

Využití průtokové cytometrie k odhalení ohrožení vzácných rostlin hybridizací

Use of flow cytometry to detect threats to rare plants by hybridization

ZDENĚK KAPLAN^{1,2}, JINDŘICH CHRTEK^{1,2}, MAREK SLOVÁK^{2,3}, JAN PRANČL¹ & TOMÁŠ URFUS²

¹Botanický ústav AV ČR, v. v. i., Zámek 1, 25243 Průhonice, Česká republika; kaplan@ibot.cas.cz, chrtek@ibot.cas.cz, jan.pranc@ibot.cas.cz

²Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Benátská 2, 12800 Praha, Česká republika; tomas.urfus@natur.cuni.cz

³Botanický ústav, Centrum biologie rastlín a biodiverzity SAV, v.v.i., Dúbravská cesta 9, 84523 Bratislava, Slovenská republika; marek.slovak@savba.sk

Abstract: Interspecific hybridization is an important evolutionary process, but it also brings numerous risks to local populations. In endangered species, it can cause or accelerate the weakening or extirpation of their populations. Early detection of hybridization can therefore be crucial for the conservation of endangered species. Using 11 genera of the Czech and Slovak flora, we have analysed the potential and limitations of flow cytometry as a method to detect hybridization in populations of endangered plant species. We propose that flow cytometry be included as a routine method in nature conservation, particularly in the development of rescue programs for endangered species and for the management of important conservation sites.

Keywords: flow cytometry, hybridization, introgression, endangered species, gene flow, nature conservation

Abstrakt: Hybridizace je významný evoluční proces, který může generovat novou genetickou variabilitu nebo dokonce vznik nových druhů, ale na druhé straně přináší i četná rizika lokálním populacím. V případě ohrožených druhů může způsobit nebo urychlit oslabení až úplné vyhubení jejich populací. Včasná detekce kříženců proto může být pro záchranu ohrožených druhů klíčová. Na příkladu 11 rodů české a slovenské flóry analyzujeme výhody a omezení průtokové cytometrie jako metody k odhalení hybridizace v populacích ohrožených druhů rostlin. Doporučujeme, aby průtoková cytometrie byla zařazena mezi rutinní metody v ochraně přírody, zejména při zpracování záchranných programů ohrožených druhů a pro management ochrany významných lokalit.

Klíčová slova: průtoková cytometrie, hybridizace, introgrese, ohrožené druhy, genový tok, ochrana přírody

Nomenklatura/Nomenclature: KAPLAN et al. (2019)

Úvod

Hybridizace je proces, při kterém se dva různé druhy (nebo obecně různé genotypy) kříží a vzniká potomstvo, které kombinuje genetickou informaci rodičů (ARNOLD 1997, SOLTIS & SOLTIS 2009). To otvírá cestu mnoha evolučním procesům. Jedním z nich je speciace, kdy se nově vzniklá kombinace genů ukáže výhodná, uspěje v daném prostředí a dá tak postupně vzniknout novému druhu. Tento proces je u rostlin často doprovázen znásobením počtu chromozomů (polyploidizací), které pomůže obnovit fertilitu sterilních mezidruhových kříženců a zároveň zajistí okamžitou reprodukční bariéru pro nově vzniklou evoluční linii a její další samostatný vývoj. Někteří kříženci mohou také změnit způsob reprodukce a začnou vytvářet semena bez oplození (apomixie/agamospermie). Jiní kříženci mohou zůstat zcela sterilní, ale přesto uspět v daném prostředí a udržovat se bez pohlavního rozmnožování vegetativně, např. pomocí rozrůstání oddenků nebo výběžků.

Hybridizace může mít ale i negativní důsledky, zejména pro místní populace. Nově vzniklý hybrid může být díky kombinaci alel od dvou různě adaptovaných druhů biologicky zdatnější (např. odolnější nebo rychleji rostoucí) a díky konkurenční výhodě začít vytlačovat rostliny rodičovských druhů. Pokud je kříženec fertilní a nevytvoří se dostatečně účinná reprodukční bariéra, může docházet i ke zpětné hybridizaci, tedy k hybridizaci kříženců s jedinci čistých druhů. Tím vzniká bohatá mozaika rostlin s různými kombinacemi genů, která se nazývá hybridní roj. Z tohoto procesu může jeden z rodičovských druhů i profitovat, když prostřednictvím hybridizace a selekce dojde k přenosu výhodných alel z jednoho druhu na druhý (adaptivní introgrese). Většinou je ale existence hybridního roje pro původní populace spíše nebezpečím, protože pokud zpětná hybridizace probíhá dostatečně dlouho, mohou geneticky čisté rostliny jednoho nebo obou druhů z populace zcela vymizet. Populace rodičovských druhů ale mohou být ohroženy i v případech, kdy jsou kříženci sterilní a nedochází ke genetické erozi. Tím, že zbytečně investují do vzniku sterilního hybridního potomstva, se postupně oslabují a nevzniká dostatek fertilního potomstva pro obnovu populace (WOLF et al. 2001, TODESCO et al. 2016).

Tyto procesy mohou být velmi nebezpečné zvláště pro populace vzácných a ohrožených druhů (LEVIN et al. 1996, TODESCO et al. 2016). Ty jsou již samy o sobě často znevýhodněné, jsou vázány na ubývající a měnící se biotopy, mají malé a často i fragmentované populace, jsou pod tlakem konkurenčně zdatnějších rostlin včetně invazních, nebo jsou úzce specializované a neschopné přizpůsobit se rychlým změnám. Křížení s lépe adaptovanými, původními i nepůvodními druhy tak může představovat pověstný poslední hřebík do rakve populací vzácných rostlin (RHYMER & SIMBERLOFF 1996, TODESCO et al. 2016). Hybridizaci u ohrožených druhů je proto důležité průběžně monitorovat a v případě potřeby včas zahájit potřebná opatření k zabránění negativních důsledků. Hybridizaci není ale vždy snadné identifikovat. Určení přítomnosti hybridních rostlin v populaci podle vnějších morfologických znaků vyžaduje dostatečnou morfologickou diferenciaci rodičovských druhů a zpravidla i expertní znalost a dlouhodobou zkušenost pozorovatele. Hybridizaci mnohdy spolehlivě odhalí analýza DNA, příslušné metody jsou však stále časově a finančně nákladné a rovněž vyžadují expertní znalost pro správné vyhodnocení získaných dat.

Známky hybridizace lze pozorovat i na úrovni genomicko-karyologické, konkrétně prostřednictvím rozdílů ve velikosti jaderného genomu, počtu chromozomů a chromozomálních sad, které u rostlin vykazují vysokou variabilitu. Přímé počítání chromozomů je však časově náročné a vyžaduje odborné znalosti a zkušenosti v oblasti karyologie. Analyzování rozdílů ve velikosti genomu, ale také v počtu chromozomálních sad (ploidní úroveň) mezi populacemi podezřelými z hybridizace pomocí průtokové cytometrie může představovat rychlé, efektivní a technicky méně složité řešení. Na základě velikosti genomu je nejmarkantnější a relativně nejjednodušeji interpretovatelná hybridizace mezi druhy s odlišným počtem chromozomálních sad. V takovém případě má hybridní jedinec zpravidla nejen počet chromozomů, ale i velikost genomu přechodnou mezi oběma rodiči. Analýza velikosti genomu může být užitečná i při hybridizaci taxonů se stejným počtem chromozomů (homoploidní hybridizace), avšak vyžaduje dostatečný rozdíl ve velikosti genomu mezi rodiči. Stanovení velikosti genomu a ploidní úrovně je možné pomocí metod založených na průtokové cytometrii. V naší studii analyzujeme a diskutujeme možnosti a omezení využití této metody pro detekci hybridů v populacích ohrožených druhů rostlin.

Průtoková cytometrie je analytická laboratorní technika používaná k měření fyzikálních a chemických charakteristik jednotlivých částic. V případě využití v botanice jsou analyzována uvolněná jádra buněk obarvená fluorescenčním barvivem, přičemž množství navázaného barviva, resp. jeho fluorescence, odpovídá množství celkové jaderné DNA. Vzorek je suspendován v tekutině a vstřikován tenkým proudem do průtokového cytometru, kde dochází k interakci mezi jádry a laserovým paprskem. Z parametrů prošlého, vyzářeného a rozptýleného světla lze určit velikost genomu, která je v mnoha případech druhově specifickým znakem. Porovnáním velikostí genomů měřených vzorků lze tak někdy stanovit příslušnost vzorků k jednotlivým druhům nebo i křížencům. Ačkoliv neposkytuje obdobnou míru spolehlivosti detekce mezidruhových hybridů jako sekvenování DNA, velkou výhodou průtokové cytometrie je její rychlost, technická nekomplikovanost a nízká finanční náročnost (SUDA 2005, GALBRAITH et al. 2021).

Materiál a metody

Rostlinný materiál

Na základě našich předchozích zkušeností a údajů v literatuře (podrobnosti viz URFUS et al. 2025) jsme vybrali 14 dvojic druhů z rodů chlupáček (*Pilosella*), koniklec (*Pulsatilla*), kopřiva (*Urtica*), kyčelnice (*Dentaria*), lakušník (*Ranunculus* sect. *Batrachium*), oměj (*Aconitum*), prstnatec (*Dactylorhiza*), rdest (*Potamogeton*), sítina (*Juncus*), šášina (*Schoenus*) a vrbovka (*Epilobium*), u kterých byla v České republice (a v případě rodu *Dentaria* na Slovensku) známá nebo alespoň předpokládaná hybridizace. Jeden druh z každé dvojice je přitom vždy součástí Červeného seznamu v kategoriích kriticky ohrožený (C1), silně ohrožený (C2) nebo ohrožený (C3) (GRULICH 2012), druhý druh z dvojice je na našem území častější, v některých případech je ale také zařazen na Červeném seznamu. Pokryty byly jak případy dvojic druhů se stejným (homoploidní hybridizace), tak odlišným chromozomovým číslem (heteroploidní hybridizace). Vzhledem k tomu, že průtoková cytometrie je nedestruktivní metoda, byl zpravidla k analýzám odebrán jen jeden list nebo část listu. Nomenklatura a vymezení taxonů odpovídá Klíči ke květeně ČR (KAPLAN et al. 2019). Převážně z tohoto zdroje byly převzaty i základní charakteristiky níže pojednávaných druhů.

Průtoková cytometrie

Stanovení relativní, resp. absolutní, velikosti genomu probíhalo v Sudově laboratoři průtokové cytometrie Katedry botaniky PřF UK a v laboratoři průtokové cytometrie v Botanickém ústavu AV ČR v Průhonících. Pro izolaci a barvení jader byla zvolena modifikovaná metodika podle DOLEŽEL et al. (2007). Každý vzorek byl spolu s adekvátním interním standardem rozsekán ostrou žiletkou v 0,5 ml vychlazeného pufru Otto I. Suspenze jader byla posléze přefiltrována přes uhelon (velikost oka 42 μ m). Ke vzorku byl následně přidán 1 ml barvicího roztoku (pufr Otto II + DAPI, resp. Otto II + PI + RNáza). Výsledné histogramy byly analyzovány v programu FloMax.

Výsledek

Podrobné výsledky a odkazy na dílčí literaturu k jednotlivým rodům jsou uvedeny v samostatném článku (URFUS et al. 2025). Zde se zaměříme na popis jednotlivých skupin a zhodnocení potenciálu využití průtokové cytometrie k detekci hybridů.

Chlupáčky (*Pilosella*) jsou rod známou významnou rolí hybridizace v jeho evoluci. Většina druhů je polyploidních s různým podílem apomiktického rozmnožování, přičemž si ale ponechávají i schopnost sexuálního rozmnožování a mohou se tak účastnit další hybridizace. Pro účely naší studie jsme provedli detailní analýzu ve třech smíšených populacích. Na Kamenné hoře u Rýmařova jsme studovali smíšenou populaci sexuálního diploidního ($2n = 18$) ch. oněžského (*P. onegensis*) a apomiktického tetraploidního ($2n = 36$) ch. oranžového (*P. aurantiaca*), a v PP Zámky a PP Baba na okraji Prahy smíšené populace sexuálního diploidního ($2n = 18$) cytotypu ch. hadincovitého (*P. echioides*) a sexuálního tetraploidního ($2n = 36$) cytotypu ch. zedního (*P. officinarum*). Na všech třech lokalitách jsme identifikovali rostliny s velikostí genomu odpovídající triploidům, které představovaly primární hybridy (obr. 1).

Koniklece (*Pulsatilla*) patří mezi vzácné a ohrožené rostliny. Zaměřili jsme se na hybridizaci mezi dvěma diploidními ($2n = 16$) druhy: k. otevřeným (*P. patens*), který je kriticky ohrožený, a k. lučním českým (*P. pratensis* subsp. *bohémica*), který je silně ohrožený. Jejich kříženci byli studováni na Humnickém vrchu v Doupovských horách (obr. 2). Přestože rodičovské druhy mají identický počet chromozomů, relativní velikost genomu se liší asi o 19 %, což umožňuje i detekci jejich kříženců, kteří mají intermediární hodnoty (obr. 3).

U kopřiv (*Urtica*) jsme se zaměřili na hybridizaci kriticky ohrožené diploidní ($2n = 26$) k. lužní (*U. kioviensis*) s diploidním ($2n = 26$) a tetraploidním ($2n = 52$) cytotypem běžné k. dvoudomé (*U. dioica*). Hybridy jsme detekovali v PR Plačkův les u Ivaně v úvalu dolní Svatky a v NPR Ranšpurk na soutoku Dyje a Moravy u Lanžhota, a dále také v NPR Šúr u Bratislavy (obr. 4). Zatímco identifikace triploidních kříženců vzniklých z heteroploidní



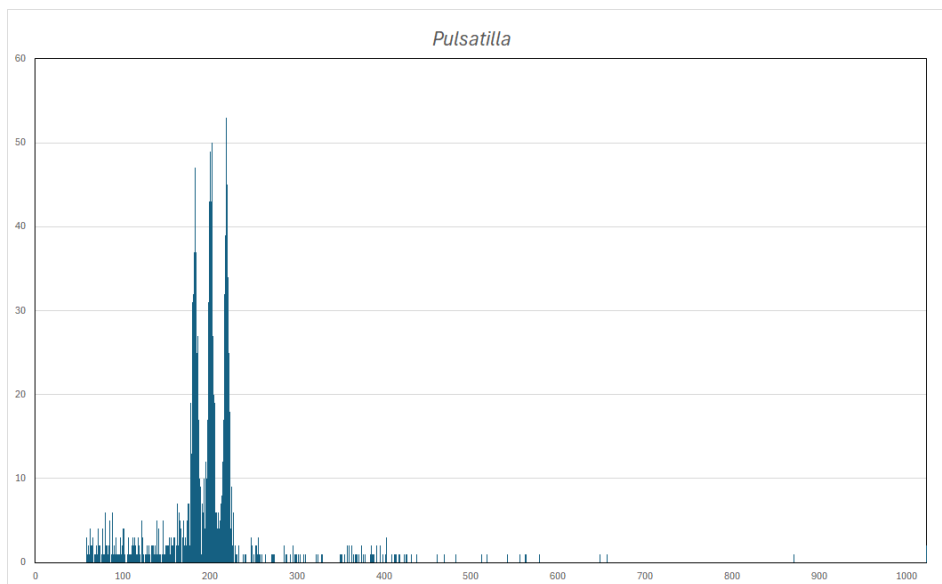
Obr. 1. Chlupáček dvouvidličný (*Pilosella* ×*bifurca*), který vznikl křížením ch. hadincového (*Pilosella echioioides*) a ch. zedního (*P. officinarum*) v PP Zámky na severním okraji Prahy (2. 6. 2024 foto Jindřich Chrtěk).

Fig. 1. A hybrid of *Pilosella echioioides* and *P. officinarum* (*Pilosella* ×*bifurca*) in the Zámky Nature Monument in the northern outskirts of Prague (2. 6. 2024 photo by Jindřich Chrtěk).

Obr. 2. Koniklec otevřený (*Pulsatilla patens*) na Humnickém vrchu v Doupovských horách (1. 4. 2023 foto Tomáš Urfus). Zde a na sousedním vrchu Havran se vyskytuje v rozsáhlé smíšené populaci s k. lučním českým (*P. pratensis* subsp. *bohémica*), kde se vyskytuje i jejich kříženec *P. ×hackellii*.

Fig. 2. *Pulsatilla patens* on Havran hill in the Doupovské hory hills (1. 4. 2023 photo by Tomáš Urfus). Havran and the adjacent Humnický vrch hill host large mixed populations of *P. patens* and *P. pratensis* subsp. *bohémica* with occurrence of their hybrid *P. ×hackellii*.





Obr. 3. Grafický výstup (histogram) z měření velikosti genomu u homoploidní hybridizace s dostatečnou diferenciací ve velikosti genomu. Tři nejvyšší hodnoty odpovídají měřeným taxonům, krajní hodnoty rodičovským druhům koniklec otevřený (*Pulsatilla patens*) a k. luční český (*P. pratensis* subsp. *bohemica*), zatímco střední hodnota jejich kříženci.

Fig. 3. Histogram from genome size measurement of plants from a mixed *Pulsatilla* population involving homoploid hybridization with sufficient differentiation in genome size. The outer values correspond to the parental species (*P. patens* and *P. pratensis* subsp. *bohemica*), while the middle value corresponds to their hybrid (*P. ×hackelii*).



Obr. 4. Kopřiva lužní (*Urtica kioviensis*) v podrostu rozsáhlých olšin v NPR Šúr u Bratislavy (13. 10. 2021 foto Tomáš Urfus). Zde se nachází pravděpodobně největší populace tohoto druhu ve střední Evropě. V nitrofilních lemech rezervace dochází k hybridizaci s diploidním cytotypem kopřivy dvoudomé (*U. dioica* subsp. *subinermis*).

Fig. 4. *Urtica kioviensis* in the undergrowth of an alder carr in the Šúr National Nature Reserve near Bratislava (13. 10. 2021 photo by Tomáš Urfus). This site hosts probably the largest population of this species in central Europe. In the nitrophilous edges of the reserve *U. kioviensis* hybridizes with the diploid *U. dioica* subsp. *subinermis*.

hybridizace byla jednoznačná, na diploidní úrovni byla mezidruhovná diferenciace v relativní velikosti genomu malá, zjištěné hodnoty tvořily téměř kontinuum a rozlišení kříženců od geneticky čistých druhů bylo mnohdy arbitrární.

Rod kyčelnice (*Dentaria*; v zahraniční literatuře často hodnocen jako součást rodu *Cardamine*) je u nás zastoupen třemi karyologicky i morfologicky velmi dobře diferencovanými druhy, což umožňuje snadnou detekci jejich kříženců. V ČR byl zjištěn kříženec k. devítilisté (*D. enneaphylos*; dekaploid, $2n = 80$) a k. žláznatý (*D. glandulosa*; hexaploid, $2n = 58$). Zatímco první z jmenovaných druhů se vyskytuje především v pohořích střední a jižní Evropy, druhý je karpatským subendemitem, do ČR zasahuje pouze na východní Moravu, kde probíhá západní hranice celkového areálu; u nás je zařazen mezi ohrožené druhy. Smíšená populace s výskytem kříženců byla studována na Slovensku na Muránské planině nad vsí Muránska Huta. Vzhledem k ploidní diferenciaci rodičovských druhů intermediární hodnoty relativní velikosti genomu potvrdily morfologickou identifikaci hybridních rostlin. Nejedná se ale o hybridní roj, jak naznačuje morfologická variabilita, ale spíše o hybridy první generace.

Lakušníky (*Ranunculus* sect. *Batrachium*) jsou jednou z linií pryskyřníků adaptovaných k životu ve vodě. Na jejich speciaci se velkou měrou podílely hybridizace a polyploidizace. Vzniklé druhy se dále účastní hybridizace (jak homoploidní, tak heteroploidní), někteří kříženci jsou částečně fertili a může tak docházet i ke zpětnému křížení (introgresi). Zaměřili jsme se na hybridizaci mezi dvěma velmi podobnými druhy, silně ohroženým diploidním ($2n = 16$) l. Rionovým (*R. rionii*) a běžnějším tetraploidním ($2n = 32$) l. nitolistým (*R. trichophyllus*). Jejich křížence jsme detekovali v rybníku Jordán u pražských Hrnčičů (obr. 5). Vzhledem k ploidní diferenciaci rodičovských druhů byla identifikace triploidních kříženců pomocí průtokové cytometrie snadná.

U omějů (rod *Aconitum*) dochází na našem území k hybridizaci diploidního ($2n = 16$) o. pestrého (*A. variegatum*) s tetraploidními ($2n = 32$) taxony z okruhu *A. napellus* agg. V Krkonoších jsme analyzovali smíšené populace o. pestrého s o. šalamounkem (*A. plicatum*), zatímco v Moravskoslezských Beskydech s o. tuhým moravským (*A. firmum* subsp. *moravicum*). Všechny uvedené taxony mají relativně malé areály ve střední Evropě a v ČR jsou zařazeny na Červeném seznamu, o. tuhý moravský v kategorii silně ohrožených taxonů, zbývající dva v kategorii ohrožených taxonů. Křížence o. šalamounku a o. pestrého jsme v Krkonoších našli u Rýchorské studánky nad Horním Maršovem (obr. 6). Díky ploidní diferenciaci mezi rodičovskými druhy bylo možné pomocí relativní velikosti genomu triploidní křížence snadno odlišit od rostlin obou rodičovských druhů (obr. 7). Obdobné rozdíly jsme zjistili i při analýzách beskydských rostlin, kde hybridní rostliny o. tuhého moravského s o. pestrým od osady Kyčera nad Horní Bečvou měly intermediární relativní velikost genomu mezi rodičovskými taxony.

V rodu prstnatec (*Dactylorhiza*) velkou část diverzity tvoří alotetraploidy vzniklé po hybridizaci diploidního p. pleťového (*D. incarnata*) a diploidních nebo tetraploidních zástupců okruhu p. plamatého (*D. maculata* agg.). Do této skupiny patří i tetraploidní ($2n = 80$) p. český (*D. bohémica*), který je endemitem Jestřebských slatin na Českolipsku. Na své jediné lokalitě se vyskytuje spolu s diploidním ($2n = 40$) p. pleťovým pozdním (*D. incarnata* subsp. *pulchella*) a tetraploidním ($2n = 80$) p. plamatým pravým (*D. maculata* subsp. *maculata*; obr. 8). Všechny tři taxony jsou kvůli své vzácnosti hodnoceny jako kriticky ohrožené. Na základě porovnání morfologických znaků byla identifikována zpětná hybridizace mezi p. českým a p. plamatým. Tato hybridizace se odehrává na stejné ploidní úrovni. Zjištěné hodnoty relativní velikosti genomu v této hybridní populaci tvoří kontinuum, odlišení hybridních rostlin od geneticky čistých jedinců pomocí průtokové cytometrie proto není možné.



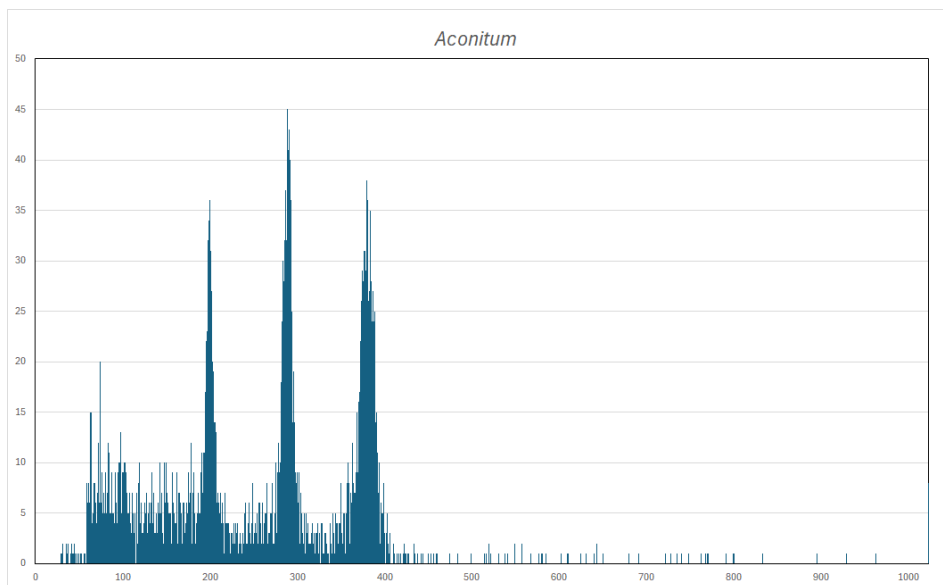
Obr. 5. Rybník Jordán v PP Hrnčířské louky na okraji Prahy, se smíšenou populací lakušníku štítnatého (*Ranunculus peltatus*), l. nitolistého (*R. trichophyllus*), l. Rionova (*R. rionii*) a křížence l. nitolistého a l. Rionova (24. 5. 2023 foto Jan Pránčl).

Fig. 5. Jordán fishpond in the Hrnčířské louky Nature Monument in the outskirts of Prague, with a mixed population of *Ranunculus peltatus*, *R. trichophyllus*, *R. rionii* and the hybrid *R. rionii* × *R. trichophyllus* (24. 5. 2023 photo by Jan Pránčl).



Obr. 6. Oměj šalamounek (*Aconitum plicatum*) z rozsáhlé smíšené populace s omějem pestrým (*A. variegatum*) v okolí Rýchorské boudy v Krkonoších, v níž byli detekováni také kříženci (3. 8. 2023 foto Tomáš Urfus).

Fig. 6. *Aconitum plicatum* in a large mixed population of *A. plicatum* and *A. variegatum* near the Rýchorská bouda chalet in the Krkonoše Mts, which includes hybrids of these species (3. 8. 2023 photo by Tomáš Urfus).



Obr. 7. Grafický výstup z měření velikosti genomu u heteroploidní hybridizace s velkou diferenciací ve velikosti genomu. Tři nejvyšší hodnoty odpovídají měřeným taxonům, krajní hodnoty rodičovským druhům oměj šalamounek (*Aconitum plicatum*) a o. pestrý (*A. variegatum*), zatímco střední hodnota jejich kříženci.

Fig. 7. Histogram from genome size measurement of plants from a mixed *Aconitum* population involving heteroploid hybridization with considerable differentiation in genome size. The outer values correspond to the parental species (*A. plicatum* and *A. variegatum*), while the middle value corresponds to their hybrid (*A. ×exaltatum*).

Obr. 8. Prstnatec plamatý (*Dactylorhiza maculata*) v NPR Jestřebské slatiny (26. 6. 2017 foto Tomáš Urfus). Zejména části s historickými názvy Shnilé louky a Baronský rybník hostí rozsáhlou smíšenou populací *D. bohémica* a *D. maculata* a jejich křížence *D. ×prochazkana*.

Fig. 8. *Dactylorhiza maculata* in the Jestřebské slatiny National Nature Reserve (26. 6. 2017 photo by Tomáš Urfus). The sites known as Shnilé louky and Baronský rybník host a large mixed population of *D. bohémica* and *D. maculata* and their hybrid *D. ×prochazkana*.

Rdesty (*Potamogeton*) jsou druhou skupinou vodních rostlin zahrnutou do této studie. Tento rod je známý vysokou diverzitou kříženců. V ČR bylo dosud identifikováno 11 hybridních kombinací. Nejčastější jsou homoploidní kříženci. Pro tuto studii jsme vybrali dvě hybridní kombinace na tetraploidní úrovni ($2n = 56$). Kříženec r. alpského (*P. alpinus*) a r. prorostlého (*P. perfoliatus*) byl nalezen ve Vltavě u Vyššího Brodu (obr. 9), kříženec r. trávolistého (*P. gramineus*) a r. světlého (*P. lucens*) v zatopené opuštěné pískovně u Hradčan na Mimoňsku. Všechny dotčené druhy jsou na Červeném seznamu. Diferenciace ve velikosti genomu mezi příslušnými dvojicemi je malá, variační rozpětí mají velké přesahy a hodnoty uvedených kříženců spadají do těchto rozpětí. Průtokovou cytometrií proto v těchto případech nelze k identifikaci hybridů využít.

Mezi sítinami (rod *Juncus*) jsme se zaměřili na okruh s. článkované (*J. articulatus* agg.), který je u nás zastoupen třemi vzájemně podobnými druhy: diploidní ($2n = 40$) s. ostrokvětou (*J. acutiflorus*), rovněž diploidní s. alpskou (*J. alpinoarticulatus*) a tetraploidní ($2n = 80$) s. článkovanou (*J. articulatus*). Kromě běžné s. článkované jsou zbyvajících dva diploidní druhy výrazně vzácnější, geograficky i ekologicky omezené a řazené mezi ohrožené druhy. Při terénním průzkumu byly nalezeny všechny tři možné hybridní kombinace. Hybrid mezi diploidními druhy byl zaznamenán v severních Čechách na Jestřebských slatinách a u Břežňského a Heřmanického rybníka. I přes identický počet chromozomů se oba druhy liší v relativní velikosti genomu asi o 15 % a jejich kříženci zaujímají intermediární hodnoty. Ještě lépe jsou identifikovatelní zbyvajících dva kříženci mezi druhy s různou ploidní úrovní: v obou případech měly hybridní rostliny relativní velikost genomu odpovídající triploidům. Hybrid s. ostrokvěte a s. článkované byl zjištěn na břehu rybníka Nový u Studánky v Ašském výběžku a poblíž rybníka Holná u Roseče na Třeboňsku; nejčastější je ovšem kříženec s. alpské a s. článkované, zjištěný na deseti lokalitách. Hybridi sítin, ač zřejmě zcela sterilní, se na lokalitách dokážou šířit vegetativně a v některých případech byli nalezeni i bez přítomnosti jednoho nebo obou rodičovských druhů.

Rod šášina (*Schoenus*) je u nás zastoupen dvěma druhy. Oba druhy jsou velmi vzácné relikty slatin, řazené mezi kriticky ohrožené taxony. Jejich kříženec byl na lokalitách společného výskytu uváděn už od 19. století. Přestože se oba druhy liší v počtu chromozomů (š. načernalá, *S. nigricans*, má $2n = 44, 54$, zatímco š. rezavá, *S. nigricans*, $2n = 76$), zjištěné relativní velikosti genomu se překvapivě liší jen o 1–8 %, což neumožňuje identifikaci kříženců.

Vrbovky (*Epilobium*) jsou dalším rodem, jehož druhy se snadno účastní hybridizace. V ČR bylo dosud zaznamenáno 48 hybridních kombinací. Kříženci byli zaznamenáni i s účastí vzácných horských druhů vrbovek. Při průzkumu šumavských pramenišť a rašelinišť byl zaznamenán také kříženec v. nicí (*E. nutans*) a v. tmavé (*E. obscurum*). První z těchto rodičovských druhů je dnes velmi vzácný, s nemnoha lokalitami v centrálních částech Šumavy, Krkonoš a Hrubého Jeseníku; patří mezi silně ohrožené druhy. Druhý je výrazně více rozšířený, vyskytuje se v podhůří a horách na většině území ČR; kvůli vazbě na mokřadní stanoviště ale z některých území vymizel a je řazen mezi ohrožené druhy. Oba druhy sdílejí stejný počet chromozomů ($2n = 36$), přesto se relativní velikost genomu mezi oběma druhy liší přibližně o 8 %. Na lokalitě Pod Kostelním vrchem nedaleko od Srní (obr. 10) jsme našli křížence obou druhů, který měl intermediární velikost genomu mezi oběma rodičovskými druhy.

Diskuse

Test využití průtokové cytometrie pro detekci hybridů s účastí ohrožených druhů ukázal, že možnosti úspěšného využití této metody se velmi různí v závislosti na studovaném materiálu. U heteroploidní hybridizace průtoková cytometrie zpravidla odhalí intermediární hybridní cytotypy (obr. 7), jejichž velikost genomu odráží součet příspěvků od gamet rodičovských druhů. Je však nutná opatrnost při interpretaci výsledků, aby za křížence nebyly mylně považovány např. autotriploidní rostliny odvozené od diploidního rodiče. Tyto případy lze někdy odlišit kvantitativním porovnáním dávek genomu od jednotlivých zvažovaných druhů. Rovněž je nutné počítat s tím, že jednosměrná zpětná hybridizace



Obr. 9. Vltava u Vyššího Brodu v Předšumaví, kde se vyskytuje velmi vzácný kříženec rdestu alpského (*Potamogeton alpinus*) s rdestem prorostlým (*P. perfoliatus*) (25. 9. 2013 foto Zdeněk Kaplan).

Fig. 9. Vltava river near Vyšší Brod in the foothills of the Šumava Mts is one of a few sites globally with the occurrence of the hybrid *Potamogeton alpinus* × *P. perfoliatus* (25. 9. 2013 photo Zdeněk Kaplan).



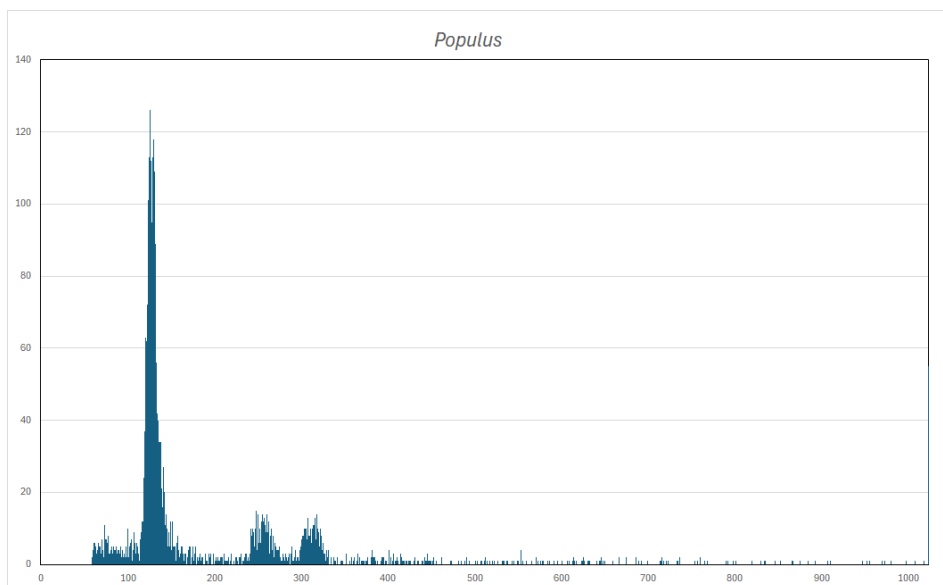
Obr. 10. Prameniště v národním parku Šumava, na okraji lesního rašeliniště v I. zóně Pod Kostelním vrchem, kde se vyskytuje kříženec vrbovky nízké (*Epilobium nutans*) s vrbovkou tmavou (*E. obscurum*) (11. 6. 2024 foto Zdeněk Kaplan).

Fig. 10. Spring at an edge of a forest peat bog in the Pod Kostelním vrchem nature conservation zone in the Šumava Mts with the occurrence of the hybrid *Epilobium nutans* × *E. obscurum* (11. 6. 2024 photo by Zdeněk Kaplan).

posouvá velikost genomu směrem k jednomu z rodičovských druhů. Obtížnější je situace u homoploidní hybridizace, kde možnost detekce hybridů průtokovou cytometrií závisí na míře diferenciace ve velikosti genomu rodičovských druhů (obr. 3). V případě malých rozdílů nelze skutečné hybridy od čistých rodičovských druhů spolehlivě rozlišit (obr. 11) a je nutné využít další, zpravidla molekulární metody. Zvláště obtížná situace je pak v případě zpětného křížení primárních hybridů s rostlinami rodičovských druhů za vzniku hybridních rojů s kontinuální fenotypovou variabilitou i variabilitou ve velikosti jaderného genomu.

Průtoková cytometrie má sice jistá omezení, nicméně nepochybně skýtá nemalý potenciál využití v ochraně přírody. Antropogenní tlak na lokality a populace i nadále vzrůstá a nově se do kontaktu dostávají i dříve vzájemně izolované populace druhů. Tento problém je ještě komplikován stupňujícím se počtem případů nově zavlečených nepůvodních druhů, včetně druhů invazních. Vznikají tak nové hybridní zóny, které mohou ohrožovat populace původních vzácných druhů.

Při zvažování využití průtokové cytometrie pro detekci kříženců je vždy nutné individuálně posuzovat každý konkrétní případ. Nejdříve je vhodné se podívat do přehledu velikostí genomu druhů české flóry (ŠMARDÁ et al. 2019), zda se potenciální rodičovské druhy v tomto znaku dostatečně liší a je tedy naděje, že by se mohli lišit i jejich kříženci. Výhodou průtokové cytometrie je, že je relativně časově i finančně nenáročná a poskytuje první výsledky v krátkém čase po iniciálním testování. Následně lze upravit přístup a zařadit další nezbytné kroky a metody pro řešení daného případu. Doporučujeme proto zařadit průtokovou cytometrii jako rutinní metodu do záchranných programů ohrožených druhů a při zpracování managementu ochrannářsky významných lokalit. Naše cytometrické laboratoře v Botanickém ústavu AVČR v Průhonicích a na katedře botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy jsou připraveny na takových projektech spolupracovat.



Obr. 11. Grafický výstup z měření velikosti genomu u homoploidní hybridizace s nedostatečnou diferenciací ve velikosti genomu. Naměřené hodnoty u zástupců topolů (*Populus*) jsou příliš blízko sebe a neumožňují rozlišení kříženců.

Fig. 11. Histogram from genome size measurement of *Populus* plants with insufficient differentiation in genome size, which does not allow detection of hybrids.

Summary

The successful application of flow cytometry in the detection of hybrids varies greatly depending on the material studied. In heteroploid hybridization, flow cytometry usually reveals those intermediate hybrid cytotypes whose genome size reflects the sum of contributions from the gametes of the parental species. However, caution is needed in interpreting the results, so that autotriploid plants derived from a diploid parent are not mistaken for hybrids. In addition, the unidirectional introgression shifts the genome size towards that of one parent. The situation is more difficult in homoploid hybridization, where the potential for hybrid detection by means of flow cytometry depends on the degree of differentiation in the genome size of the parental species. In the case of small differences, the hybrids cannot be reliably distinguished from the pure parental species and an additional source of evidence, usually coming from molecular methods, must be used. When considering the use of flow cytometry for the detection of hybrids, it is therefore always necessary to assess each case individually. All in all, in nature conservation, this method shows potential. Speed and low costs are its main advantages when compared with other analytical methods.

Poděkování

Tento článek vznikl jako výsledek řešení projektu č. SS05010035 „Průtoková cytometrie jako efektivní a úsporná metoda pro detekci hybridizace a genetické eroze ohrožených druhů rostlin“ od Technologické agentury ČR v rámci programu Prostředí pro život, a s podporou na dlouhodobý koncepční rozvoj Botanického ústavu AV ČR, v. v. i., RVO: 67985939. Děkujeme Adéle Varvažovské, Lence Kuchyňkové, Kristýně Šemberové, Haně Šípkové a Pavlu Trávníčkovi za pomoc v laboratoři a Jaromíru Kučerovi, Nastasje Shubina, Janu Ponertovi, Radku Štenclovi, Anetě Tröglerové, Lence Kuchyňkové, Nele Gloríkové, Milanu Štechovi a Romaně Roučkové za pomoc se sběrem vzorků rostlin. Recenzentům Patriku Mrázovi a Karolu Marholdovi děkujeme za přečtení první verze a návrhy úprav.

Literatura

- ARNOLD M. L. (1997): Natural hybridization and evolution. – Oxford University Press, New York.
- DOLEŽEL J., GREILHUBER J. & SUDA J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – Nature Protoc. 2: 2233–2244.
- GALBRAITH D., LOUREIRO J. & ANTONIADI I. [eds] (2021): Best practices in plant cytometry. – Cytometry 99: 311–317.
- GRULICH V. (2012): Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. – Preslia 84: 631–645.
- KAPLAN Z., DANIHELKA J., CHRTEK J. jun., KIRSCHNER J., KUBÁT K., ŠTECH M. & ŠTĚPÁNEK J. [eds] (2019): Klíč ke květeně České republiky. Ed. 2. – Academia, Praha.
- LEVIN D. A., FRANCISCO-ORTEGA J. & JANSEN R. K. (1996): Hybridization and the extinction of rare plant species. – Conserv. Biol. 10: 10–16.
- RHYMER J. M. & SIMBERLOFF D. (1996): Extinction by hybridization and introgression. – Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst. 27: 83–109.
- SOLTIS P. S. & SOLTIS D. E. (2009): The role of hybridization in plant speciation. – Ann. Rev. Plant Biol. 60: 561–588.
- SUDA J. (2005): Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. – Živa 53/1: 46–48.
- ŠMARDA P., KNÁPEK O., BŘEZINOVÁ A., HOROVÁ L., GRULICH V., DANIHELKA J., VESELÝ P., ŠMERDA J., ROTREKLOVÁ O. & BUREŠ P. (2019): Genome sizes and genomic guanine+cytosine (GC) contents of the Czech vascular flora with new estimates for 1700 species. – Preslia 91: 117–142.
- TODESCO M., PASCUAL M. A., OWENS G. L., OSTEVIK K. L., MOYERS B. T., HÜBNER S., HEREDIA S. M., HAHN M. A., CASEYS C., BOCK D. G. & RIESEBERG L. H. (2016): Hybridization and extinction. – Evol. Appl. 9: 892–908.
- URFUS T., CHRTEK J., KAPLAN Z., PRANČL J., TRÁVNÍČEK P. & SLOVÁK M. (2025): Flow cytometry in conservation: detecting hybridisation risks in threatened plant species. – Biodivers. Conserv. (nyní v recenzním řízení).

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