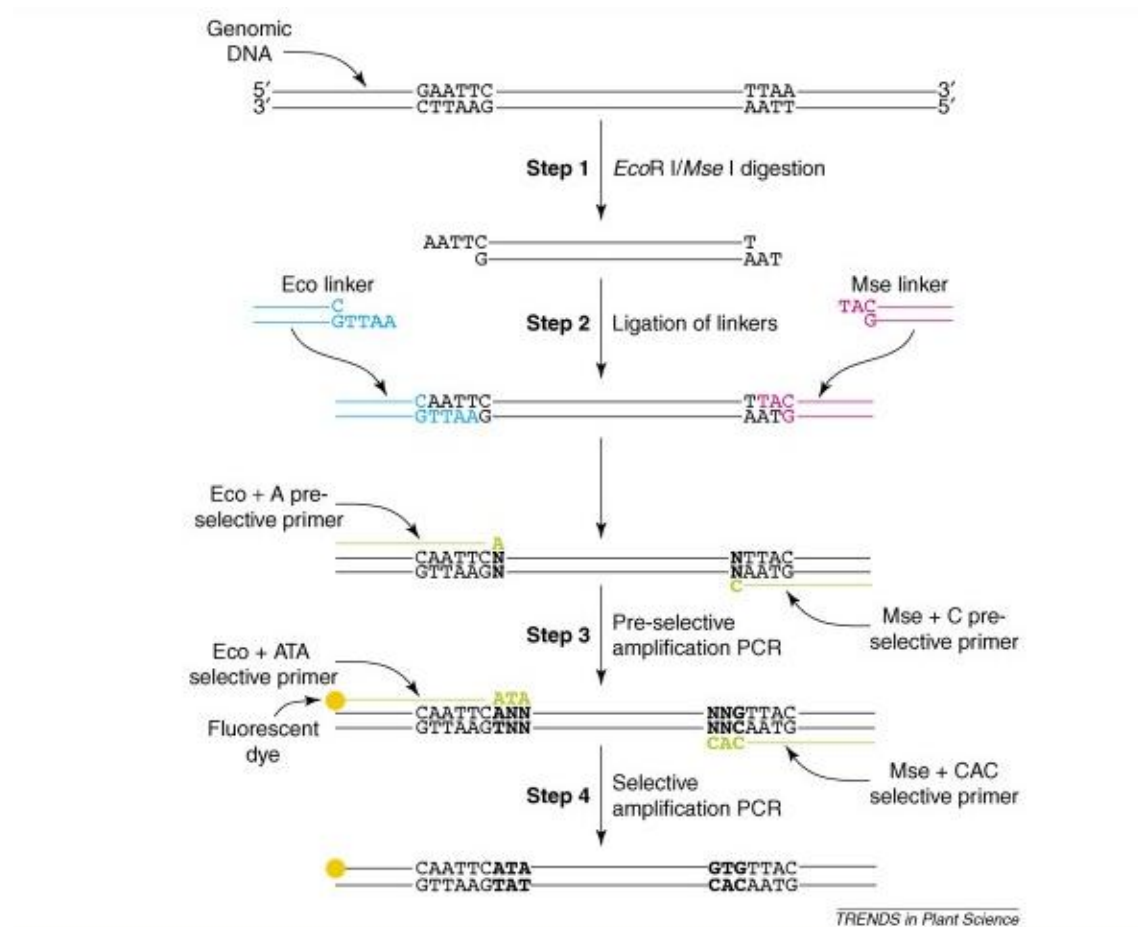
V prvním kroku dochází k restrikci, což je nastříhání úseku genomové DNA pomocí dvou restrikčních enzymů: EcoRI, jenž rozeznává sekvenci GAATTC, a MseI rozeznávající sekvenci AATT. Po působení těchto enzymů se vytvoří tři typy DNA fragmentů: Eco-Eco, Eco-Mse a Mse-Mse, jež jsou zakončeny tzv. lepivými konci (Meudt & Clarke 2007). Dalším krokem je tzv. ligace, při které synteticky vyrobené krátké fragmenty DNA zvané adaptory nasedají k lepivým koncům genomové DNA po restrikci (Bensch & Åkesson 2005). Adaptor je vytvořen tak, aby ligace fragmentu na adaptor znemožnila další působení restrikčních enzymů. Koncová sekvence adaptoru obsahuje jak část zbývající restrikční sekvence, tak vlastní adaptorovou sekvenci, která umožní vazbu s PCR- primerem. Restrikce a ligace mohou probíhat během jedné reakce (Mueller & Wolfenbarger 1999).

Třetím krokem je preamplifikace, která představuje standardní PCR reakci se dvěma primery, jež jsou svými 5' konci komplementární k sekvenci adaptorů (Weising et al. 2005). Na 3' konci jsou tyto primery zakončeny jedním nukleotidem, který zasahuje do vnitřní strany amplifikovaných fragmentů DNA. To způsobí selekci asi ¼ ligovaných fragmentů a také výraznou redukci fragmentů, které se vyskytují v ligační směsi (Savelkoul et al. 1999).

Protože je však v preamplifikátu stále velké množství fragmentů, je pro objektivní hodnocení potřeba další redukce těchto fragmentů. Pro selektivní amplifikaci se používají primery, které mají na svém 3' konci přidané další dva selektivní nukleotidy (například Eco + ATA a Mse + CAC), což umožní další redukci amplifikovaných fragmentů. Typ a počet selektivních nukleotidů se volí na základě velikosti a komplexity genomu, přičemž s rostoucím genomem by měl růst také počet selektivních primerů. Důležité je také prvotní testování primerových

kombinací, přičemž se vybírají ty kombinace, u nichž je po separaci získán dobře detekovatelný profil (Meudt & Clarke 2007).

Posledním krokem je gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu po předchozí denaturaci jednovláknových fragmentů DNA, tj. amplifikátu (Vos et al. 1995). K detekci amplifikovaných fragmentů se používá velké množství technik, například značení radioizotopy, či barvení fluorescenčními barvivy (Weising et al. 2005). K velice citlivým metodám patří i detekce barvení stříbrem, jejíž výhodou je hlavně nízká náročnost na přístrojové vybavení a relativně nízká cena (Vos et al. 1995).



Obrázek 2: Princip AFLP (Meudt & Clarke 2007)

Vzhledem k nízké komplexitě získané směsi a vysoké přesnosti určení délky fragmentů pomocí elektroforézy je velmi pravděpodobné, že přítomnost dvou identických fragmentů ve vzorcích DNA, které pocházejí ze dvou druhů, bude odrazet existenci stejné dvojice restrikčních míst u obou druhů. Následně pak můžeme vypočítat

pravděpodobnost genetické vzdálenosti mezi dvojicemi studovaných druhů na základě podílu shodných fragmentů (Flegr 2009).

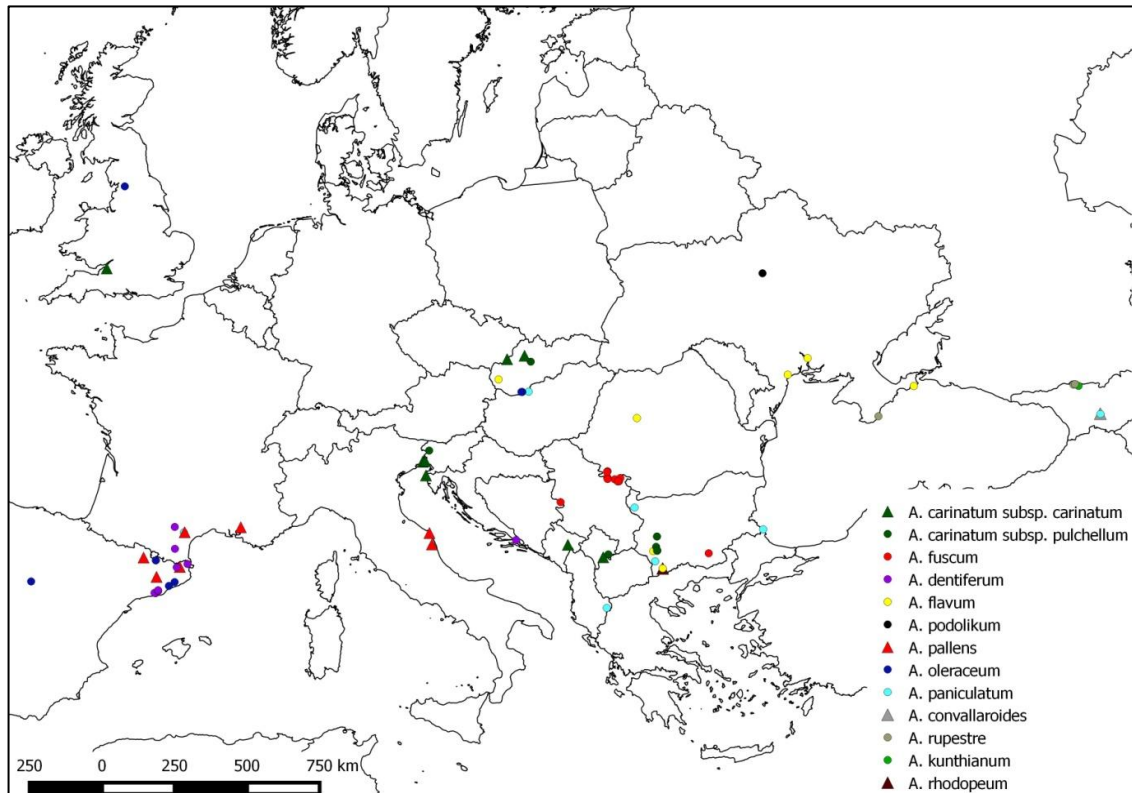
Mezi výhody metody AFLP patří její schopnost najednou zpracovat velké množství vzorků, dále její vysoká spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků a v neposlední řadě i schopnost získat velké množství dat (Flegr 2009). Výhodou je i její multilokusový charakter a možnost použití různě uchovávaného rostlinného materiálu, ať už čerstvých částí rostlin, uchovávaných v chladu (pod  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), či sušených (herbářových položek), nebo materiálů uchovávaných chemicky (v roztoku NaCl a CTAB) (Flegr 2009, Weising et al. 2005). Na druhou stranu má AFLP také řadu omezení v podobě limitovaného stupně studovaného polymorfismu (zvláště u některých kultivarů) (Weising et al. 2005), nebo nezbytného použití dostatečně purifikované, kvalitní genomové DNA v dostatečném množství, která byla získána jednou extrakční metodou (Meudt & Clarke 2007). Úskalím této metody je i tzv. homoplazie, která označuje stav, kdy neidentifické fragmenty stejné délky během elektroforetické separace komigrují, i když pochází z různých lokusů genomu. Tyto fragmenty jsou následně při hodnocení považovány za identické (Paris et al. 2010). Velký vliv má také osoba, která výsledný gel vyhodnocuje, což Paris et al. (2010) označují jako tzv. technickou homoplazii. Nevýhodou může být i cena a časová náročnost této metody spolu s výběrem vhodných primerů.

Metoda AFLP se tedy nejlépe hodí pro vnitrodruhové studie (Barret & Kidwell 1998) či pro studie fylogeneze blízké příbuzných druhů (Paul et al. 1997, Barret & Kidwell 1998, Mace et al. 1999). Stala se i výkonnou technikou k identifikaci odrůd (Powell et al. 1996) a využití nachází rovněž při genetickém mapování (Zhang et al. 2010, Xie et al. 2012, De Vos et al. 2013).

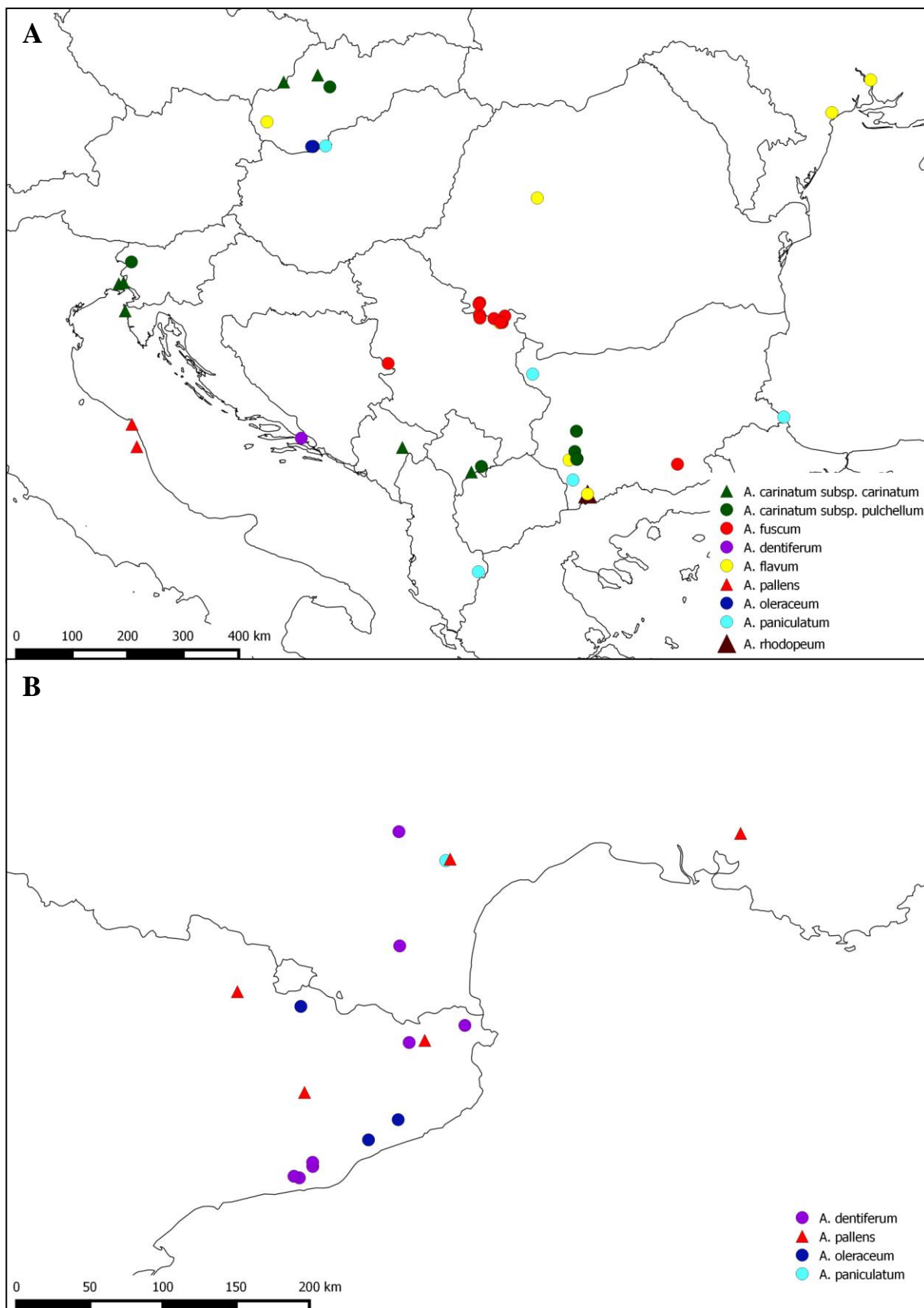
## 4 METODIKA

### 4.1 Rostlinný materiál

V tomto výzkumu bylo studováno 217 rostlin pocházejících z 89 populací (rozmístění lokalit viz obrázek 3 a 4), které reprezentují blízké příbuzné druhy z rodu *Allium* sec. *Codonoprasum*. Jako outgroup byly použity rostliny druhu *Allium ampeloprasum* L. ze sec. *Allium* a rostliny druhu *Allium roseum* L. ze sec. *Molium*. Rostliny byly přivezeny z přirozených oblastí výskytu a následně kultivovány na experimentálním pozemku Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Přehled studovaných druhů ze sec. *Codonoprasum* i druhů kontrolních rostlin rodu *Allium* sec. *Allium* a *Molium* s místem původu a stupněm ploidie je uveden v tabulce 1. Pro studium genotypové variability byl z každé rostliny odebrán list o hmotnosti asi 100 mg, který nevykazoval žádné známky poškození či napadení patogenem. Z odebraného rostlinného materiálu byla vyizolována DNA buď již v čerstvém stavu, nebo byl vzorek před zpracováním uchován v chladu po šokovém ochlazení tekutým dusíkem v hluboko mrazicím boxu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Obrázek 3: Mapa Evropy s vyznačenými lokalitami populací jednotlivých druhů rodu *Allium* sekce *Codonoprasum*, ze kterých byly odebírány vzorky pro studium genetické variability. (Vytvořeno v programu QGIS.)



Obrázek 4: Detail mapy Evropy v oblasti A) Balkánského poloostrova, B) na hranici Španělska a Francie znázorňující lokality populací rodu *Allium* sekce *Codonoprasum*, v nichž byly odebrány vzorky použité v tomto studiu. (Vytvořeno v programu QGIS.)

Tabulka 1: Seznam studovaných druhů rostlin rodu *Allium* sec. *Codonoprasum* a kontrolních rostlin z rodu *Allium* sec. *Allium* a sec. *Molium* (u druhů se symbolem „\*“ byla pomocí průtokové cytometrie změřena velikost genomu, stupeň ploidie však zatím nebyl určen)

Druh	Stát	Číslo populace	Počet studovaných jedinců	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Ploidie populace
<i>Allium carinatum</i> subsp. <i>carinatum</i>	Anglie	1	3	51.46406222	-2.625779167	3
	Česká republika	2	2	48.9385	17.80047222	3
	Černá Hora	3	3	42.76111111	19.55416667	2;3
	Chorvatsko	4	3	45.40233333	13.53411111	3
	Itálie	5	3	45.84924722	13.41436667	3
		6	3	45.86708333	13.53016667	3
	Kosovo	7	6	42.20308333	20.98977778	3
	Slovensko	8	2	48.98761111	18.67133333	3
<i>Allium carinatum</i> subsp. <i>pulchellum</i>	Bulharsko	9	3	42.57438889	23.42886111	2
		10	3	42.25213889	23.31038889	2
		11	4	42.12819444	23.33266667	2
		12	5	42.11858333	23.32394444	2
		13	2	42.12636111	23.32094444	2
	Kosovo	14	2	42.26880556	21.22622222	2
	Slovensko	15	3	48.77180556	18.93711111	2
	Slovinsko	16	2	46.19819444	13.74013889	2
<i>Allium convallarioides</i> Grossh.	Gruzie	17	3	41.83508333	43.26561111	2



Tabulka 1 pokračování

Druh	Stát	Číslo populace	Počet studovaných jedinců	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Ploidie populace
<i>Allium dentiferum</i> Webb & Berthel.	Francie	18	3	43.50530556	2.319388889	5
		19	3	42.80391667	2.427305556	5;6
	Chorvatsko	20	3	43.106	17.33733333	5
	Španělsko	21	3	41.31147222	1.808444444	5
		22	3	41.31755556	1.763083333	*
		23	2	41.39088889	1.906916667	*
		24	1	41.41591667	1.902166667	5
		25	3	42.21611111	2.588833333	5
		26	1	42.35536111	3.0365	5
<i>Allium flavum</i> L.	Bulharsko	27	3	42.13233333	23.15402778	2
		28	2	42.57438889	23.42886111	3
	Rumunsko	29	3	44.545	22.15	2
		30	3	46.44838889	23.53461111	2
		31	3	44.63872222	22.29408333	2
	Slovensko	32	3	48.31805556	17.28166667	2
<i>Allium flavum</i> subsp. <i>tauricum</i>	Bulharsko	33	6	41.52869444	23.41583333	2
	Ukrajina	34	3	46.67397222	30.87644444	3
		35	1	45.03913889	36.22158333	*
		36	1	47	32	3
<i>Allium kunthianum</i> Vved.	Gruzie	37	3	42.94775	42.95416667	2

Tabulka 1 pokračování

Druh	Stát	Číslo populace	Počet studovaných jedinců	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Ploidie populace
<i>Allium oleraceum</i> L.	Anglie	38	1	54.16666667	-2.433333333	5
	Chorvatsko	39	1	45.45666667	18.04111111	5
	Itálie	40	1	40.82638889	14.37555556	5
	Maďarsko	41	1	48.05055556	20.2341667	3
	Rakousko	42	1	47.99472222	16.0458333	4
	Rumunsko	43	1	44.66527778	21.7072222	5
		44	1	44.90341667	21.7486667	5
		45	2	44.69633333	21.7200556	3;5
		46	2	44.54831889	22.1725111	5
		47	3	44.91542222	21.7611111	5
	Slovensko	48	3	47.83816	18.31277	5
		49	3	47.83611111	18.34833333	5
	Slovinsko	50	1	45.96069444	13.68355556	4
		51	1	46.46727778	13.95318889	4
	Španělsko	52	3	41.09299444	-3.463183333	8
		53	3	41.59166667	2.338055556	4
		54	1	41.64927778	2.505194444	5
		55	3	41.73491667	2.563527778	4;5
		56	3	42.36519444	1.659944444	4
	Švédsko	57	1	58.47444444	14.96944444	5

Tabulka 1 pokračování

Druh	Stát	Číslo populace	Počet studovaných jedinců	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Ploidie populace
<i>Allium oleraceum</i> L. (pokračování předchozí tabulky)	Ukrajina	58	1	50.95602778	30.88038889	3
<i>Allium pallens</i> L.	Francie	59	3	43.67638889	5.224444444	4
		60	1	43.36886111	2.777083333	4
	Itálie	61	2	43.54033333	13.56258333	5
		62	3	43.16961111	13.64794444	4
	Španělsko	63	3	42.23905556	2.716222222	*
		64	3	41.83988889	1.771472222	4
65		3	42.40930833	1.120130556	4	
<i>Allium paniculatum</i> L.	Bulharsko	66	1	43.62336111	22.693944444	2
		67	2	42.069875	27.96803333	4
		68	3	41.79791667	23.15827778	*
	Francie	69	3	43.35747222	2.741083333	4
	Gruzie	70	2	41.82261111	43.26488889	*
	Slovensko	71	3	47.83527778	18.35083333	2
		72	3	47.83611111	18.34833333	2
		73	1	47.82083333	18.65583333	2
Španělsko	74	3	42.36519444	1.659944444	4	
<i>Allium fuscum</i> Waldst. et Kit.	Rumunsko	75	3	44.7032	21.72880833	2
		76	7	44.72977778	21.72055556	2

Tabulka 1 pokračování

Druh	Stát	Číslo populace	Počet studovaných jedinců	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Ploidie populace
<i>Allium fuscum</i> Waldst. et Kit. (pokračování předchozí tabulky)	Rumunsko	77	2	44.92277778	21.77386111	2
		78	2	44.63872222	22.29408333	2
		79	1	44.54831389	22.17251111	2
		80	3	44.54238889	22.21097222	2;4
		81	2	44.674166667	21.72055556	2
		82	1	44.62841667	22.03719444	2
	Srbsko	83	3	44.15709722	19.483576389	2
Bulharsko	84	3	41.71572222	25.46491667	2	
<i>Allium podolicum</i> Blocki ex Racib. & Szafer	Ukrajina	85	1	50.04072222	31.11830556	2
<i>Allium rupestre</i> Steven.	Gruzie	86	3	43.05561111	42.77927778	2
		87	2	43.04941667	42.85122222	2
	Ukrajina	88	1	44.50816667	34.25197222	2;3
<i>Allium rhodopeum</i> Velen.	Bulharsko	89	2	41.52869444	23.41583333	2
<i>Allium ampeloprasum</i> L.	Francie	90	2	43.383277778	6.5883888889	4
		91	2	43.476583333	6.9290277778	4
<i>Allium roseum</i> L.	Itálie	92	4	43.400555556	10.855	6

## 4.2 Izolace genomické DNA

Izolace genomické DNA byla provedena dle mírně modifikovaného CTAB protokolu Doyle & Doyle 1987.

1. Do 2 ml Eppendorf mikrozkušavek byl připraven extrakční pufr smícháním 700  $\mu$ l 2% CTAB 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  $\mu$ l merkptoethanolu. Mikrozkušavky s připraveným roztokem byly předehřáty na třepačce (65 °C).
2. Asi 200 mg zmražených či živých listů bylo homogenizováno v tekutém dusíku a následně přeneseno do extrakčního pufru na třepačce (65 °C), kde byly vzorky inkubovány 1-2 hodiny.
3. Následně bylo přidáno 700  $\mu$ l směsi chloroformu a isoamylalkoholu (24:1), vzorky byly intenzivně protřepány a 15 minut centrifugovány v předchlazené centrifuze (10 °C, 13 000 rpm).
4. Horní fáze z mikrozkušavek (cca 500  $\mu$ l) byla opatrně přenesena do nových mikrozkušavek s 500  $\mu$ l směsi chloroformu a isoamylalkoholu (24:1). Směs byla opět intenzivně protřepána a 15 minut centrifugována (10 °C, 13 000 rpm).
5. Horní fáze z mikrozkušavek (cca 400  $\mu$ l) byla přenesena do stejného objemu vychlazeného isopropanolu, směs byla lehce promíchána a precipitována při 4 °C alespoň 30 minut.
6. Po precipitaci v mikrozkušavkách byla provedena centrifugace po dobu 15 minut (4 °C, 13 000 rpm). Supernatant byl opatrně vylit tak, aby sediment zůstal v mikrozkušavce. Po mírném oschnutí sedimentu k němu bylo přidáno 200  $\mu$ l 10 $\times$  TE pufru, ve kterém byl sediment ponechán na rozpuštění přes noc (4 °C).
7. Pro odstranění RNA bylo do každého vzorku přidáno 5  $\mu$ l RNasy (5  $\mu$ g/ml). Roztok byl inkubován po dobu 30 minut při 37 °C na třepačce.
8. Po 30 minutách bylo do vzorků přidáno 20  $\mu$ l vychlazeného NaAc (acetát sodný) a dvojnásobek objemu (tj. 440  $\mu$ l) vychlazeného 96% ethanolu. Vzorky byly precipitovány alespoň 30 minut při 4 °C.
9. Po 30 minutách byla provedena centrifugace (4 °C, 15 minut, 13 000 rpm). Supernatant byl po centrifugaci opatrně vylit a pelet byl promyt 80% ethanolem a centrifugován po dobu 10 minut (10 °C, 13 000 rpm).
10. Supernatant byl opatrně vylit a pelet byl promyt 70% ethanolem a centrifugován po dobu 10 min (10 °C, 13 000 rpm).

11. Po opatrném slití supernatantu byl pelet ponechán k oschnutí a poté byl vysušen na termobloku při 39 °C po dobu cca 45 minut. Aby nemohly být vzorky během vysoušení kontaminovány, byly překryty jednotlivé mikrozkuhavky parafilmem. Vysušený pelet byl nakonec rozpuštěn v 70  $\mu$ l 1 $\times$  TE.

### 4.3 Měření koncentrace DNA

Měření bylo provedeno na spektrofotometru NanoDrop Thermo ND – 1000, na který byly nanášeny 2  $\mu$ l vzorku rozpuštěného v 1 $\times$  TE pufru. Před měřením bylo nutné vzorky důkladně promíchat a provést blank NanoDropu 1 $\times$  TE puftrem. Koncentrace a čistota vzorků byla stanovena na základě změřené absorbance při 260 a 280 nm, přičemž poměr hodnot absorbance při 260 a 280 nm od 1,8 do 2,0 představuje čistou nukleovou kyselinu. Pokud byl vypočtený poměr menší než 1,8, znamenalo to, že byla daná DNA kontaminována proteiny. Naopak výsledek větší než 2,0 znamenal kontaminaci organickými látkami (například chloroformem).

Studované vzorky byly ve většině případů v rozmezí hodnot od 1,8 do 2,0. Ostatní vzorky, které lehce přesahovaly dané rozmezí (do dvou desetín) byly pro AFLP rovněž použity. Vyřazeny byly pouze ty vzorky, jejichž izolací genomové DNA nebyla získána dostatečná koncentrace DNA, tj. alespoň 30 ng/ $\mu$ l.

### 4.4 Gelová elektroforéza

Pro stanovení kvality vyizolované DNA byla použita metoda separace vzorků na 1,5% agarózovém gelu. Tato metoda umožnila jak detekci kontaminace RNA, tak odhad koncentrace a čistoty DNA v daném vzorku.

1. 1,5% agarózový gel byl připraven v 0,5 $\times$  TBE pufru. Tato suspenze byla rozvařena v mikrovlnné troubě tak, aby vznikl čirý roztok.
2. Po zchladnutí roztoku agarózy bylo přidáno 5  $\mu$ l interkalačního činidla GelRed a takto vzniklý roztok byl nalit do elektroforetické vaničky, kam byl také zasunut hřebínek. Gel tuhl po dobu asi 30 minut.
3. Po zatuhnutí gelu byl hřebínek opatrně vytažen a vanička byla vložena do elektroforézy naplněné 0,5 $\times$  TBE puftrem tím způsobem, aby pufr překrýval ztuhlý gel o 2-3 mm a aby byly jamky uspořádány od katody k anodě.

4. 3  $\mu\text{l}$  vzorku byly pomocí pipety smíchány s nanášecím pufrem „Loading Dye“ a napipetovány do jamek. Na začátek každé řady byly naneseny 2  $\mu\text{l}$  ladderu smíchaného s tímto barvivem.
5. Byl zapnut elektrický zdroj na 100 V po dobu 30 minut.
6. Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut a vložen do komory, kde byla provedena fotografická dokumentace gelu pomocí digitálního fotoaparátu, neboť komplex interkalačního barviva s DNA po působení UV záření v komoře způsobuje světélkování a tím i zvýraznění separované DNA.

## 4.5 AFLP

Pro analýzu pomocí AFLP musely být všechny vzorky DNA naředěny sterilní destilovanou vodou na jednotnou koncentraci 30 ng/ $\mu\text{l}$ . Celkem bylo pracováno s 36 stripy, které odpovídaly 217 vzorkům genomové DNA studovaných rostlin rodu *Allium* sec. *Codonoprasum* a 8 vzorkům genomové DNA kontrolních rostlin z rodu *Allium* sec. *Allium* a sec. *Molium*. Pro amplifikaci byly použity celkem tři primerové kombinace. Celkový přehled použitých adaptérů a primerů a jejich sekvencí je uveden v tabulce 2 v kapitole 5 Výsledky.

### 4.5.1 Restrikce

Nejdříve byl ve flowboxu připraven do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky mix, jenž byl následně rozdělen do jednotlivých PCR zkumavek (stripů), do kterých byly nakonec napipetovány i jednotlivé zředěné vzorky DNA. Jak s mixem, tak s jednotlivými činidly a stripy bylo neustále pracováno na ledu. K restrikci byly použity enzymy: EcoRI (štípe sekvenci DNA v pozici G<sup>A</sup>AATTC) a MseI (štípe sekvenci DNA v pozici T<sup>A</sup>TAA). Následující hodnoty udávají jednotlivé složky mixu pro jeden vzorek:

Destilovaná voda	12,790 $\mu\text{l}$
EcoRI BUFF	2,000 $\mu\text{l}$
EcoRI (enzym)	0,063 $\mu\text{l}$
MseI (enzym)	0,125 $\mu\text{l}$

Celkový objem pro pipetování PCR mixu:	15 $\mu\text{l}$
Přidaná DNA (koncentrace 30 ng/ $\mu\text{l}$ ):	5,0 $\mu\text{l}$
Celkový objem v jedné PCR zkumavce:	20 $\mu\text{l}$

PCR stripy byly promíchány poklepnutím prstem na strip a krátce zcentrifugovány na stolní centrifuze. Dále byla směs inkubována v cycleru (Thermocycler TG- XP Bioer) při 37 °C po dobu 2,5 hodiny. Asi 15 minut před ukončením inkubace byl připraven mix pro ligaci. Po inkubaci byly PCR stripy krátce zcentrifugovány na stolní centrifuze a umístěny na led.

#### 4.5.2 Ligace

S mixem, činidly a stripy bylo nutno pracovat opět na ledu a ve flowboxu. Do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky byl připraven mix o uvedeném složení, který byl přidán ke vzorkům po restrikci (množství je uvedeno pro jeden vzorek):

Destilovaná voda	3,00 $\mu$ l
LIGASE BUFF	0,50 $\mu$ l
EcoRI adapter (koncentrace 5 $\mu$ M)	0,50 $\mu$ l
MseI adapter (koncentrace 5 $\mu$ M)	0,50 $\mu$ l
LIGASE (enzym)	0,50 $\mu$ l

Celkový objem pro pipetování PCR mixu: 5  $\mu$ l, které byly přidány ke vzorku po restrikci

PCR stripy byly promíchány, krátce zcentrifugovány na stolní centrifuze a inkubovány v cycleru při 37 °C po dobu 3 hodin. Po ukončení inkubace byly stripy opět krátce zcentrifugovány a umístěny na led.

#### 4.5.3 Preamplifikace

Do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky byl ve flowboxu napipetován mix, který byl následně rozdělen do sterilních PCR stripů. Opět byla potřeba pracovat neustále na ledu. (množství uvedeno na jeden vzorek):

Destilovaná voda	11,850 $\mu$ l
Buffer (5 $\times$ )	4,500 $\mu$ l
dNTP	0,500 $\mu$ l
EcoA*primer (koncentrace 75 ng/ $\mu$ l)	0,500 $\mu$ l
MseI*primer (koncentrace 75 ng/ $\mu$ l)	0,500 $\mu$ l
goTaq polymeráza (5 U/ $\mu$ l)	0,150 $\mu$ l



Celkový objem mixu pro pipetování:	18 $\mu$ l
Přidaná DNA po ligaci:	2,0 $\mu$ l
Celkový objem v jedné PCR zkumavce:	20 $\mu$ l

Po napipetování byly stripy krátce promíchány, zcentrifugovány na stolní centrifuze a umístěny do cycleru, kde procházely následujícím programem:

1×	94 °C/ 3 min
20×	94 °C/ 30 s
	56 °C/ 1 min
	72 °C/ 1 min 45 s
1×	72 °C/ 5 min
	4 °C/ neomezeně

Po ukončení preamplifikace byly stripy opět krátce zcentrifugovány a umístěny na led. Preamplifikát byl následně 7× zředěn (5  $\mu$ l preamplifikátu + 30  $\mu$ l sterilní destilované vody). Zbytek nenařaděných vzorků byl uchován při teplotě -20 °C pro případné opakování.

#### 4.5.4 Amplifikace

Jako matrice byl použit 7× naředěný preamplifikát. Ve sterilní 1,5 ml mikrozkuhavce byl ve flowboxu připraven mix pro odpovídající počet vzorků, který byl následně napipetován do jednotlivých PCR stripů. Všechna činidla i vzorky musely být opět uchovávány na ledu. Množství je uvedeno na jeden vzorek:

Destilovaná voda	3,74 $\mu$ l
Buffer (5×)	2,00 $\mu$ l
dNTP (orig.)	0,20 $\mu$ l
EcoA primer (koncentrace 15 ng/ $\mu$ l)	1,00 $\mu$ l
MseI primer (koncentrace 15 ng/ $\mu$ l)	1,00 $\mu$ l
goTaq polymeráza (5 U/ $\mu$ l)	0,06 $\mu$ l

Celkový objem PCR mixu:	8 $\mu$ l
Přidaný 7× zředěný preamplifikát:	2,00 $\mu$ l
Celkový objem pro pipetování:	10,00 $\mu$ l

Jednotlivé stripy byly promíchány, krátce zcentrifugovány na stolní centrifuze a umístěny do cycleru, v němž procházely daným programem:

- 1× 94 °C/ 3 min 30 s
- 16× 94 °C/ 30 s
- 60,1 °C/ 30 s
- 72 °C/ 1 min
- 1× 94 °C/ 30 s
- 56 °C/ 30 s
- 72 °C/ 1 min
- 4 °C/ neomezeně

Po ukončení amplifikačního programu (dosažení kroku 4 °C/ neomezeně) v cyklu byly jednotlivé stripy krátce zcentrifugovány na stolní centrifuze a umístěny na led. Před další manipulací byly vzorky uchovány při teplotě -20 °C.

#### **4.5.5 Separace a detekce AFLP PCR produktů**

Nejdříve byla důkladně umyta a osušena obě skla, spacery a hřebeny. Svrchní menší sklo (které nemělo přilnout ke gelu) bylo omyto vodou a ethanolem a papírovými utěrkami bylo vytřeno do sucha. Na toto sklo bylo následně naneseno 0,5 ml repelentu na odpuzování vody, jenž byl dobře rozetřen, ponechán cca 5 minut působit a následně umyt destilovanou vodou a ethanolem. Spodní větší sklo bylo očištěno vodou se saponátem, na opláchnutí byla použita destilovaná voda a sklo bylo papírovými utěrkami vytřeno do sucha. Následně na něj byly v digestoři naneseny dvakrát 3 µl silanu, který zajišťuje přilnutí gelu na sklo, a 1 ml roztoku kyseliny octové a ethanolu (0,5% kyselina octová v 96% ethanolu), vše bylo ponecháno 5 minut působit a poté bylo sklo čtyřikrát setřeno 50% ethanolem.

V digestoři byly položeny na ošetřené spodní sklo k delším okrajům spacery, na které bylo položeno svrchní sklo stranou ošetřenou repelentem dolů, a obě skla byla pomocí svorek spojena. V kádince bylo smícháno 70 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu (420 g močoviny; 484 ml deionizované destilované vody; 50 ml 10× TBE; 150 ml 40% roztok akrylamidu), 46,7 µl N, N, N', N'-tetramethylethylendiamidu a 467 µl 10% roztoku peroxodisíranuamonného. Tento roztok byl následně pomocí stříkačky

nanášen mezi připravená skla tak, aby vznikla 0,4 mm silná vrstva polyakrylamidového gelu bez bublin. Gel byl takto nanesen až k okraji svrchního skla. Nakonec byl mezi skla zasunut hřeben (zuby směrem ven) a to asi 5 mm hluboko. Obě skla byla na kratších stranách spojena klipsy a gel byl ponechán minimálně 1 hodinu tuhnout.

Po ztuhnutí gelu byl vytažen hřeben, skla včetně prostoru po vytaženém hřebenu byla důkladně umyta pod proudem vody, osušena a vložena do elektroforetického stojanu T-REX Thermo, kde byla uchycena svorkami. Do stojanu se sklem byl jak do horní, tak i do dolní vany nalit 0,5× TE pufr, kterým byl rovněž pomocí stříkačky pročištěn prostor po vytaženém hřebenu, čímž byly odstaněny zbytky močoviny. Zapojením zdroje po dobu cca 45 minut byl gel předehřán na teplotu cca 55 °C. Po předehřátí byl zdroj odpojen a do gelu byl zasunut hřeben tak, aby vytvořil v gelu jamky pro nanášení vzorků.

Ke vzorkům umístěným na ledu bylo napipetováno 5 µl denaturačního pufru (formamid a loading dye 9:1), před nanášením na gel byly vzorky denaturovány 3 minuty při teplotě 95 °C. Po denuraci byly vzorky zchlazeny na ledu. Následně byly do jamek napipetovány 2 µl jednotlivých vzorků a aparatura byla připojena ke zdroji napětí na 2000 V po dobu cca 1,5 hodiny.

Po ukončení elektroforézy byl zdroj elektrického proudu vypnut, byly odpojeny obě elektrody a na zadní straně byl připojen ventil, pomocí něhož odtekl pufr z horní části elektroforézy do sběrné nádoby. Poté byla vyňata skla, z nichž byl vyndán hřeben, spacers a nakonec byla od sebe za pomoci nože obě skla oddělena.

## **Vyvolání**

Na vyvolání byly připraveny tyto roztoky:

- Vývojka (před použitím byla uchována při teplotě 4 °C) – 45 g uhlíčitanu sodného  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bylo doplněno destilovanou vodou na objem 1500 ml; těsně před použitím byly k roztoku přidány 2,25 ml formaldehydu a 300 µl 1% roztoku thiosíranu sodného  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- FIX STOP roztok – 165 ml 98% kyseliny octové bylo doplněno destilovanou vodou na objem 1500 ml
- 1% roztok kyseliny dusičné  $\text{HNO}_3$  – 22,5 ml 65% kyseliny dusičné  $\text{HNO}_3$  bylo doplněno destilovanou vodou na objem 1500 ml

- 0,1% roztok dusičnanu stříbrného  $\text{AgNO}_3$  – 2 g dusičnanu stříbrného  $\text{AgNO}_3$  bylo doplněno destilovanou vodou na objem 2000 ml; těsně před použitím byly přidány 3 ml formaldehydu

Spodní (velké) sklo s gelem bylo přemístěno do lodny umístěné na třepačce gelem nahoru a bylo zalito FIX/STOP roztokem. Zde bylo ponecháno po dobu 20 minut. Po uplynutí 20 minut bylo sklo 3× promyto v lodně s destilovanou vodou a FIX/STOP roztok byl slit zpět do kádinky. Sklo bylo následně umístěno na 5 minut do 1% roztoku kyseliny dusičné, odkud bylo po uplynutí této doby opět vloženo na promytí (3×) do lodny s destilovanou vodou. Sklo s gelem bylo dále položeno na 30 minut do 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného.

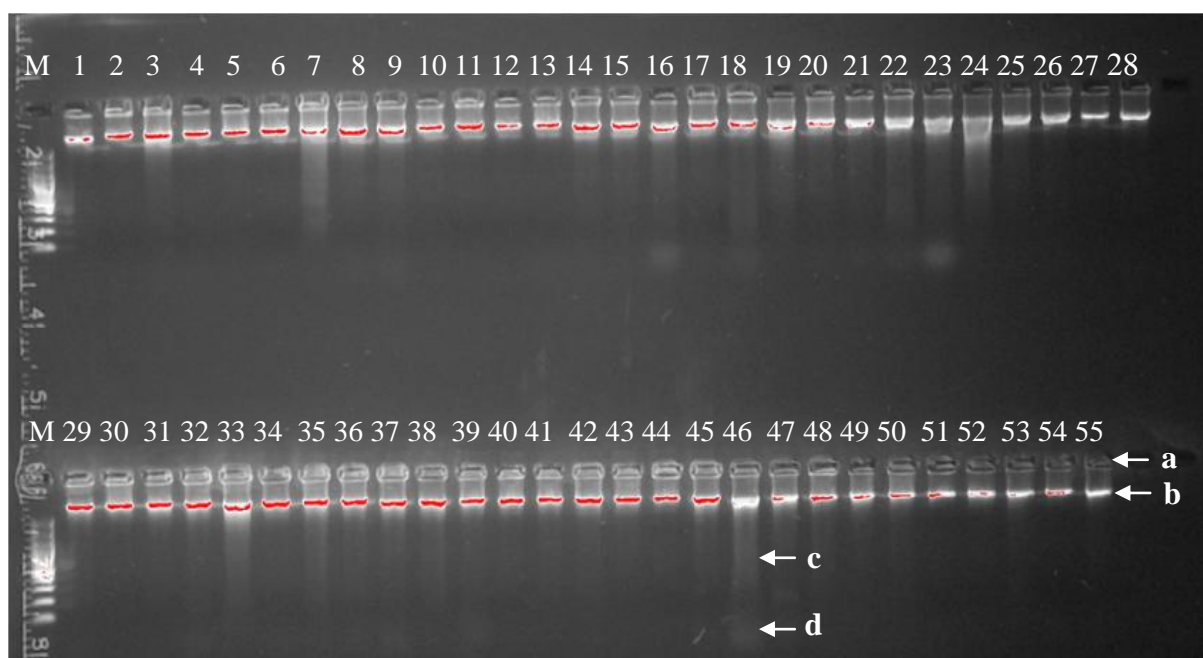
Byla připravena lodna s destilovanou vodou a nádoba s vychlazenou vývojkou. Sklo s gelem bylo ponecháno přesně 5 sekund v destilované vodě a následně bylo přemístěno do lodny na třepačce. Do vychlazené vývojky byl přidán formaldehyd a 1% roztok thiosíranu sodného a takto připravená vývojka byla nalita na sklo připravené v lodně na třepačce. Po dostatečném zabarvení bylo vyvíjení ukončeno nalitím FIX/STOP roztoku, jenž působil asi 2-3 minuty. Sklo bylo umístěno do destilované vody a nakonec do sušárny, kde bylo sušeno při teplotě 70 °C po dobu asi 1 hodiny.

#### **4.6 Vyhodnocování dat**

Následovalo vizuální vyhodnocení AFLP fragmentů jednotlivých primerových kombinací. Skla byla hodnocena na negatoskopu, kde byla hodnocena přítomnost a nepřítomnost bandů, přičemž bandy hodnocené jako přítomné musely vykazovat určitou sílu signálu, tj. musely být spolehlivě rozlišitelné a detekovatelné. Výsledky hodnocení všech primerových kombinací byly následně sjednoceny a převedeny do programu MS Excel v podobě binární matice (přítomnost bandu byla označena symbolem „1“, nepřítomnost symbolem „0“). Vytvořená matice bude následně analyzována statistickými programy – například GenA1Ex 6.5 a FigTree 1.3.1.

## 5 VÝSLEDKY

Celkem bylo CTAB metodou modifikovanou podle Doyle & Doyle 1987 izolováno 217 rostlin pocházejících z 89 populací rodu *Allium* sec. *Codonoprasum* a 8 vzorků blíže příbuzných druhů ze sec. *Allium* a sec. *Molium*. Celková výtěžnost DNA, která byla zjištěna měřením na nanodropu, se pohybovala v rozmezí 30 ng/μl – 1017,4 ng/μl. Kvalita vyizolované DNA, tj. míra kontaminace izolované DNA bílkovinami, RNA, či nízkomoekulárnými látkami (například fenol), byla ověřena na nanodropu. Výstupem elektroforézy byl pod UV zářením vyfocený černo-bílý elektroforetogram (obrázek 5) obsahující několik drah, po kterých putovaly podle své koncentrace jednotlivé vzorky. Na začátku každé řady byl použit marker (M), jenž představuje standart velikosti jednotlivých bandů (v použitém markeru představovaly úseky jednotlivých fragmentů 100 bp). V ostatních sloupcích jsou pak patrné bandy jednotlivých vzorků, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA.



Obrázek 5: Příklad elektroforetogramu znázorňujícího kvalitu DNA po izolaci (M – marker: DNA Ladder (100 bp); 1-55 – vzorky DNA; a – start, jamky, do nichž byla napipetována DNA; b – vyizolovaná DNA; c – degradovaná DNA; d – kontaminace RNA)

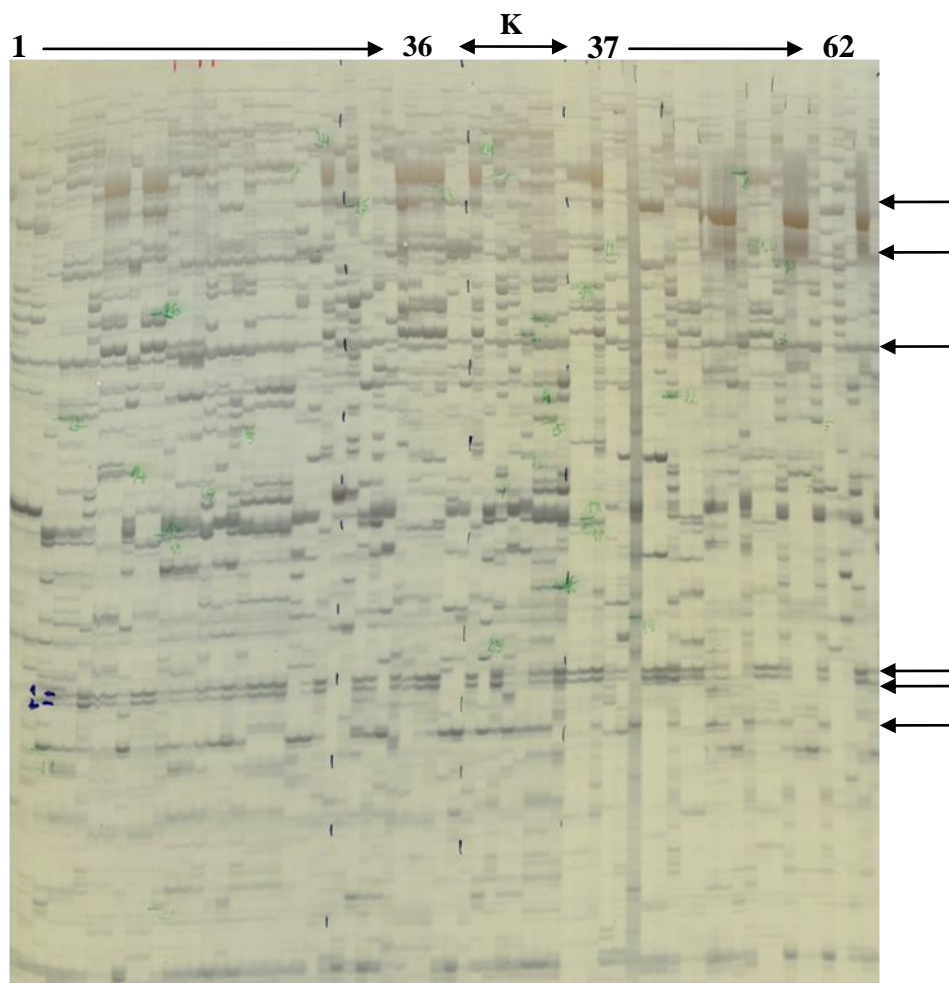
Na všech těchto vzorcích byla následně provedena restrikce, ligace a preamplifikace, přičemž byly produkty preamplifikace sedminásobně zředěny. Následně byl proveden výběr vhodných primerových kombinací pro amplifikaci tak, aby byly výsledné bandy na akrylamidovém gelu polymorfní, tj. aby vykazovaly určitou variabilitu, a dobře

detekovatelné, čili aby měly určitou sílu signálu a aby je bylo možné z výsledného gelu správně odečíst. Zředěné produkty preamplifikace byly poté amplifikovány s třemi vybranými selektivními primerovými kombinacemi (E71- M9311; E1- M643 a E2- M9311) (celkový přehled použitých adaptérů, primerů a jejich sekvencí viz tabulka 2). Po amplifikaci byly jednotlivé vzorky nanášeny na polymerovaný akrylamidový gel, na kterém byly elektroforeticky separovány. Na každý gel byly naneseny kromě jednotlivých studovaných vzorků i vzorky z tzv. kontrolního stripu. Kontrolní strip, který obsahoval 8 vzorků různých druhů ze sec. *Codonoprasum* (*Allium dentiferum*, *Allium fuscum*, *Allium oleraceum* a *Allium carinatum* subsp. *carinatum*), umožnil detekovat stejné bandy u vzorků umístěných na různých polyakrylamidových gelech stejné primerové kombinace a ověřit tak správnost výsledků.

Metodě AFLP bylo tímto způsobem dosud podrobena 107 vzorků rostlin z 21 populací rodu *Allium* sec. *Codonoprasum* a 8 vzorků rostlin z blízce příbuzné sec. *Allium* a sec. *Molium*. Výsledné AFLP fragmenty byly po barvení stříbrem (obrázek 6) vizuálně zhodnoceny a podle přítomnosti (symbol „1“) či nepřítomnosti (symbol „0“) bandů převedeny v programu MS Excel do podoby binární matice (tabulka 3), přičemž změna v přítomnosti bandu značí polymorfismus. Tímto způsobem bylo pro každý genotyp rostliny zhodnoceno prozatím 66 detekovatelných bandů, které budou použity pro posouzení genotypové variability mezi studovanými druhy.

Tabulka 2: Celkový přehled použitých adaptérů a primerů a jejich sekvence

Fáze AFLP	Adapter/primer	Sekvence 5'→3'
Ligace	EcoRI adapter	E-L1: CTG GTA GAC TGC GTA CC
		E- L2: AAT TGG TAC GCA GTC TAC
	MseI adapter	M-L1: GAC GAT GAG TCC TGA G
		M-L2: TAC TCA GGA CTC AT
Preamplifikace	Eco A* primer	GAC TGC GTA CCA ATT CA
	MseI* primer	GAT GAG TCC TGA GTA AC
Amplifikace	EcoA primer	E71: GAC TGC GTA CCA ATT CAT CG
		E1: GAC TGC GTA CCA ATT CAG C
		E2: GAC TGC GTA CCA ATT CAG G
	MseI primer	M9311: GAT GAG TCC TGA GTA ACG ACG G
		M643: GAT GAG TCC TGA GTA ACA ATC



Obrázek 6: Ukázka výsledných AFLP fragmentů separovaných na polyakrylamidovém gelu barveném stříbrem (použitá primerová kombinace: E71- M9311). Příklady hodnocených polymorfních bandů jsou označeny šipkou. Každý sloupec odpovídá jinému vzorku DNA (K – kontrolní strip; 1 → 36, 37 → 62 – vzorky DNA).

Rovněž zbývající vzorky rostlin, které jsou zatím ve fázi preamplifikace, budou tímto způsobem zpracovány. Všechny vzorky budou také doplněny o další dvě primerové kombinace a budou podrobeny statistickému zpracování například v programech GenAIEx 6.5 a FigTree 1.

Tabulka 3: Příklad zpracování výsledků z polyakrylamidového gelu do binární matice pro primerovou kombinaci E71- M9311 pro stripy A1 a A2

Strip	A1								A2							
Pozice na stripu	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Identifikace vzorku	04/104 A	08/2 A	08/8 C	09/3 2	09/48/ 1	10/14 C	10/2B C	10/41 A	04/104 B	08/2 B	08/8 M	09/32 A	09/48/ 2	10/14 M	10/2B M	10/41 B
Číslo bandu																
1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
2	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
3	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
4	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1
5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
6	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
7	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0
8	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
9	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
10	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
11	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
12	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
13	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
14	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0
15	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1
16	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
17	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
18	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0
19	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0



## 6 DISKUZE

V této práci bylo studováno 14 druhů rodu *Allium* sec. *Codonoprasum* různého ploidního stupně, které pocházejí z různých geografických oblastí. Pro posouzení genotypové variability těchto druhů byla vybrána metoda AFLP, která se stala výkonnou a spolehlivou DNA fingerprintingovou metodou pro studium genomů jakéhokoliv původu či komplexity (Vos et al. 1995). Jako velice vhodná se ukázala být jak při vytváření fylogenetických závěrů ve skupinách organismů s nejasnými nebo komplikovanými fylogenetickými vztahy (García-Pereira et al. 2014, Wietsma et al. 2014), tak pro analyzování taxonů blízce příbuzných, či k identifikaci odrůd (Powell et al. 1996).

Pro posouzení genetické variability byla metoda AFLP úspěšně aplikována například při analýze vytrvalých, klonálně se rozmnožujících rostlin druhu *Maianthemum bifolium* (Arens et al. 2005, Honnay et al. 2006). Metoda AFLP byla zvolena zejména díky své extrémně vysoké citlivosti na drobné genetické rozdíly, která umožňuje detekovat genetické rozdíly i v populacích s klonálním rozmnožováním (Honnay et al. 2006). Na studium genetické inter- a intraspecifické diverzity vytrvalých jednoděložných rostlin byly testovány i metody RAPD či metoda allozymů (Nybom & Bartish 2000). Metoda RAPD však vykazovala signifikantní rozdíly jen u geograficky značně vzdálených populací s pohlavním rozmnožováním. Pro určení vnitropopulační variability rostlin s častým klonálním rozmnožováním se tak ukázala být málo účinná (Nybom & Bartish 2000). Naopak použití allozymů se na zjištění vnitropopulační variability rostlin ukázalo být vhodnější (Nybom & Bartish 2000), v porovnání s metodou AFLP však dokázalo rozeznat menší genetickou variabilitu (Honnay & Jacquemyn 2008).

Metoda AFLP byla úspěšná i při posuzování genetické variability mezi čtyřmi druhy tulipánů (*Tulipa biebersteiniana*, *Tulipa patens*, *Tulipa scytica* a *Tulipa riparia*), kde byl díky ní zjištěn genový tok mezi jednotlivými populacemi prostřednictvím pylových zrn, semen, ale také i dceřinými cibulemi (Kutlunina et al. 2013). Vhodnost metody AFLP ke studiu genetických vztahů potvrzují například i studie provedené na jílku (Roldán-Ruiz et al. 2000), sóje (Nimnual et al. 2014), nebo rozrazilu (Albach 2007). V rámci rodu *Allium* se metody AFLP využívá zejména ve velkém množství studií zabývajících se genetickou diverzitou klonů a kultivarů hospodářsky významného

druhu *Allium sativum* L. (García-Lampasona et al. 2003, Ipek et al. 2003, Volk et al. 2004, Lee et al. 2002) či *Allium porrum* L. (Smilde et al. 1999, Filjushin et al. 2011).

Pro svou schopnost detekovat vysokou míru polymorfismu a díky možnosti odečítat AFLP markery kodominantně je metoda AFLP hojně využívána i pro studium polyploidních komplexů (Meudt & Clarke 2007) a k identifikaci předků polyploidních druhů v místě a čase. Příkladem může být studie zabývající se evolucí polyploidie u evropského rodu *Dactylorhiza*, u něhož bylo použito několik typů molekulárních metod na odhalení předků jednotlivých, většinou tetraploidních, druhů tohoto rodu (Hedrén et al. 2001). Jednou z využitých metod bylo použití allozymů (Hedrén 1996, Pedersen 1998). Allozymové lokusy, i když poskytly určitý vhled do fylogeneze tohoto rodu, však nebyly dostatečně variabilní, aby dokázaly odhalit bližší vztahy mezi jednotlivými druhy, a proto byla použita metoda AFLP. Tato technika, vzhledem ke svému náhodně po celém jaderném genomu rozšířeným fragmentům, umožnila rozlišit variabilitu mezi jednotlivými genomy (Hedrén et al. 2001, 2007).

Dalším příkladem může být práce studující evoluci polyploidního rodu *Achillea*, ve které byly zjišťovány fylogenetické vztahy několika druhů tohoto rodu, přičemž by se měla genetická struktura hybridů a polyploidů shodovat se specifickými AFLP bandy jejich rodičů. Při porovnávání konkrétních AFLP fragmentů různých ploidních stupňů byly také jasně zřejmé známky vícenásobné hybridizace a polyploidie. Tímto způsobem byly studovány diploidní, tetraploidní a hexaploidní taxony, přičemž například bandy nepřítomné u diploidních taxonů vykazovaly horizontální přenos hybridizací na tetraploidním stupni. To svědčí o důkazu nové genetické diferenciaci u těchto hybridních tetraploidních taxonů, neboť právě polyploidizace a hybridizace se podílely na masivním rozšíření tohoto rodu (Guo et al. 2005).

Diskutovaná byla rovněž schopnost metody AFLP detekovat geografický původ organismů. Například u druhu *Maianthemum bifolium* dokázala od sebe metoda AFLP rozlišit populace vzdálené pouhých 200 m (Arens et al. 2005). Rovněž García-Lampasona et al. (2003) ve své studii uvádí, že při studiu argentinských klonů česneku (*Allium sativum* L.) existovala souvislost mezi výsledky AFLP a zeměpisným původem klonů. Naopak při studiu dvou druhů narcisů (*Narcissus poeticus* L. a *Narcissus radiiflorus* Salisb.), které pocházely ze dvou od sebe přes 100 km vzdálených populací, byl mezi oběma populacemi zjištěn na základě AFLP fragmentů pouze malý rozdíl.

Dokonce při srovnávání obou druhů pocházejících ze stejné lokality, neposkytla metoda AFLP, jež je považována za velice účinnou při rozlišování blízce příbuzných, ale oddělených taxonů, žádné jasné oddělení těchto dvou taxonů. Tucci et al. (2004) dokonce uvádí, že i populace stejného druhu se od sebe lišily více, než se od sebe lišili jedinci různých druhů. Důvodem může být to, že tyto populace mohly v minulosti tvořit jednu velkou populaci a že u nich k přerušení genového toku došlo poměrně nedávno (Tucci et al. 2004). V této studii bylo tedy použito AFLP metody i jako nástroje na rozlišení taxonů, kdy Tucci et al. (2004) na základě zjištěné nízké genetické variability u obou druhů navrhl sloučení druhů *Narcissus poeticus* a *Narcissus radiiflorus* do druhu jednoho.

V porovnání s jinými molekulárními metodami, jako jsou RAPD, RFLP nebo mikrosatelity, patří metoda AFLP v detekci genové variability mezi nejefektivnější. Ve srovnání s RAPD se ukázala být metoda AFLP více informativní zejména ve vytváření většího množství polymorfních markerů na primerovou kombinaci, jak udává Ipek et al. (2003), jenž při studiu klonů *Allium sativum* srovnával použití různých molekulárních markerů, nebo McGregor et al. (2000), který porovnával DNA fingerprintingové techniky pro tetraploidní *Solanum tuberosum*. AFLP fragmenty mohou být totiž náhodně rozšířené po celém jaderném genomu, a tak při použití dostatečného množství primerových kombinací mohou vytvořené soubory dat poskytnout lepší přiblížení se ke skutečným rozdílům mezi jednotlivými studovanými genomy (Hedrén et al. 2001, Ipek et al. 2003). Metoda RAPD je však na druhou stranu aplikovatelná jak pro druhy s velkým genomem, tak na druhy s genomem malým, na rozdíl od metody AFLP, která je použitelná zejména pro odhalení genetické příbuznosti druhů s velkým genomem (Wilkie et al. 1993, Lee et al. 2002).

Ve studii zabývající se genetickou variabilitou *Ficus carica* L. se však ukázaly v detekci polymorfismu mnohem lepší SSR markery, které se od AFLP markerů liší i svým kodominantním charakterem (Baraket et al. 2011). Na rozdíl od metody AFLP vyžaduje však použití SSR metody rozsáhlé znalosti sekvencí DNA, což není pro studium planě rostoucích druhů vhodné (Mondini et al. 2009). Výhodou metody AFLP může být rovněž její rychlost a spolehlivost a to, že nevyžaduje předchozí znalost DNA sekvence (Baraket et al. 2011).

Slabinou metody AFLP může být tzv. homoplasie fragmentové velikosti, ke které může dojít při vyhodnocování, kdy dva bandy stejné velikosti, tj. pohybující se při separaci stejnou rychlostí, nemusí být homologní, ale mohou představovat fragmenty z různých oblastí genomu (Vekemans et al. 2002). Při porovnávání s jiným taxonem tak nemusí fragmenty stejné velikosti pocházet ze stejného lokusu. Stejně tak může dojít k nesprávnému zhodnocení bandu chybějícího (Althoff et al. 2007). Problémy byly zaznamenány i ve studiu polyploidních druhů, které na rozdíl od druhů diploidních produkují mnohem větší množství AFLP fragmentů (Han et al. 1999, Goldman et al. 2004, Fay et al. 2005, Guo et al. 2006). Stejně tak však produkují i velké množství polymorfních fragmentů, které zahrnují větší množství lokusů a alel, což může značně ztěžovat determinaci alel či lokusů konkrétních (McGregor et al. 2000). V takovém případě je nutné metodu AFLP modifikovat (Han et al. 1999), nebo kombinovat s dalšími technologiemi tak, aby se množství polymorfních sekvencí snížilo. Nevýhodou může být i její dominantní charakter, který může komplikovat interpretaci výsledků i statistické analýzy (Holsinger et al. 2002, Bensch & Åkesson 2005).

Nicméně i přes své nevýhody představuje metoda AFLP pro hodnocení genotypové variability druhů rodu *Allium* sekce *Codonoprasum* účinný nástroj. Pro toto studium je vhodná nejen pro svůj multilokusový charakter a vysokou míru polymorfismu, ale i pro svou schopnost zpracovat velké množství vzorků zároveň a tím získat velké množství dat. Předností je i skutečnost, že použití této metody nevyžaduje předchozí znalost studované sekvence DNA, což umožňuje studium planě rostoucích druhů rostlin. Rovněž svou použitelností pro studium druhů s velkým genomem je pro studium polyploidních druhů rodu *Allium* vhodná.

## 7 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce bylo studováno 217 rostlin z 89 populací rodu *Allium* sekce *Codonoprasum*, které pocházely z různých geografických oblastí a které byly kultivovány na experimentálním pozemku Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Sekce *Codonoprasum*, která v sobě v rámci rodu *Allium* zahrnuje polyploidní komplexy, jako je například komplex *Allium paniculatum*, představuje v rámci rodu *Allium* i podrodu *Allium*, kam je v současnosti tato sekce řazena, jednu z nejkomplicovanějších sekcí s neustáleným taxonomickým členěním. Jedná se o geofytní rostliny s genovým centrem v horských oblastech jihozápadní až centrální Asie, které se však během své evoluce dokázaly adaptovat na široké spektrum ekologických nik. Například samotná sekce *Codonoprasum* je typicky mediteránní skupinou s adaptací na mírné, vlhké zimy a horká, suchá léta (Hanelt 1996, Ohri & Pistrick 2001).

Právě polyploidie, která hraje důležitou roli v evoluci 47-100 % kvetoucích rostlin (Wood et al. 2009), se mohla podílet na velkém rozšíření tohoto rodu, neboť polyploidie, která vyvolává u jedince jak morfologické, tak fyziologické změny, které by měly vzhledem k rozšířenosti polyploidie svého nositele buď krátkodobě, či dlouhodobě zvýhodňovat, umožňuje svým nositelům rychleji a účinněji osídlit nová území. S polyploidí souvisí rovněž velká rozmanitost v reprodukčních systémech, kdy mají polyploidní jedinci kromě schopnosti pohlavního rozmnožování i schopnost samosprašení či vegetativního rozmnožování (například dceřinými cibulemi či pacibulkami), což umožňuje přežití tohoto jedince i bez přítomnosti partnera vhodného cytotypu. Genomová duplikace se však netýká jen evoluce rostlin, kde představuje jeden z klíčových mechanismů adaptace a diverzifikace, nýbrž i evoluce genomu ostatních eukaryot. Bylo prokázáno, že mnoho organismů, nejen z rostlinné říše, si během evoluce prošlo procesem polyploidizace a svůj diploidní charakter získali až procesem tzv. sekundární diploidizace genomu (Wood et al. 2009, Van de Peer et al. 2009).

V současnosti se pro studium genetické diverzity hojně využívá tzv. molekulárních markerů, které na základě polymorfismů v celkové genomové, chromozomové, mitochondriální, chloroplastové, nebo plazmidové DNA dokážou rozpoznat jednotlivé druhy organismů, zjistit jejich genealogickou příbuznost v rámci populace či druhu, či

rekonstruovat fylogenezi daného taxonu bez zkrácení například vlivy vnějšího prostředí. Takovými metodami jsou například RFLP, RAPD, AFLP či SSR. Pro studium genetické diverzity vybraných druhů rodu *Allium* sekce *Codonoprasum* byla zvolena metoda AFLP, která se díky své schopnosti odhalit genetickou příbuznost druhů s velkým genomem, o čemž vypovídá i množství předchozích studií (například Hedrén et al. 2001, Arens et al. 2005, Guo et al. 2005), ukázala být nejvhodnější metodou pro studium tohoto polyploidního komplexu. Celkem bylo touto metodou prozatím analyzováno třemi primerovými kombinacemi 107 vzorků rostlin pocházejících z 21 populací rodu *Allium* sekce *Codonoprasum*. Získaná data budou dále doplněna o výsledky ze zbývajících vzorků rostlin a z dalších dvou primerových kombinací, přičemž budou použita jako základ k navazující magisterské diplomové práci. V té budou všechny výsledky zkompletovány, statisticky zpracovány a použity pro posouzení genotypové variability.

## LITERATURA

- Adams K. L. & Wendel J. F. (2005): Polyploidy and genome evolution in plants. – *Current opinion in plant biology* 8 (2): 135-141.
- Agarwal M., Shrivastava N. & Padh H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. – *Plant cell reports* 27 (4): 617-631.
- Alan A. R., Mutschler M. A., Brants A., Cobb E. D. & Earle E. D. (2003): Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn. – *Plant science* 165 (6): 1201-1211.
- Albach D. C. (2007): Amplified fragment length polymorphisms and sequence data in the phylogenetic analysis of polyploids: multiple origins of *Veronica cymbalaria* (*Plantaginaceae*). – *New Phytologist* 176 (2): 481-498.
- Althoff D. M., Gitzendanner M. A. & Segraves K. A. (2007): The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. – *Systematic biology* 56 (3): 477-484.
- Amini-Bavil-Olyae S., Tacke F. & Alavian S. M. (2013): HBV Subgenotypes D1, D2, D-del! Are 'Old 'Genotyping Methods Interpreted Correctly?. – *Hepatitis monthly* 13 (7).
- APG. (1998): An ordinal classification for the families of flowering plants. – *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 531–553.
- APGII. (2003): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399–436.
- Arens P., Grashof-Bokdam C. J., van der Sluis T. & Smulders M. J. M. (2005): Clonal diversity and genetic differentiation of *Maianthemum bifolium* among forest fragments of different age. – *Plant Ecology* 179 (2): 169-180.
- Balloux F. & Lugon-Moulin N. (2002): The estimation of population differentiation with microsatellite markers. – *Molecular ecology* 11 (2): 155-165.

- Baraket G., Chatti K., Saddoud O., Abdelkarim A. B., Mars M., Trifi M. & Hannachi A. S. (2011): Comparative assessment of SSR and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of fig, *Ficus carica* L., genetic resources in Tunisia. – Plant molecular biology reporter 29 (1): 171-184.
- Bardakci F. (2001): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. – Turk J Biol 25 (1): 2185-96.
- Barina Z. & Pifko D. (2011): Contributions to the flora of Albania, 2. – Willdenowia 41 (1): 139-149.
- Barret B. A. & Kidwell K. (1998): AFLP based genetic diversity assesment aminy wheat cultivars from the Pacific Northwest. – Crop Science 38: 1261-1271.
- Barringer B. C. (2007): Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. – American Journal of Botany 94 (9): 1527-1533.
- 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.
- Beaulieu J. M., Moles A. T., Leitch I. J., Bennett M. D., Dickie J. B. & Knight C. A. (2007): Correlated evolution of genome size and seed mass. – New Phytologist 173 (2): 422-437.
- Bennett M. D. (2004): Perspectives on polyploidy in plants – ancient and neo. – Biological Journal of the Linnean Society 82 (4): 411-423.
- Bensch S. & Åkesson M. (2005): Ten years of AFLP in ecology and evolution: Why so few animals?. – Molecular Ecology 14: 2899-2914.
- Birchler J. A., Auger D. L. & Riddle N. C. (2003): In search of the molecular basis of heterosis. – The Plant Cell Online 15 (10): 2236-2239.
- Blagojević J., Stevanović V. & Vujošević M. (2007): B chromosomes in keeled garlic, *Allium carinatum* L. (*Liliaceae*), from Tara mountain (Serbia). – Archives of Biological Sciences 59 (4): 73-74.



- Botstein D., White R. L., Skolnick M. & Davis R. W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. – American journal of human genetics 32 (3): 314.
- Brat S. V. (1965): Genetic systems in *Allium*. III. Meiosis and breeding systems. – Heredity 20: 325-339.
- Bretagnolle F. & Thompson J. D. (2001): Phenotypic plasticity in sympatric diploid and autotetraploid *Dactylis glomerata*. – International Journal of Plant Sciences 162 (2): 309-316.
- Bretagnolle F. A. & Thompson J. D. (1995): Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. – New Phytologist 129 (1): 1-22.
- Briggs D. & Walters S. M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. – Univerzita Palackého Olomouc, 531 pp.
- Brullo S., Guglielmo A. & Terrasi M. C. (1998): Notes on *Allium rhodopeum* (*Alliaceae*), a neglected species from the E Mediterranean area. Plant Biosystems. – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology 132 (1): 63-69.
- Brullo S., Guglielmo A., Pavone P. & Salmeri C. (2001): Cytotaxonomical notes on some rare endemic species of *Allium* (*Alliaceae*) from Greece. – Caryologia 54 (1): 37-57.
- Brullo S., Guglielmo A., Pavone P. & Salmeri C. (2003): Cytotaxonomical remarks on *Allium pallens* and its relationships with *A. convallarioides* (*Alliaceae*). – Bocconea 16 (2): 557-571.
- Brullo S., Guglielmo A., Pavone P. & Salmeri C. (2008): Taxonomic study on *Allium dentiferum* Webb & Berthel. (*Alliaceae*) and its relations with allied species from the Mediterranean. – Taxon 57 (1): 243-253.
- Brullo S., Guglielmo A., Pavone P., Scelsi F. & Terrasi M. C. (1996a): Cytotaxonomic consideration of *Allium fuscum* Waldst. et Kit. (*Liliaceae*), a critical species of the European flora. – Folia Geobotanica 31 (4): 465-472.

- Brullo S., Pavone P., Salmeri C. & Venora G. (2004): Cytotaxonomic investigation on *Allium exaltatum* (*Alliaceae*) from Cyprus. – *Caryologia* 57 (3): 274-278.
- Brullo S., Pavone P. & Salmeri C. (1991): Cytotaxonomical notes on *Allium dentiferum* Webb & Berthel., an unknown species of the Mediterranean flora. In: Kocyigit M. & Özhatay F. N. [eds.]: A contribution to the genus *Allium* L. (Sect. *Codonoprasum*) in Turkey. – *Turkish Journal of Botany* 34 (5): 391-395.
- Brullo S., Pavone P. & Salmeri C. (1995): Considerazioni citotassonomiche sulle specie appartenenti al ciclo di *Allium staticiforme* Sm. (*Liliaceae*) del Mediterraneo orientale. – *Boll. Soc. Sarda Sci. Nat.* 30: 501-510.
- Brullo S., Pavone P. & Salmeri C. (1996b): A new species of *Allium* sect. *Codonoprasum* from Sierra Nevada (Spain). – *Sendtnera* 3: 95-100.
- Brullo S., Pavone P. & Salmeri C. (1999): *Allium archeotrichon* (*Alliaceae*), a new species from Rhodos (Dodekannisos, Greece). – *Nordic Journal of Botany* 19 (1): 41-46.
- Budylin M. V., Kan L. Y., Romanov V. S. & Khrustaleva L. I. (2014): GISH study of advanced generation of the interspecific hybrids between *Allium cepa* L. and *Allium fistulosum* L. with relative resistance to downy mildew. – *Russian journal of genetics* 50 (4): 387-394.
- Comai L. (2005): The advantages and disadvantages of being polyploid. – *Nature Reviews Genetics* 6 (11): 836-846.
- Cronquist A. (1981): An integrated system of classification of flowering plants. In: Chase M. W., Reveal J. L. & Fay M. F. [eds.]: A subfamilial classification for the expanded asparagalean families *Amaryllidaceae*, *Asparagaceae* and *Xanthorrhoeaceae*. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 161 (2): 132-136.
- Crow K. D. & Wagner G. P. (2006): What is the role of genome duplication in the evolution of complexity and diversity?. – *Molecular biology and evolution* 23 (5): 887-892.

- Dahlgren R. M. T., Clifford H. T. & Yeo P. F. (1985): The families of the Monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. In: Chase M. W., Reveal J. L. & Fay M. F. [eds.]: A subfamilial classification for the expanded asparagalean families *Amaryllidaceae*, *Asparagaceae* and *Xanthorrhoeaceae*. – Botanical Journal of the Linnean Society 161 (2): 132-136.
- Deleu W., Esteras C., Roig C., González-To M., Fernández-Silva I., Gonzalez-Ibeas D. & Garcia-Mas J. (2009): A set of EST-SNPs for map saturation and cultivar identification in melon. – BMC Plant Biology 9 (1): 90.
- De Vos S., Bossier P., Van Stappen G., Vercauteren I., Sorgeloos P. & Vuylsteke M. (2013): A first AFLP-based genetic linkage map for brine shrimp *Artemia franciscana* and its application in mapping the sex locus. – PloS one 8 (3): e57585.
- Dobrochaeva D. N., Prokudin Y. N., Zaveruha B., Chopik V. I., Promopopova H. & Kritskal L. I. (1999): Klíč k určování vyšších rostlin Ukrajiny. – Akademie věd Ukrajinské SSR, Kyjev. (in Russian)
- Doyle J. J. & Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. – Phytochemical Bulletin 19: 11–15.
- Draghia L., Chelariu E. L., Sirbu C., Branza M. & Miculschi C. S. (2013): Analysis of Chromosome Number in Some *Allium* and *Silene* Wild Species with Ornamental Use. – Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 41 (1): 294-300.
- Duchoslav M. (2001): Small-scale spatial pattern of two common European geophytes *Allium oleraceum* and *A. vineale* in contrasting habitats. – Biologia-Bratislava 56 (1): 57-62.
- Duchoslav M., Šafářová L. & Jandová M. (2013): Role of adaptive and non-adaptive mechanisms forming complex patterns of genome size variation in six cytotypes of polyploid *Allium oleraceum* (*Amaryllidaceae*) on a continental scale. – Annals of botany 111 (3): 419-431.
- Duchoslav M., Šafářová 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.

- Ebrahimi R., Zamani Z. & Kashi A. (2009): Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD markers. – *Scientia Horticulturae* 119 (4): 345-351.
- Elez N. (1999): Kromosomska istraživanja triju populacija metličastog luka, *Allium paniculatum* L. s područja srednje Dalmacije. [Dissertation, depon. in: Sveuciliste u Splitu, Split].
- Fay M. F., Cowan R. S. & Leitch I. J. (2005): The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. – *Annals of Botany* 95 (1): 237-246.
- Fawcett J. A. & Van de Peer Y. (2010): Angiosperm polyploids and their road to evolutionary success. – *Trends in Evolutionary Biology* 2 (1): 16-21.
- Fawcett J. A., Maere S. & Van de Peer Y. (2009): Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (14): 5737-5742.
- Fedorov A. N., Grechko V. V., Slobodyanyuk S. Y., Fedorova L. V. & Timokhina G. I.: Taxonomic analysis of DNA repeated sequences. In: Grechko V. V., Fedorova L. V., Fedorov A. N., Slobodyanyuk S. Y., Ryabinin D. M., Melnikova M. N. & Darevsky I. S. [eds.]: Restriction endonuclease analysis of highly repetitive DNA as a phylogenetic tool. – *Journal of molecular evolution* 45 (3): 332-336.
- Feldman M., Liu B., Segal G., Abbo S., Levy A. A. & Vega J. M. (1997): Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. – *Genetics* 147 (3): 1381-1387.
- 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-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 209 (7): 312-324.

- Filjushin M. A., Kholda O. A., Kochieva E. Z. & Ryzhova N. N. (2011): AFLP marking of the genotypes of leek (*Allium porrum*) varieties. – Russian Journal of Genetics 47 (4): 492-496.
- Fiori A. (1923): Nuova flora analitica d'Italia 1. In: Brullo S., Guglielmo A., Pavone P., Scelsi F. & Terrasi M. C. [eds.]: Cytotaxonomic consideration of *Allium fuscum* Waldst. et Kit. (*Liliaceae*), a critical species of the European flora. – Folia Geobotanica 31 (4): 465-472.
- Flegr J. (2009): Evoluční biologie. – Academia, Praha, 569 pp.
- 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 22 (1): 372-95.
- Fritsch R. M. & Friesen N. (2002): 1 Evolution, Domestication and Taxonomy. – *Allium* Crop Science: Recent Advances. CABI Publishing, Wallingford, UK: 5-30.
- Gallardo M. H., Bickham J. W., Honeycutt R. L., Ojeda R. A. & Köhler N. (1999): Discovery of tetraploidy in a mammal. – Nature 401 (6751): 341-341.
- Ganal M. W., Altmann T. & Röder M. S. (2009): SNP identification in crop plants. – Current opinion in plant biology 12 (2): 211-217.
- García-Lampasona S., Martínez L. & Burba J. L. (2003): Genetic diversity in Argentinean selected garlic (*Allium sativum* L.) as assessed by AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). – Euphytica 132 (1): 115-119.
- García-Pereira M. J., Carvajal-Rodríguez A., Whelan S., Caballero A. & Quesada H. (2014): Impact of deep coalescence and recombination on the estimation of phylogenetic relationships among species using AFLP markers. – Molecular phylogenetics and evolution 76: 102-109.
- Gerstein A. C. & Otto S. P. (2009): Ploidy and the causes of genomic evolution. – Journal of heredity 100 (5): 571-581.
- Goldman D. H., Jansen R. K., van den Berg C., Leitch I. J., Fay M. F. & Chase M. W. (2004): Molecular and cytological examination of *Calopogon* (*Orchidaceae*,

*Epidendroideae*): circumscription, phylogeny, polyploidy, and possible hybrid speciation. – American Journal of Botany 91 (5): 707-723.

Grant V. (1963): The origin of adaptations. In: Soltis D. E., Soltis P. S. & Tate J. A. [eds.]: Advances in the study of polyploidy since plant speciation. – New Phytologist 161 (1): 173-191.

Grundt H. H., Kjølner S., Borgen L., Rieseberg L. H. & Brochmann C. (2006): High biological species diversity in the arctic flora. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(4): 972-975.

Guggisberg A., Mansion G., Kelso S. & Conti E. (2006): Evolution of biogeographic patterns, ploidy levels, and breeding systems in a diploid-polyploid species complex of *Primula*. – New Phytologist 171 (3): 617-632.

Guo Y. P., Saukel J., Mittermayr R. & Ehrendorfer F. (2005): AFLP analyses demonstrate genetic divergence, hybridization, and multiple polyploidization in the evolution of *Achillea* (*Asteraceae-Anthemideae*). – New Phytologist 166 (1): 273-290.

Guo Y. P., Vogl C., Van Loo M. & Ehrendorfer F. (2006): Hybrid origin and differentiation of two tetraploid *Achillea* species in East Asia: molecular, morphological and ecogeographical evidence. – Molecular Ecology 15 (1): 133-144.

Güler Ü. & Pehlivan S. (2006): Pollen morphology of some species belonging to *Codonoprasum* and *Allium* sections of *Allium* (*Liliaceae-Alliaceae*) genus. – Biologia 61 (4): 449-455.

Han T. H., Van Eck H. J., De Jeu M. J. & Jacobsen E. (1999): Optimization of AFLP fingerprinting of organisms with a large-sized genome: a study on *Alstroemeria* spp. – Theoretical and Applied Genetics 98 (3-4): 465-471.

Hanelt P., Schultze Motel J., Fritsch R., Kruse J., Maass H. I., Ohle H. & Pistrick K. (1992): Infrageneric grouping of *Allium* – the Gatersleben approach. The genus *Allium* – taxonomic problems and genetic resources Inst. – Pflanzengenetik & Kulturpflanzenforschung: Gatersleben: 107-23.

- Hanelt P. (1996): Taxonomic problems in Mediterranean *Allium*, and relationships with non-Mediterranean *Allium* groups. – *Bacconea* 5: 259-265.
- Havey M. J. (1991): Phylogenetic relationships among cultivated *Allium* species from restriction enzyme analysis of the chloroplast genome. – *Theoretical and applied genetics* 81 (6): 752-757.
- Hedrén M. (1996): Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*): Evidence from allozyme markers. – *Plant Systematics and Evolution* 201 (1-4): 31-55.
- Hedrén M., Fay M. F. & Chase M. W. (2001): Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*). – *American Journal of Botany* 88 (10): 1868-1880.
- Hedrén M., Nordström S., Hovmalm H. A. P., Pedersen H. Æ. & Hansson S. (2007): Patterns of polyploid evolution in Greek marsh orchids (*Dactylorhiza*; *Orchidaceae*) as revealed by allozymes, AFLPs, and plastid DNA data. – *American Journal of Botany* 94 (7): 1205-1218.
- Hegarty M. & Hiscock S. (2007): Polyploidy: doubling up for evolutionary success. – *Current Biology* 17 (21): 927-929.
- Henry R. J. [Ed.] (2005): *Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants*. – CABI Publishing, 332 pp.
- Hijmans R. J., Gavrilenko T., Stephenson S., Bamberg J., Salas A. & Spooner D. M. (2007): Geographical and environmental range expansion through polyploidy in wild potatoes (*Solanum* section *Petota*). – *Global Ecology and Biogeography* 16 (4): 485-495.
- Hilton A. C., Banks J. G. & Penn C. W. (1997): Optimization of RAPD for fingerprinting *Salmonella*. – *Letters in applied microbiology* 2 (4): 243-248.
- Hodgson J. G., Sharafi M., Jalili A., Díaz S., Montserrat-Martí G., Palmer C. & Simmons E. (2010): Stomatal vs. genome size in angiosperms: the somatic tail wagging the genomic dog?. – *Annals of Botany* 105 (4): 573-584.

- Holsinger K. E., Lewis P. O. & Dey D. K. (2002): A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. – *Molecular Ecology* 11 (7): 1157-1164.
- Honnay O., Jacquemyn H., Roldán-Ruiz I. & Hermy M. (2006): Consequences of prolonged clonal growth on local and regional genetic structure and fruiting success of the forest perennial *Maianthemum bifolium*. – *Oikos* 112 (1): 21-30.
- Honnay O. & Jacquemyn H. (2008): A meta-analysis of the relation between mating system, growth form and genotypic diversity in clonal plant species. – *Evolutionary Ecology* 22 (3): 299-312.
- 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., Ozimec B., Martin S. L. & Pollock L. (2008): Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: current trends and insights from synthetic polyploids. – *International Journal of Plant Sciences* 169 (1): 195-206.
- Chakravarthi B. K. & Naravaneni R. (2006): SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L.). – *African J. Biotech.* 5 (9): 684-688.
- Chase M. W., Reveal J. L. & Fay M. F. (2009): A subfamilial classification for the expanded asparagalean families *Amaryllidaceae*, *Asparagaceae* and *Xanthorrhoeaceae*. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 161 (2): 132-136.
- Chen Z. J. & Pikaard C. S. (1997): Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica*. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (7): 3442-3447.
- Chen Z. J. (2007): Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. – *Annual review of plant biology* 58: 377-406.
- Chuda A. & Adamus A. (2009): Aspects of interspecific hybridization within edible *Alliaceae*. – *Acta physiologiae plantarum* 31 (2): 223-227.
- Ipek M., Ipek A. & Simon P. W. (2003): Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in



germplasm collections. – Journal of the American Society for Horticultural Science 128 (2): 246-252.

Jarne P. & Lagoda P. J. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. – Trends in Ecology & Evolution 11 (10): 424-429.

Jiao Y., Wickett N. J., Ayyampalayam S., Chanderbali A. S., Landherr L., Ralph P. E. & Leebens-Mack J. (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.

Jonah P. M., Bello L. L., Lucky O., Midau A. & Moruppa S. M. (2011): Review: the importance of molecular markers in plant breeding programmes. – Global Journal of Science Frontier Research 11 (5).

Kamelin R. V. (1973): Florogeneticheskij analiz estestvennoj flory gornoj Srednej Azii. Leningrad. In: Li Q. Q., Zhou S. D., He X. J., Yu Y., Zhang Y. C. & Wei X. Q. [eds.]: 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.

Kao R. H. (2008): Implications of polyploidy in the host plant of a dipteran seed parasite. – Western North American Naturalist 68 (2): 225-230.

Kapraun D. F. & Freshwater D. W. (2012): Estimates of nuclear DNA content in red algal lineages. – AoB plants 2012: pls005.

Kapraun D. F. (2005): Nuclear DNA content estimates in multicellular green, red and brown algae: phylogenetic considerations. – Annals of Botany 95 (1): 7-44.

Karp A., Seberg O. & Buiatti M. (1996): Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. – Annals of Botany 78: 143- 149.

- 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.
- Kell S. P. [ed.] (2013): *Allium podolicum*. The IUCN Red List of Threatened Species, www.iucnredlist.org, Version 2014.2., navštívno 27.8.2014.
- Khoshoo T. N. (1959): Polyploidy in gymnosperms. – Evolution: 24-39.
- Kim B. J., Kwon Y. C., Kwack Y. H., Lim M. S. & Park E. H. (1999): Interspecific hybridization in sexual diploid *Allium senescens* var. *minor* × apomictic tetraploid *A. nutans* and sexual diploid *A. senescens* var. *minor* × apomictic hexaploid *A. senescens*. – Plant breeding 118 (5): 439-442.
- Kim S., Rayburn A. L., Boe A. & Lee D. K. (2012): Neopolyploidy in *Spartina pectinata* Link: 1. Morphological analysis of tetraploid and hexaploid plants in a mixed natural population. – Plant systematics and evolution 298 (6): 1073-1083.
- King R. C., Mulligan P. & Stansfield W. (2006): A dictionary of genetics. Seventh Edition. – Oxford University Press, 596 pp.
- Knight C. A. & Ackerly D. D. (2002): Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. – Ecology Letters 5 (1): 66-76.
- Kocyigit M. & Odabasi N. S. (2014): Pollen morphology of some *Allium* L. taxa (sect. *Codonoprasum*/*Alliaceae*) in Turkey. – Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University 44 (1): 79-87.
- Kocyigit M. & Özhatay F. N. (2010): A contribution to the genus *Allium* L. (Sect. *Codonoprasum*) in Turkey. – Turkish Journal of Botany 34 (5): 391-395.
- Kocyigit M. & Özhatay N. (2011): Taxonomic remarks on eight *Allium* species (sect. *Codonoprasum*) from South Anatolia. – Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University 41: 42-55.
- Koch W. D. J. (1907): Synopsis der Deutschen und Schweizer Flora. In: Levan A. [eds.]: Cytological studies in the *Allium paniculatum* group. – Hereditas 23 (3): 317-370.

- Kojima A. & Nagato Y. (1997): Discovery of highly apomictic and highly amphimictic dihaploids in *Allium tuberosum*. – Sexual Plant Reproduction 10 (1): 8-12.
- Kollmann F. (1984): *Allium*. In: Brullo S., Guglielmo A., Pavone P. & Salmeri C. [eds.]: Cytotaxonomical remarks on *Allium pallens* and its relationships with *A. convallarioides* (*Alliaceae*). – Bocconea 16 (2): 557-571.
- Komarov V. L. (1935): Flora of the USSR IV. *Liliiflorae* and *Microspermae*. – Nauk., Leningrad.
- Krahulec F. & Duchoslav M. (2010): 180. *Alliaceae* J. AGARDH – česnekovité. In: Štěpánková J. [ed.], Květena České republiky, Vol. 8, Academia, Praha.
- Krytska L. I., Fedoronchuk M. M., Tsarenko O. M. & Shevera M. V. (2000): Типіфікація видів судинних рос лин, описаних з України: родини *Liliaceae* Juss., *Alliaceae* J. Agardh.- Укр. ботан. журн. 57 (6): 689-696. (in Russian)
- Krzywińska A., Gawłowska M., Wolko B. & Bocianowski J. (2008): Genetic diversity of ornamental *Allium* species and cultivars assessed with isozymes. – Journal of applied genetics 49 (3): 213-220.
- Kubát K. [ed.] (2010): Klíč ke květeně České republiky. – Academia, Praha, 927 pp.
- Kumar P., Gupta V. K., Misra A. K., Modi D. R. & Pandey B. K. (2009): Potential of molecular markers in plant biotechnology. – Plant Omics 2 (4): 141-162.
- Kutlunina N. A., Polezhaeva M. A. & Permyakova M. V. (2013): Morphologic and AFLP analysis of relationships between tulip species *Tulipa biebersteiniana* (*Liliaceae*). – Russian Journal of Genetics 49 (4): 401-410.
- Labani R. M. & Elkington T. T. (1987): Nuclear DNA variation in the genus *Allium* L. (*Liliaceae*). – Heredity 59: 119-128.
- Lande R. & Schemske D. W. (1985): The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. – Evolution: 24-40.
- Lee M. K., Lim Y. P. & Bang J. W. (2002): Genetic analysis of garlic (*Allium sativum* L.) cultivars using AFLP. – Korean Journal of Genetics 24 (1): 75-81.

- Leitch I. J. & Bennett M. D. (1997): Polyploidy in angiosperms. – *Trends in Plant Science* 2 (12): 470-476.
- Levan A. (1932): Cytological studies in *Allium*, II Chromosome morphological contributions. – *Hereditas* 16 (3): 257-294.
- Levan A. (1933): Cytological studies in *Allium*, III *Allium Carinatum* and *Allium oleraceum*. – *Hereditas* 18 (1-2): 101-114.
- Levan A. (1936): Die zytologie von *Allium cepa* x *fistulosum*. – *Hereditas* 21: 195-214.
- Levan A. (1937): Cytological studies in the *Allium paniculatum* group. – *Hereditas* 23 (3): 317-370.
- Levin D. A. (1983): Polyploidy and novelty in flowering plants. – *American Naturalist*: 1-25.
- 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.
- Li W. L., Berlyn G. P. & Ashton P. M. S. (1996): Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficit in *Betula papyrifera* (*Betulaceae*). – *American Journal of Botany*: 15-20.
- Linnaeus C. (1753): *Species plantarum*, Vol. 1. *Allium*. – Stockholm: Laurentiis Salvii [Facsimile edition, 1957–1959, London: Ray Society]: 294–302.
- Lou Y. & Baldwin I. T. (2003): *Manduca sexta* recognition and resistance among allopolyploid *Nicotiana* host plants. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2): 14581-14586.
- Mable B. K. (2004): Polyploidy and self-compatibility: is there an association?. – *New Phytologist* 162 (3): 803-811.

- Mace E. S., Gebhardt C. G. & Lester R. N. (1999): AFLP analysis of genetic relationships in the tribe *Datureae* (*Solanaceae*). – *Theoretical and Applied Genetics* 99 (3-4): 634-641.
- Malyshev L. I. & Peshkova G. A. (1987): *Flora of Siberia. Araceae – Orchidaceae. V. 4.* – Novosibirsk, Nauka.
- Mandáková T., Joly S., Krzywinski M., Mummenhoff K. & Lysak M. A. (2010): Fast diploidization in close mesopolyploid relatives of *Arabidopsis*. – *The Plant Cell Online* 22 (7): 2277-2290.
- Mashayekhi S. & Columbus J. T. (2014): Evolution of leaf blade anatomy in *Allium* (*Amaryllidaceae*) subgenus *Amerallium* with a focus on the North American species. – *American journal of botany* 101(1): 63-85.
- Masterson J. (1994): Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. – *Science* 264 (5157): 421-424.
- McGregor C. E., Lambert C. A., Greyling M. M., Louw J. H. & Warnich L. (2000): A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. – *Euphytica* 113 (2): 135-144.
- Melchior H. (1964): 3. Reihe *Liliiflorae* (*Liliales*). In: Fritsch R. M. & Friesen N. [eds.]: 1 Evolution, Domestication and Taxonomy. – *Allium Crop Science: Recent Advances*. CABI Publishing, Wallingford, UK: 5-30.
- Mes T. H., Friesen N., Fritsch R. M., Klaas M. & Bachmann K. (1997): Criteria for sampling in *Allium* based on chloroplast DNA PCR-RFLP's. – *Systematic Botany*: 701-712.
- Meudt M. & Clarke A. C. (2007): Almost forgotten or latest practise? AFLP applications, analyses and advances. – *Trends in Plant Science* 12: 106-107.
- Micheli M. R., Bova R., Pascale E. & D'Ambrosio E. (1994): Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. – *Nucleic Acids Research* 22 (10): 1921.

- Mizianty M. & Frey L. (1973): Chromosome numbers of some vascular plants in the Western Bieszczady Mts. (South-eastern Poland). – *Fragm. Florist. Geobot.* 19: 265-270.
- Mondini L., Noorani A. & Pagnotta M. A. (2009): Assessing plant genetic diversity by molecular tools. – *Diversity* 1 (1): 19-35.
- Mueller U. G. & Wolfenbarger L. L. (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. – *Trends in Ecology & Evolution* 14 (10): 389-394.
- Mukherjee A., Sikdar B., Ghosh B., Banerjee A., Ghosh E., Bhattacharya M. & Roy S. C. (2013): RAPD and ISSR analysis of some economically important species, varieties, and cultivars of the genus *Allium* (*Alliaceae*). – *Turkish Journal of Botany* 37 (4): 605-618.
- Murín A., Svobodová Z., Majovský J. & Feraková V. (2000): Chromosome numbers of some species of the Slovak flora. – *Thaiszia-Kosice* 9 (1): 31-40.
- Naish K. A., Leamon J. P. & Skibinski D. O. F. (1995): Construction of genetic linkage map of *Oreochromis niloticus* and *O. aureus* (tilapia) using RAPD markers. – *Molecular Biology in Fish, Fisheries and Aquaculture. An international symposium, Plymouth, UK.*
- Nguyen N. H., Driscoll H. E. & Specht C. D. (2008): A molecular phylogeny of the wild onions (*Allium*; *Alliaceae*) with a focus on the western North American center of diversity. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 1157-1172.
- Nimnual A., Romkaew J., Chukeatirote E. & Nilthong S. (2014): Evaluation of genetic relationship among some important Japanese and Thai soybean varieties using AFLP analysis. – *Australian Journal of Crop Science* 8 (4): 481-485.
- Nuismer S. L. & Thompson J. N. (2001): Plant polyploidy and non-uniform effects on insect herbivores. – *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 268 (1479): 1937-1940.

- Nybom H. & Bartish I. V. (2000): Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. – *Perspectives in plant ecology, evolution and systematics* 3 (2): 93-114.
- Oganesian M. E. & Agababian M. V. [eds.] (2001): *Alliaceae*. Herbarium of the Institute of Botany of NAS of Armenia. [http://www.mnp.am/red\\_book\\_fauna/eng/p51.html](http://www.mnp.am/red_book_fauna/eng/p51.html). navštíveno: 26.1.2015.
- Ohara T., Song Y. S., Tsukazaki H., Wako T., Nunome T. & Kojima A. (2005): Genetic mapping of AFLP markers in Japanese bunching onion (*Allium fistulosum*). – *Euphytica* 144 (3): 255-263.
- Ohri D., Fritsch R. M. & Hanelt P. (1998): Evolution of genome size in *Allium* (*Alliaceae*). – *Plant Systematics and Evolution* 210 (1-2): 57-86.
- Ohri D. & Pistrick K. (2001): Phenology and Genome Size Variation in *Allium* L. – a Tight Correlation?. – *Plant Biology* 3 (6): 654-660.
- Ohryzek J. (2007): Srovnávací biologie cytotypů česneku planého (*Allium oleraceum*). [Diploma thesis, depon. in: Faculty of Science, Palacky University, Olomouc].
- Osborn T. C., Pires J. C. Birchler J. A., Auger D. L., Chen Z. J., Lee H. S. & 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.
- Otto S. P. (2007): The evolutionary consequences of polyploidy. – *Cell* 131 (3): 452-462.
- Özdemir C., Aktaş K. & Altan Y. (2011): Morphological and anatomical investigations on three *Allium* L. (*Liliaceae*) species of east Anatolia, Turkey. – *Bangladesh Journal of Botany* 40 (1): 9-15.
- Özhatay N. & Kocyigit M. (2009): Pollen morphology of *Allium* species (*Liliaceae*) in European Turkey and around Istanbul. – *Phytologia Balcanica* 15 (2): 199-208.

- Pannell J. R., Obrard D. J. & Buggs R. J. (2004): Polyploidy and the sexual system: what can we learn from *Mercurialis annua*?. – Biological Journal of the Linnean Society 82 (4): 547-560.
- Paris M., Bonnes B., Ficetola G. F., Poncet B. N. & Després L. (2010): Amplified fragment length homoplasmy: in silico analysis for model and non-model species. – BMC genomics 11 (1): 287.
- Parisod C., Holderegger R. & Brochmann C. (2010): Evolutionary consequences of autopolyploidy. – New Phytologist 186 (1): 5-17.
- Paul S., Wachira F. N., Powell W. & Waugh R. (1997): Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. – Theoretical and Applied Genetics 94: 255-263.
- Pausas J. G. & Sáez L. (2000): Pteridophyte richness in the NE Iberian Peninsula: biogeographic patterns. – Plant Ecology 148 (2): 195-205.
- Pedersen H. Æ. (1998): Allozyme variation and genetic integrity of *Dactylorhiza incarnata* (*Orchidaceae*). – Nordic Journal of Botany 18 (1): 15-21.
- Penner G. A., Bush A., Wise R., Kim W., Domier L., Kasha K. & Fedak G. (1993a): Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. – Genome Research 2 (4): 341-345.
- Penner G., Chong J., Levesque M., Molnar S. & Fedak G. (1993b): Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene Pg3. – Theor. Appl. Genet. 85: 702-705.
- 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.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S. & Rafalski A. (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. – Mol. Breed 2: 225-238.



- Provan J., Powell W. & Hollingsworth P. M. (2001): Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. – *Trends in Ecology & Evolution* 16 (3): 142-147.
- Przywara L. & Kuta E. (1995): Karyology of bryophytes. – *Polish Botanical Studies* 9: 1-83.
- Quezada M., Pastina M. M., Ravest G., Silva P., Vignale B., Cabrera D. & Pritsch C. (2014): A first genetic map of *Acca sellowiana* based on ISSR, AFLP and SSR markers. – *Scientia Horticulturae* 169: 138-146.
- Ramsey J. & Schemske D. W. (1998): Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. – *Annual Review of Ecology and Systematics*: 467-501.
- Ramsey J. (2011): Polyploidy and ecological adaptation in wild yarrow. – *Proceedings of the National Academy of Science* 108 (17): 7096-7101.
- Regel E. (1875): *Alliorum adhuc cognitorum monographia*. In: Levan A. [ed.]: *Cytological studies in the Allium paniculatum group*. – *Hereditas* 23 (3): 317-370.
- Regel E. (1887): *Allii species Asiae Centralis in Asia Media a Turcomania desertisque Araliensibus et Caspicis usque ad Mongolian crescentes*.- In: Ricroch A., Yockteng R., Brown S. C. & Nadot S. [eds.]: *Evolution of genome size across some cultivated Allium species*. – *Genome* 48 (3): 511-520.
- Reiter R. S., Williams J. G., Feldmann K. A., Rafalski J. A., Tingey S. V. & Scolnik P. A. (1992): Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (4): 1477-1481.
- Ricroch A., Yockteng R., Brown S. C. & Nadot S. (2005): Evolution of genome size across some cultivated *Allium* species. – *Genome* 48 (3): 511-520.
- Röder M. S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M. H., Leroy P. & Ganal M. W. (1998): A microsatellite map of wheat. – *Genetics* 149 (4): 2007-2023.

- Rola K. (2014): Cell Pattern and Ultrastructure of Bulb Tunics of Selected *Allium* Species (*Amaryllidaceae*), and their Diagnostic Value. – *Acta biologica cracoviensia series botanica* 56 (1): 28-41.
- Roldán-Ruiz I., Dendauw J., Van Bockstaele E., Depicker A. & De Loose M. (2000): AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). – *Molecular Breeding* 6 (2): 125-134.
- Ronfort J. (1999): The mutation load under tetrasomic inheritance and its consequences for the evolution of the selfing rate in autotetraploid species. – *Genetical Research* 74 (01): 31-42.
- Rubanovska N. & Solomaha V. A. (2012): Ценотичні особливості *Allium podolicum* (Asch. et Graebn.) Błocki ex Racib. і *A. lusitanicum* Lam. (*Alliaceae*) на Західному Поділлі.- *Ukrajinský botanický časopis* 69 (5): 631- 637. (in Russian)
- Ruiz Rejon C., Lozano R. & Ruiz-Rejon M. (1986): Numeros cromosomicos para la flora Espanola, 479-484. – *Lagascalia* 14 (2): 292-297.
- Sabir J., Mutwakil M., El-Hanafy A., Al-Hejin A., Sadek M. A., Abou-Alsoud M. & Ahmed M. (2014): Applying molecular tools for improving livestock performance: From DNA markers to next generation sequencing technologies. – *Journal of Food, Agriculture & Environment* 12 (2): 541-553.
- Sagona E. (2006): Plant biodiversity in Greece: contribution to the karyological aspects of some Monocots. [Master thesis, depon in: Università di Pisa].
- Samoylov A., Friesen N., Pollner S. & Hanelt P. (1999): Use of chloroplast DNA polymorphisms for the phylogenetic study of *Allium* subgenus *Amerallium* and subgenus *Bromatorrhiza* (*Alliaceae*) II. – *Feddes Repertorium* 110 (1-2): 103-109.
- Savelkoul P. H. M., Aarts H. J. M., Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J. L. W, Schouls L. & Lenstzra J. A. (1999): Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. – *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3083 - 3091.

- Segraves K. A. & Thompson J. N. (1999): Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. – *Evolution* 1114-1127.
- Schierwater B. & Ender A. (1993): Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. – *Nucleic Acids Research* 21 (19): 4647-4648.
- Scholten O. E., Van Heusden A. W., Khrustaleva L. I., Burger-Meijer K., Mank R. A., Antonise R. G. C. & Kik C. (2007): The long and winding road leading to the successful introgression of downy mildew resistance into onion. – *Euphytica* 156 (3): 345-353.
- Schulman A. H. (2007): Molecular markers to assess genetic diversity. – *Euphytica* 158 (3): 313-321.
- Smilde W. D., Van Heusden A. W. & Kik C. (1999): AFLPs in leek (*Allium porrum*) are not inherited in large linkage blocks. – *Euphytica* 110 (2): 127-132.
- Soltis D. E., Soltis P. S. & Tate J. A. (2004): Advances in the study of polyploidy since plant speciation. – *New phytologist* 161 (1): 173-191.
- Soltis P. S. & Soltis D. E. (2000): The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (13): 7051-7057.
- Soltis P. S. (2005): Ancient and recent polyploidy in angiosperms. – *New Phytologist* 166 (1): 5-8.
- Specht C. E. & Keller E. R. J. (1997): Temperature requirements for seed germination in species of the genus *Allium* L. – *Genetic Resources and Crop Evolution* 44 (6): 509-517.
- Speta F. (1984): Über Oberösterreichs wildwachsende Laucharten (*Allium* L., *Alliaceae*). – *Lenzer Biol. Beiträge* 16 (1): 45- 81.
- Stace C. A. (2000): Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. – *Taxon*: 451-477.

Stearn T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M. & Webb D. A. (1980): *Flora Europaea*, 5 volumes. – Cambridge University Press, Cambridge, 476 pp.

Stebbins G. L. (1950): Variation and evolution in plants. In: Soltis D. E., Soltis P. S. & Tate J. A. [eds.]: *Advances in the study of polyploidy since plant speciation*. – *New phytologist* 161 (1): 173-191.

Suda J. (2009): Darwinova „odporná záhada“ po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí krytosemenných rostlin. – *Živa* 57 (5): 204-208.

Šafářová L. (2011): Polyploidní komplex *Allium oleraceum* L. v Evropě. [PhD thesis, depon. in: Knihovna katedry botaniky, PřF UP Olomouc].

Šafářová L. & Duchoslav M. (2010): Cytotype distribution in mixed populations of polyploid *Allium oleraceum* measured at a microgeographic scale. – *Preslia* 82 (1): 107-126.

Šafářová L., Duchoslav M., Jandová M. & Krahulec F. (2011): *Allium oleraceum* in Slovakia: cytotype distribution and ecology. – *Preslia* 83 (4): 513-527.

Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V. & Koptíková J. (2010): *Metody molekulární biologie*. – Masarykova univerzita, 188 pp.

Šopova M. (1970): The occurrence and nature of B chromosomes in a population of *Allium margaritaceum*. In: Vujošević M., Jovanović V. & Blagojević J. [eds.]: *Polyploidy and b chromosomes in *Alium flavum* from Serbia*. – *Archives of Biological Sciences* 65 (1): 23-32.

Štajner D., Igić R., Popović B. M. & Malenčić D. (2008): Comparative study of antioxidant properties of wild growing and cultivated *Allium* species. – *Phytotherapy research* 22 (1): 113-117.

Takhtajan A. (1997): *Diversity and Classification of Flowering Plants*. – Columbia University Press, New York, 643 pp.

Takhtajan A. L. [ed.] (2006): *Conspectus florae Caucasi: volume 2*. – St Petersburg, Saint-Petersburg University Press, 495 pp.

- Tate J. A., Ni Z., Scheen A. C., Koh J., Gilbert C. A., Lefkowitz D. & Soltis D. E. (2006): Evolution and expression of homeologous loci in *Tragopogon miscellus* (*Asteraceae*), a recent and reciprocally formed allopolyploid. – *Genetics* 173 (3): 1599-1611.
- Tedeschi P., Bonetti G., Maietti A. & Brandolini V. (2014): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprint and antioxidants profile as markers for Tropea red onion (*Allium cepa* L.) authenticity. – *Journal of Food Composition and Analysis* 36 (1): 98-103.
- Thompson J. N. & Merg K. F. (2008): Evolution of polyploidy and the diversification of plant-pollinator interactions. – *Ecology* 89 (8): 2197-2206.
- Thompson J. N., Segraves K. A., Cunningham B. M., Althoff D. M. & Wagner D. (1997): Plant polyploidy and insect/plant interactions. – *The American Naturalist* 150 (6): 730-743.
- Trewick S. A., Morgan-Richards M., Russell S. J., Henderson S., Rumsey F. J., Pinter I. & Vogel J. C. (2002): Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA. – *Molecular Ecology* 11 (10): 2003-2012.
- Tucci G. F., Winfield M. O., D'Amato G. F., Gregori C., Trombetta B. & De Dominicis R. I. (2004): Genetic diversity in *Narcissus poëticus* L. and *N. radiiflorus* Salisb. (*Amaryllidaceae*) in two different populations: AFLP and karyological studies. – *Caryologia* 57 (4): 405-411.
- Tzanoudakis D. & Kypriotakis Z. (2008): *Allium brussalisii* (*Alliaceae*), a new species from Greece. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 158 (1): 140-146.
- Tzanoudakis D. & Vosa C. G. (1988): The cytogeographical distribution pattern of *Allium* (*Alliaceae*) in the Greek Peninsula and Islands. – *Plant systematics and evolution* 159 (3-4): 193-215.
- Umehara M., Sueyoshi T., Shimomura K., Iwai M., Shigyo M., Hirashima K. & Nakahara T. (2006): Interspecific hybrids between *Allium fistulosum* and *Allium schoenoprasum* reveal carotene-rich phenotype. – *Euphytica* 148 (3): 295-301.

- Van de Peer Y., Maere S. & Meyer A. (2009): The evolutionary significance of ancient genome duplications. – *Nature Reviews Genetics* 10 (10): 725-732.
- Vekemans X., Beauwens T., Lemaire M. & Roldán-Ruiz I. (2002): Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. – *Molecular ecology* 11 (1): 139-151.
- Vignal A., Milan D., SanCristobal M. & Eggen A. (2002): A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. – *Genetics Selection Evolution* 34 (3): 275-306.
- Volk G. M., Henk A. D. & Richards C. M. (2004): Genetic diversity among US garlic clones as detected using AFLP methods. – *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129 (4): 559-569.
- von Berg G. L., Samoylov A., Klaas M. & Hanelt P. (1996): Chloroplast DNA restriction analysis and the infrageneric grouping of *Allium* (*Alliaceae*). – *Plant systematics and evolution* 200 (3-4): 253-261.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – *Nucleic Acids Research* 23: 4407 - 4414.
- Vosa C. G. (1976): Heterochromatic banding patterns in *Allium*. – *Chromosoma* 57 (2): 119-133.
- Vosa C. G. (1996): Some aspects of karyotype evolution in *Liliiflorae*: heterochromatin variation and ecology in *Allium pulchellum*. – *Bocconeia* 5: 267-270.
- Vujošević M., Jovanović V. & Blagojević J. (2013): Polyploidy and b chromosomes in *Allium flavum* from Serbia. – *Archives of Biological Sciences* 65 (1): 23-32.
- Wang Z. & Moulton J. (2001): SNPs, protein structure, and disease. – *Human mutation* 17 (4): 263-270.
- Weising K., Nybom H., Wolff K. & Kahl G. (2005): DNA fingerprinting in plants: Principles, Methods, and Applications. – Taylor & Francis Group, 444 pp.

- Wheeler E. (2011): Phylogenetic and phylogenomic studies of wild onions (*Allium*, *Amaryllidaceae*) at three taxonomic scales. [Doctoral dissertation, depon. in: University of Missouri, Columbia].
- Wietsma W. A., Deinum D., Teunissen H. A. & van den Berg R. G. (2014): Phylogenetic relationships within *Fritillaria* section *Petilium* based on AFLP fingerprints. – *Plant Systematics and Evolution*: 1-12.
- Wilkie S. E., Isaac P. G. & Slater R. J. (1993): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. – *Theoretical and Applied Genetics* 86 (4): 497-504.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A. & Tingey S. V. (1990): SNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. – *Nucleic Acids Research* 18: 6531- 6535.
- Williams J. G., Hanafey M. K., Antoni Rafalski J. & Tingey S. V. (1993): Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. – *Methods in enzymology* 218: 704-740.
- 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.
- Wu L. L., Cui X. K., Milne R. I., Sun Y. S. & Liu J. Q. (2010): Multiple autopolyploidizations and range expansion of *Allium przewalskianum* Regel. (*Alliaceae*) in the Qinghai-Tibetan Plateau. – *Molecular Ecology* 19 (8): 1691-1704.
- Wyatt R., Odrzykoski I. J., Stoneburner A., Bass H. W. & Galau G. A. (1988): Allopolyploidy in bryophytes: multiple origins of *Plagiomnium medium*. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (15): 5601-5604.
- Xie W., Robins J. G. & Bushman B. S. (2012): A genetic linkage map of tetraploid orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) and quantitative trait loci for heading date. – *Genome* 55 (5): 360-369.

Yanagino T., Sugawara E., Watanabe M. & Takahata Y. (2003): Production and characterization of an interspecific hybrid between leek and garlic. – *Theoretical and Applied Genetics* 107 (1): 1-5.

Zeidler M. (1999): Genetic variability among populations of *Allium carinatum* subsp. *carinatum*. – *Thaiszia – J. Bot.* 9: 81–90.

Zeisek V. (2007): Fylogeografie a možnosti šíření vodních klonálních rostlin. [Bachelor thesis, depon. in: Katedra botaniky, PřF UK, Praha].

Zhang F., Chen S., Chen F., Fang W. & Li F. (2010): A preliminary genetic linkage map of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cultivars using RAPD, ISSR and AFLP markers. – *Scientia horticultrae* 125 (3): 422-428.