

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Reprodukční systémy polyploidního komplexu

Hieracium prenanthoides

Bc. Jiří Kocián

Diplomová práce

předložená

na Katedře botaniky

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků

na získání titulu Mgr. v oboru

Botanika

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Martin Dančák, Ph.D.

Konzultant práce: Mgr. Jindřich Chrtek, CSc.

Olomouc 2013

Kocián J. (2013): Reprodukční systémy polyploidního komplexu *Hieracium prenanthoides*. Magisterská práce, Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 65 pp, v češtině.

Abstrakt

Jestřábník věsenkovitý (*Hieracium prenanthoides* agg.) je velmi variabilní polyploidní druhový agregát. Práce se zabývá studiem reprodukčních systémů dvaceti šesti populací různých ploidii a morfotypů z území Francie, České republiky a Slovenska. Byly provedeny palynologické analýzy a zjištěn způsob vzniku semen v přírodních populacích i semen vzniklých experimentálním křížením. Dvě třetiny populací tvořily pyl, většina ve velkém množství, ovšem s průměrnou viabilitou jen 40 %. Alexandrovo barvení vykazovalo falešně pozitivní výsledky, tetrazoliový test naopak falešně negativní; barvení acetokarmínem se ukázalo jako nejspolehlivější pro zjištění pylové viability. Pyl všech analyzovaných rostlin měl heterogenní velikost. Naprostá většina semen polyploidů jak z přírodních populací, tak po experimentálním křížení vznikla apomikticky – embrya měla stejnou ploidii jako mateřské rostliny a endosperm s dvojnásobným obsahem DNA oproti somatickým buňkám. U tetraploidních populací byly zaznamenány tři ojedinělé výjimky: 1) semeno s tetraploidním embryem a hexaploidním endospermem, 2) semeno s oktoploidním embryem, a 3) semeno s pentaploidním embryem. Výsledky jsou diskutovány zejména v evolučním kontextu druhu i celého rodu *Hieracium*.

Klíčová slova: apomixie, mikrosporogeneze, pylová viabilita, barvení pylu, Alexandrovo barvivo, TTC test, acetokarmín, ploidie, embryo, endosperm, hybridizace, reziduální sexualita, mentor efekt, pentaploidie

Kocián J. (2013): Reproduction systems of the *Hieracium prenanthoides* polyploid complex. Master thesis, Department of Botany, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, 65 pp., in Czech.

Abstract

Prenanth hawkweed (*Hieracium prenanthoides* agg.) is a highly polymorphic polyploid aggregate species. The thesis focuses on a reproduction systems of twenty six populations of different ploidy and morphology originating from France, the Czech Republic and Slovakia. Palynological analyses were carried out and the mode of seed development was determined both in natural populations and in seeds originated via experimental hybridization. Two thirds of populations produced pollen, most of them in a big amount, however, with the mean viability of only 40 %. Alexander stain showed false positive results, on the other hand tetrazolium test showed false negative results; acetocarmine stain was determined as the most reliable pollen viability stain. Pollen of all analysed plants was of heterogenous size. The vast majority of seeds of polyploid plants, both from natural populations and from experimental hybridization, rised via apomixis – the embryos had the same ploidy as the mother plants and the endosperms with double-somatic DNA content. Three rare exceptions were detected in tetraploid populations: 1) a seed with tetraploid embryo and hexaploid endosperm, 2) a seed with octoploid embryo, and 3) a seed with pentaploid embryo. The results are discussed in the species as well as the whole *Hieracium* genus evolutionary context.

Keywords: apomixis, microsporogenesis, pollen viability, pollen staining, Alexander stain, TTC test, acetocarmine, ploidy, embryo, endosperm, hybridization, residual sexuality, mentor effect, pentaploidy

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Martina Dančáka, Ph.D. a uvedl jsem všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpal.

V Olomouci 8. srpna 2013

Podpis:

Obsah

Seznam tabulek	viii
Seznam obrázků	ix
Poděkování	x
1. Úvod	1
1.1. Apomixie	1
1.2. Rod <i>Hieracium</i>	2
1.3. <i>Hieracium prenanthoides</i> agg.	4
2. Cíle práce	6
3. Materiál a metody	7
3.1. Původ a taxonomická pozice studovaných rostlin	7
3.1.1. Ploidie pokusných rostlin	10
3.2. Pylové analýzy	10
3.2.1. Tvorba pylu a její kvantifikace	11
3.2.2. Velikost pylových zrn	11
3.2.2. Pylová viabilita	11
3.2.2.1. Alexandrovo barvení	11
3.2.2.2. Tetrazoliový test	12
3.2.2.3. Barvení acetokarmínem	12
3.3. Reprodukční systémy	13
4. Výsledky	14
4.1. Pylové analýzy	14
4.2. Způsob vzniku semen polyploidních rostlin přírodních populací	18
4.2.1. Způsob vzniku semen triploidů	18
4.2.2. Způsob vzniku semen tetraploidů	23
4.3. Hybridizační experimenty	26
5. Diskuze	30
5.1. Pylové charakteristiky <i>Hieracium prenanthoides</i> agg.	30
5.2. Reprodukční systémy <i>Hieracium prenanthoides</i> agg.	34
5.2.1. Semeno s tetraploidním embryem a hexaploidním endospermem	35
5.2.2. Oktoploidní embryo	36
5.2.3. Pentaploidní embryo	37

5.4. Evoluční důsledky	43
6. Závěr	45
7. Literatura	46

Seznam tabulek

Tabulka 1: Zdrojové lokality rostlin použitých pro účely diplomové práce.....	9
Tabulka 2: Tvorba pylu, velikost pylových zrn a pylová viabilita vybraných populací jestřábníku věsenkovitého.....	14
Tabulka 3: Souhrn všech analyzovaných semen triploidních rostlin.....	18
Tabulka 4: Analýza semen populace K2.....	19
Tabulka 5: Analýza semen populace R2.....	19
Tabulka 6: Analýza semen populace R3.....	19
Tabulka 7: Analýza semen populace JRV.....	19
Tabulka 8: Analýza semen populace JPM.....	20
Tabulka 9: Analýza semen populace KRA.....	20
Tabulka 10: Analýza semen populace MFSIBM.....	20
Tabulka 11: Analýza semen populace MFSIBT.....	20
Tabulka 12: Analýza semen populace MFSZH.....	21
Tabulka 13: Analýza semen populace MFMK.....	21
Tabulka 14: Analýza semen populace MFTA.....	21
Tabulka 15: Analýza semen populace MFTB.....	21
Tabulka 16: Analýza semen populace OS2LOK.....	21
Tabulka 17: Analýza semen populace OSNC.....	22
Tabulka 18: Analýza semen populace OSSPO.....	22
Tabulka 19: Analýza semen populace OSCNV.....	22
Tabulka 20: Analýza semen populace OSP.....	22
Tabulka 21: Analýza semen populace SPP.....	22
Tabulka 22: Souhrn všech analyzovaných semen tetraploidních rostlin.....	23
Tabulka 23: Analýza semen populace R1.....	25
Tabulka 24: Analýza semen populace OV.....	25
Tabulka 25: Analýza semen populace JRTH.....	26
Tabulka 26: Analýza semen populace JHS.....	26
Tabulka 27: Analýza semen populace JOV6KV.....	26
Tabulka 28: Analýza semen z křížení rostlin populací R1 (4x) ♀ a FR (2x) ♂.....	27
Tabulka 29: Analýza semen z křížení rostlin populací OV (4x) ♀ a FR (2x) ♂.....	29
Tabulka 30: Přehled známých pentaploidních druhů jestřábníků.....	37

Seznam obrázků

Obrázek 1: Morfologická variabilita jestřábníku věsenkovitého.....	5
Obrázek 2: Pylová zrna rostliny z populace K2 obarvená acerokarmínem.....	15
Obrázek 3: Poměr viabilních a neviabilních pylových zrn u rostlin všech populací na velikostní škále.....	16
Obrázek 4: Poměr viabilních a neviabilních pylových zrn u rostlin jednotlivých populací na velikostní škále.....	17
Obrázek 5: Typický fluorescenční histogram vzorku tří semen triploidní rostliny jestřábníku věsenkovitého (populace R3) s polohou peaku endospermů ve 2násobku peaku embryí (= apomiktický způsob vzniku semen).....	18
Obrázek 6: Fluorescenční histogram vzorku tří semen tetraploidní rostliny jestřábníku věsenkovitého z populace OV s polohou peaků endospermů v 1,5násobku (= sexuální způsob vzniku semene) a v 2násobku (= apomiktický způsob vzniku semene) peaku embrya.....	23
Obrázek 7: Fluorescenční histogram vzorku tří semen tetraploidní rostliny jestřábníku věsenkovitého z populace OV s dvěma tetraploidními embryi a jedním oktoploidním.....	24
Obrázek 8: Fluorescenční histogram vzorku tří semen tetraploidní rostliny jestřábníku věsenkovitého z populace OV s dvěma tetraploidními embryi a jedním oktoploidním. Jiné napětí.....	24
Obrázek 9: Fluorescenční histogram vzorku tří semen z křížení tetraploidní (R1, ♀) a diploidní (FR, ♂) rostliny.....	28
Obrázek 10: Fluorescenční histogram společného vzorku tetraploidního <i>Hieracium prenanthoides</i> (4x) a pentaploidního <i>Hieracium chrysostyloides</i> (5x).....	28

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat těm, kteří mi pomohli při tvorbě této práce. Martinu Dančákovi za obětavé vedení práce, kritické připomínky a trpělivost, se kterou se mi po celou dobu věnoval. Jindřichu Chrtkovi za velmi cenné hieraciologické konzultace a za inspirativní elán, se kterým ke studiu jestřábníků přistupuje. Michaele Jandové za to, že mě naučila použité laboratorní metody a že se mi v laboratoři věnovala. Rodině, drahé polovičce a přátelům za podporu nejen při tvorbě práce, ale i za podporu v průběhu celého studia.

1. Úvod

Reprodukční biologie rostlin je jednou z nejdůležitějších botanických disciplín. Výsledky studií zabývajících se rozmnožovacími mechanismy rostlin mají široké uplatnění zejména ve šlechtění a produkci zemědělských plodin, zároveň mají svou důležitou úlohu pro pochopení různých biologických procesů.

Kvetoucí rostliny mají v obecné rovině tři typy generativní reprodukce: 1) cizosprašnost, 2) samosprašnost, a 3) apomixii (Allem 2003, Richards 2003). Zatímco při cizosprašnosti a v omezenější míře i při samosprašnosti vzniká potomstvo, které je geneticky odlišné od mateřských rostlin, v případě apomixie dochází ke vzniku potomstva geneticky stejného (Richards 2003). Apomixie je tedy objektem zájmu jak vědců studujících např. možnost fixace F1 heterozygotních hybridů kulturních plodin, tak těch, kteří studují evoluční mechanismy rostlin (Barcaccia & Albertini 2013).

1.1. Apomixie

Apomixie je asexuální způsob reprodukce rostlin, kdy při tvorbě semen nedochází ke splynutí pohlavních buněk (Winkler 1908). Potomstvo je tak geneticky identické s mateřskou rostlinou. Gametofytická apomixie se dělí na několik typů (Nogler 1984). Při diplosporii vzniká megagametofyt ze samičí archesporální buňky, zatímco při aposporii vzniká z jiné buňky nucelu. Diplosporie se dále dělí na několik typů podle toho, jakým způsobem megagametofyt vzniká (Asker & Jerling 1992). V naprosté většině případů je apomixie vázaná na samičí zárodečnou linii; ojediněle jsou známy i případy samčí apomixie (Pichot et al. 2000).

Apomixie má oproti sexuálnímu rozmnožování několik výhod. Tou hlavní je zajištění reprodukce bez předchozího opylení, což může být velmi přínosné v extrémních klimatických podmínkách. Mnoho apomiktických druhů netvoří pyl, jehož tvorba je vysoce energomateriálově náročná. Pokud jsou apomikti polyploidní hybridy, lze u nich očekávat vysokou heterozygotitu, která je zvýhodní před sexuály. Nadto, protože je apomixie často spojena s polyploidii, jsou rostliny konkurenčně zdatnější, jelikož bývají díky vyšší ploidii celkově větší než sexuálové (Richards 1997). Naproti tomu má apomixie i své zjevné nevýhody. Tou zásadní je, že u nich tak jako u sexuálů nedochází ke vzniku nových genotypů, které by se mohly přizpůsobit měnícím se podmínkám.

Apomixie je známa u nejméně 33 rostlinných čeledí a apomiktické linie se vyvinuly nezávisle mnohokrát ze svých sexuálních příbuzných (Nygren 1967, Carman 1997).

Apomiktické druhy mají často hybridní původ a obvykle bývají polyploidní (Carman 1997, Richards 1997). V České republice patří mezi významné čeledi s vyšším zastoupením apomiktických rodů růžovité (např. rody *Rubus*, *Rosa*, *Alchemilla*; Holub 1995, Větvicka 1995, Plocek 1995) či hvězdnicovité (např. *Taxaxacum*, *Hieracium*, *Pilosella*; Trávníček et al. 2011, Chrtek 2004). Tyto rody se v nezanedbatelné míře podílejí na české rostlinné biodiverzitě (cf. Danihelka et al. 2012).

V celém areálu čeledi hvězdnicovitých byl apomiktický způsob rozmnožování vysledován u mnoha rodů, např. *Antennaria* (Stebbins 1932), *Leontopodium* (Sokolowska-Kulczycka 1959), *Arnica* (Bakker 1966) či *Erigeron* (Noyes & Soltis 1996). Rozsáhle byla apomixie studovaná u chlupáčků (např. Koltunow et al. 1998, Fehrer et al. 2007, Kraulcová et al. 2009, Koltunow et al. 2011), v menší míře také u blízkce příbuzného rodu jestřábník. V tomto rodě je naprostá většina druhů apomiktických a celá skupina je již velmi dlouhou dobu předmětem vědeckého zkoumání.

1.2. Rod *Hieracium*

Rod *Hieracium* L. – jestřábník, je významnou holarktickou skupinou rostlin rozšířenou primárně v Evropě, Asii a Severní Americe. Jedná se o vytrvalé byliny s přímými, buď nevětvenými a jednoúbornými, nebo chocholičnatě větvenými a mnohoúbornými lodyhami. Lodyhy jsou olistěné nebo bezlisté, listy různých tvarů, celokrajné až různě hluboce zubaté. Květy jsou zpravidla jazykovité, pětizubé, žluté. Plody jsou nažky (Chrtek 2004). Důležitým charakterem je odění, které tvoří jednoduché, žláznaté a hvězdovité chlupy; jejich přítomnost, četnost a poměr na různých částech rostliny mají zásadní vliv pro determinaci (Zahn 1921-1923).

Z hlediska taxonomie se jedná o jeden z nejkomplicovanějších rodů na světě. Na vyšší taxonomické úrovni bývá do rodu *Hieracium* někdy řazený i rod *Pilosella*, který je mu blízkce příbuzný. Oba rody tak někdy bývají uváděny na úrovni podrodů v rámci společného rodu *Hieracium* s. l. (např. Sell & West 1976, Chrtek 2004). Obě skupiny se však liší mnohými charakteristikami, zejména morfologickými a reprodukčními, a tak bývají oprávněně vyčleňovány spíše jako samostatné rody (Dostál 1989, Schou 2001, Danihelka et al. 2012).

V rámci rodu je rozlišováno (v závislosti na taxonomické koncepci) až několik tisíc druhů (Chrtek 2004). V Evropě existují dvě hlavní klasifikační koncepce:

1. Ve střední Evropě se používá koncepce širšího pojetí druhu a hierarchický systém

vnitrodruhové variability, kdy se většina druhů dále dělí na subspecie, variety a formy. Jsou rozlišovány tzv. hlavní druhy (Hauptarten, species principales), které jsou víceméně běžné, mají široké areály a jsou morfologicky jasně odlišitelné, a druhy vedlejší (Zwischenarten, species intermediae), které stojí morfologicky v různých místech pomyslné spojnice mezi dvěma či více hlavními druhy a jsou pravděpodobně hybridního původu. Tuto koncepci mezi prvními použili Nägeli & Peter (1885, 1886–1889) a Zahn (1921–1923).

2. Na druhou stranu ve Velké Británii, Skandinávii, Rusku a některých dalších zemích se používá úzké vymezení druhu, kdy jsou všechny morfologicky vymezené jednotky hodnoceny na druhové úrovni (Üksip 1960, Sell & Murrell 2006).

Oba systémy nejsou vzájemně zcela převoditelné. V současné Květeně ČR se vychází primárně ze středoevropské tradice širokých druhů. Úzké pojetí druhu bylo přijato u některých v poslední době podrobněji zpracovávaných horských skupin jestřábníků, u nichž se zdá více odpovídající uspořádání morfologické variability (Chrtek 2004).

Hlavním faktorem zodpovědným za tak velkou variabilitu jestřábníků je jejich způsob reprodukce. Pro jestřábníky je typická apomixie, konkrétně diplosporie typu *Antennaria*, kdy zárodečný vak vzniká mitotickým dělením samičí archesporální buňky a meióza je zcela potlačena (Skawińska 1962). Potomstvo je následně geneticky uniformní a identické s mateřskou rostlinou.

V současnosti je tak naprostá většina populací pravých jestřábníků tvořena apomiktickými liniemi. V minulosti nicméně byla situace patrně značně odlišná. Hlavní teorie vysvětlující vznik tolika různých druhů jestřábníků (např. Tennant & Rich 2008) předpokládá, že apomixii předcházela obvyklý sexuální způsob rozmnožování. Rostliny, které v průběhu evoluce vyvinuly apomiktický způsob reprodukce a zároveň stále produkovaly pyl, se zkřížily se sexuálními jedinci, což vedlo ke vzniku mnoha asexuálních linií lišících se jemnými rozdíly v morfologii. Hybridizací vzniklá retikulární morfologická variabilita byla následně zafixována apomiktickým způsobem rozmnožování, který se ukázal evolučně výhodnější než rozmnožování sexuální (Gustaffson 1946–1947, Merxmüller 1975, Asker & Jerling 2002).

Apomixie je úzce spjata s polyploidii, která je pro jestřábníky dalším význačným fenoménem. V rodu *Hieracium* naprosto převládají v rámci celého areálu tri- a tetraploidní cytotypy (např. Schuhwerk 1996, Chrtek et al. 2007 a další chromozomové seznamy), které se rozmnožují apomikticky. Vyšší ploidní úrovně jsou ojedinělé: jen u

pěti druhů byla zjištěna pentaploidie (Stace et al. 1995, Chrtek 1996, Pulkina & Tupitsyna 2000, Tyler & Jönsson 2009), u druhu *Hieracium virosum* Pall. dokonce hexa- a heptaploidie (Pulkina & Tupitsyna 2000). Sexuální typ rozmnožování byl zjištěn jen u diploidů, kteří jsou vzácní a často vázaní na malé reliktní areály (cf. Chrtek et al. 2007). Aneuploidie je dokládána velmi vzácně (např. Sokolovskaja & Strelkova 1960, Rostovtseva 1979, Stace et al. 1995).

Obrovská variabilita jestřábníků přitahuje již velmi dlouhou dobu pozornost vědců. Prvním, kdo se pokusil experimentálním křížením objasnit variabilitu jestřábníků, byl Mendel (Orel 2003). Pokusy však ztroskotaly; Mendel zmiňuje pouze dva křížence vzniklé z křížení *Hieracium umbellatum* s *H. racemosum* Willd. a *H. vulgatum* s. l. Po křížení *Hieracium murorum* získal morfologicky identické potomstvo, což vysvětloval samoopylením – přestože se bezpochyby jednalo o apomixii, o které však v té době ještě nebylo nic známo (Richards 1997). Reciproční křížení mezi *H. alpinum* L. a *H. murorum* L. provedl Zlatník (1938). Získal intermediární potomstvo, vždy ale více podobné mateřské rostlině. Cytologické a embryologické studie provádělo několik autorů – Rosenberg (1926), Bergman (1941), Skawińska (1962), kteří objevili nebo prohloubili znalosti o apomixii. V současnosti se výzkumem evoluce a potenciální současné hybridizace v rodu *Hieracium* zabývají výzkumné týmy P. Mráze a J. Chrtka. Diplomová práce si klade ambici přispět k podhalení složitých evolučních mechanismů u jestřábníků prostřednictvím studia reprodukčních systémů u okruhu jestřábníku věsenkovitého.

1.3. *Hieracium prenanthoides* agg.

Okruh jestřábníku věsenkovitého zahrnuje byliny charakteristické těmito znaky: vysoká, hustě olistěná lodyha; objímavé a houslovitě zúžené lodyžní listy; stopkatými žlázkami hustě pokryté stopky úborů a zákrovní listeny, na kterých zpravidla chybějí jednoduché chlupy (Zahn 1921–1923).

Jestřábník věsenkovitý má velký, avšak disjunktní areál sahající od Grónska přes Island, Britské ostrovy a Skandinávii roztroušeně severozápadním Ruskem až po Ural. Více či méně izolované arely se nacházejí ve vyšších pohořích západní, střední, jihovýchodní, a vzácně i jižní Evropy. Zde je druh rozšířen od Pyrenejí přes Alpy po hory Balkánského poloostrova, na jih po Abruzzi, na sever po Schwarzwald, sudetská pohoří a Karpaty. Dále roste na Kavkaze, v sousedících částech severovýchodní Anatólie a Íránu a na Alborzu. Nejvýchodněji ležící izolované arely jsou ve

středoasijských pohoří a na Sibiři (Bräutigam 1992, Chrtek 2004).



Obrázek 1: Morfologická variabilita jestřábníku věsenkovitého. Vlevo nahoře diploidní cytotyp (FR), vpravo nahoře triploidní (R2), dole tetraploidní (R1 a OV; zkratky populací viz kap. 3.1.).

Okruh jestřábníku věsenkovitého je taxonomicky značně komplikovaný a

nedostatečně prozkoumaný. Nejpodrobnější prací zabývající se jeho variabilitou je zpracování druhu *Hieracium prenanthoides* v Zahnově hieraciologické monografii (Zahn 1922–1938). Autor považuje jestřábník věsenkovitý za tzv. hlavní druh; v rámci něj vylišuje na území západní, střední a jihovýchodní Evropy 37 subspecií dále dělených na desítky variet, subvariet a forem. Severskými autory, používajícími taxonomickou koncepci úzkých druhů, nebyl jestřábník věsenkovitý originálně zpracován. Jeho zpracování v severských hieraciologických dílech vychází z Zahnovy monografie, přičemž za druhy jsou považovány poddruhy sensu Zahn (např. Üksip 1960). Samotné Zahnovo zpracování je poměrně nejasné a z determinačního hlediska je prakticky nepoužitelné. Je zřejmé, že celý agregát jestřábníku věsenkovitého zahrnuje patrně desítky mikrospecií s potenciálně vysokou vědeckou či ochrannářskou hodnotou a nutně vyžaduje moderní taxonomickou revizi.

Z karyologického hlediska zahrnuje jestřábník věsenkovitý tři ploidní úrovně: diploidní ($2n = 18$), triploidní ($2n = 27$) a tetraploidní ($2n = 36$). Triploidi však značně převažují a jsou uváděni z Grónska (Böcher & Larsen 1950, Jørgensen et al. 1958), Pyrenejí (Castro et al. 2007, Chrtek et al. 2007), Sudet (Chrtek 1996, Chrtek et al. 2009, Kocián 2012, Kocián nepubl.), Západních Karpat (Uhríková 1974, Chrtek 1996, Chrtek et al. 2004 Kocián nepubl.), Turecka (Hayirlioglu-Ayaz & Inceer 2004), Kavkazu (Nazarova 1984) a Uralu (Lavrenko et al. 1990). Triploidní počet uvádí u pěstovaných rostlin nejasného původu rovněž Rosenberg (1926). Tetraploidní chromozomový počet byl zjištěn jen u rostlin pocházejících z Islandu (Löve 1970), u rostlin neznámého původu (Christoff & Popoff 1933) a nově i u několika populací v Sudetech (Kocián 2012, Kocián nepubl.). Diploidi byli zjištěni pouze ve Francouzských Alpách (Favarger 1969a, 1969b, Chrtek et al. 2009, Kocián nepubl.).

Díky existenci tří ploidních úrovní a několika desítek pravděpodobně blízce příbuzných typů zahrnujících jak sexuálně se rozmnožující rostliny, tak apomikty, jeví se okruh jestřábníku věsenkovitého jako vhodný model pro studium reprodukčních systémů v rodu *Hieracium*. Probíhá u rostlin mikrosporogeneze? Pokud ano, jaké jsou charakteristiky pylu? Jakým způsobem dochází ke vzniku semen v přírodních populacích? Jsou polyploidi opravdu striktně apomiktičtí nebo u nich existuje reziduální sexualita? K čemu dojde, když se provede experimentální hybridizace rostlin různé ploidie? Diplomová práce se na tyto otázky pokusí odpovědět.

2. Cíle práce

Magisterská práce si klade tři dílčí cíle:

1. Kvantitativně a kvalitativně zhodnotit tvorbu pylu vybraných populací ještěbníku věsenkovitého různých ploidních úrovní a otestovat pylovou viabilitu.
2. Zanalyzovat pomocí průtokové cytometrie ploidní úroveň semen tri- a tetraploidních rostlin z přírodních populací a vyhodnotit způsob vzniku semen.
3. Provést experimentální křížení rostlin různých ploidních úrovní s následnou analýzou semen pomocí průtokové cytometrie pro zjištění způsobu vzniku semen.

3. Materiál a metody

3.1. Původ a taxonomická pozice studovaných rostlin

Celkem bylo pro účely diplomové práce vybráno 26 populací jestřábníku věsenkovitého z území Francie, České republiky a Slovenska (viz tabulka 1). Výběr proběhl tak, aby byly zastoupeny všechny tři známé cytotypy a zároveň aby bylo zahrnuto co nejvíce různých morfologických typů z co největšího území. Ploidní úroveň sedmi populací již byla známa (Chrtek et al. 2009, Kocián 2012), ploidie ostatních devatenácti populací byla zjištěna v rámci diplomové práce (viz kapitola 4.1.1.).

Populace nebylo možné taxonomicky zařadit do subspecií resp. nižších taxonomických jednotek (sensu Zahn 1922–1938) z důvodu značně nejasného vymezení taxonů na subspecifických úrovních v citovaném díle. V rámci souboru populací bylo nicméně možno jejich bližším srovnáním vylíčit nejméně 12 morfologicky odlišných typů, u kterých lze předpokládat, že jsou ve skutečnosti jednotlivými mikrospeciemi. Každá populace byla tvořena vždy jen jedním morfologickým typem. Jelikož komplexní taxonomická revize celého okruhu jestřábníku věsenkovitého bude předmětem dalšího výzkumu, nelze v současnosti populace exaktně zmiňovat jako subspecie resp. mikrospecie. Přesto byla morfologická odlišnost jednotlivých populací považována za důležité kritérium při výběru rostlin do pylových analýz či hybridizačních experimentů.

Ploidie	Označení populace	Naleziště	GPS
2x	FR*	Francie, Kottické Alpy, svahy v údolí 2,5 km VJV od obce Montegenèvre, 1740 m n. m.	44°55'32"N 6°41'49"E
3x	K2**	Česká republika, Krkonoše, Dlouhý důl, okraj zelené turistické stezky v řídkém smrkovém lese, 1190 m n. m.	50°43'80.6"N 15°40'28.7"E
	R2**	Česká republika, Rýchory, okraj cesty lemující horskou louku mezi rozcestníkem Kutná-Rýchory a Rýchorský kříž, 1000 m n. m.	50°39'33.9"N 15°51'27.6"E
	R3**	Česká republika, Rýchory, travnatý okraj cesty mezi Rýchorskou boudou a rozcestníkem Kutná - Rýchory, 1000 m n. m.	50°39'30.4"N 15°51'09.1"E
	JVR**	Česká republika, Hrubý Jeseník, Velká kotlina, horní část Vításkovy rokly, travinobylinný porost skalní terasy, 1340 m n. m.	50°03'22.6"N 17°14'07.9"E
	JPM	Česká republika, Hrubý Jeseník, travnatý porost nad i pod modrou turistickou stezkou na JV svahu Vysoké hole, 1300 m n. m.	50°03'30.8"N 17°14'30.1"E
	KRA	Slovensko, Malá Fatra, Kraviarske, u modré turistické stezky před vrcholem hory směrem od Sedla za Kraviarskym, asi 1300 m n. m.	49°12'48"N 19°00'99"E
	MFP	Slovensko, Malá Fatra, Pekelník, J svah, 1550 m n. m.	49°11'24.7"N 19°01'12.3"E

	MFSA	Slovensko, Malá Fatra, Pekelník, pod skalnatým komplexem před vrcholem Pekelníku, 1570 m n. m.	49°11'23.5"N 19°01'21.3"E
	MFSB	Slovensko, Malá Fatra, Pekelník, pod skalnatým komplexem před vrcholem Pekelníku, 1570 m n. m.	49°11'23.5"N 19°01'21.3"E
	MFMK	Slovensko, Malá Fatra, okraj červené hřebenovky na Malý Kriváň ze směru od sedla Bublén, 1560 m n. m.	49°11'13.3"N 19°00'03.4"E
	MFSZH	Slovensko, Malá Fatra, JV svah Sedla Za Hromovým, pod červenou hřebenovou turistickou stezkou, 1560 m n. m.	49°11'26.0"N 19°03'31.7"E
	MFTA	Slovensko, Malá Fatra, JV svah nad traverzem pod vrcholem Hromového, 1610 m n. m.	49°11'22.5"N 19°03'21.7"E
	MFTB	Slovensko, Malá Fatra, JV svah nad traverzem pod vrcholem Hromového, 1610 m n. m.	49°11'22.5"N 19°03'21.7"E
	MFVKP	Slovensko, Malá Fatra, svah mezi Velkým Kriváněm a Pekelníkem, 1570 m n. m.	49°11'25.8"N 19°42'89"E
	OS2LOK	Slovensko, Západní Tatry, Osobitá, podél zelené turistické stezky na Sedlo pod Osobitou, okraj cestičky na okraji lesa a průklestu, cca 1300 m n. m.	49°15'33.3"N 19°42'52.2"E
	OSNC	Slovensko, Západní Tatry, Osobitá, nad zelenou turistickou stezkou na Sedlo pod Osobitou, cca 1300 m n. m.	49°15'57"N 19°01'12.3"E
	OSSPO	Slovensko, Západní Tatry, Osobitá, sedlo pod Osobitou, horská louka, 1530 m n. m.	49°15'31.0"N 19°43'17.3"E
	OSCNV	Slovensko, Západní Tatry, Osobitá, u cesty ze sedla na vrchol, 1600 m n. m.	49°15'38.3"N 19°43'17.1"E
	OSP	Slovensko, Západní Tatry, Osobitá, Z část, svahová horská louka v průklestu, cca 1350 m n. m.	49°15'40.1"N 19°43'02.6"E
	SPP	Slovensko, Vysoké Tatry, mezi Štrbským a Popradským plesem, cca 1490 m n. m.	49°08'11"N 20°03'91"E
4x	R1**	Česká republika, Rýchory, horská louka při okraji cesty mezi Maxovou vyhlídkou a Rýchorskou boudou, 1000 m n. m.	50°39'38.6"N 15°50'59.0"E
	OV**	Česká republika, Hrubý Jeseník, Vysoká hole, vysokobylinný porost nad chatou Ovčárna, 1310 m n. m.	50°40'13.9"N 17°14'20.9"E
	JRTH	Česká republika, Hrubý Jeseník, Velká kotlina, svahová březina v Rathsburgově břehu, okraj skalky, 1145 m n. m.	50°03'16.9"N 17°14'20.3"E
	JHS	Česká republika, Hrubý Jeseník, horské travinobylinné porosty západně okolo chaty Horské služby na Ovčárně, 1310 m n. m.	50°04'17.6"N 17°14'11.2"E
	JOV6KV	Česká republika, Hrubý Jeseník, Velká kotlina, dolní část, levý břeh Moravice, bylinný porost březové světliny, 1145 m n. m.	50°03'18.1"N 17°14'22.0"E

Tabulka 1: Zdrojové lokality rostlin použitých pro účely diplomové práce. Ploidie populace označené hvězdičkou byla převzata z práce Chrtěk et al. 2009, ploidie populací označených dvěma hvězdičkami byly převzaty z práce Kocián 2012, ploidie ostatních populací byly zjištěny v rámci diplomové práce.

3.1.1. Ploidie pokusných rostlin

Zjištění ploidie, resp. DNA-ploidní úrovně (Suda et al. 2006) bylo provedeno metodou průtokové cytometrie (Doležel et al. 1989). Jako materiál byly použity listy rostlin kultivovaných na pokusné ploše Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci nebo listy odebrané z rostlin z přírodních populací. Část měření byla provedena na průtokovém cytometru Partec PAS (Germany) a část na průtokovém cytometru Partec CyFlow (Germany) v Laboratoři průtokové cytometrie na Katedře botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Bylo použito metody vnitřního standardu (Doležel 1997) o známém obsahu DNA – jako referenční standard byla použita kukuřice *Zea mays* CE-777 2C = 5,43 pg (Lysák & Doležel 1998).

Ze vzorkované rostliny i standardu byly odebrány asi 1 cm² velké části listové čepele a tyto byly společně nasekány žiletkou na Petriho misce v 1 ml LB01 pufru (Doležel et al. 1994). Vzorek byl přefiltrován do kyvety přes nylonový filtr s velikostí otvorů 42 μm. K takto homogenizovanému vzorku bylo přidáno 50 μl fluorescenčního barviva propidium jodid. Po krátké centrifugaci se nechal vzorek přibližně pět minut probarvovat. Následně byl zanalyzován průtokovým cytometrem.

Ploidní úroveň byla zjištěna na lineární stupnici grafického výstupu cytometrie na základě vzdáleností mezi G1 vrcholy (peaky) standardu a vzorku (index). Peak standardu byl nastaven na kanál 50 a peak vzorků jestřábníku věsenkovitého ležel od tohoto bodu na ose vpravo. U každého vzorku bylo změřeno 1500 jader s CV 3-6 %.

Rozsah indexů pro triploidy je 1,9 – 2,1 a pro tetraploidy 2,7 – 2,9 (Kocián 2012). Rostliny z České republiky a Slovenska byly zanalyzovány autorem diplomové práce. Rostliny z Francie byly zanalyzovány kolektivem autorů (Chrtek et al. 2009).

3.2. Pylové analýzy

Pyl byl zkoumán zejména za účelem výběru rostlin do hybridizačních studií. Z toho důvodu byly zjištěny základní pylové charakteristiky – zda vůbec dochází k tvorbě pylu, jaká je jeho kvantita a jakou mají pylová zrna velikost. Pro potřeby hybridizace pak bylo zásadní zjistit, zda jsou pylová zrna viabilní.

Výběr rostlin byl proveden tak, aby byly reprezentativně zahrnuty všechny známé ploidie, co nejširší část zkoumaného areálu druhu a co nejvíce morfologických typů. Celkem bylo vybráno 12 morfologicky různých populací. Z každé populace byla vybrána jedna testovaná rostlina, která byla podrobena analýzám.

3.2.1. Tvorba pylu a její kvantifikace

Informace, zda rostliny tvoří pyl, byly zjištěny vizuálním pozorováním čerstvě rozkvetlých květů úborů zaizolovaných ve fázi poupěte. Tvorba pylu byla ověřena mikroskopicky při zvětšení 100x.

Kvantifikace tvorby pylu proběhla vizuálním porovnáním množství pylu mezi rostlinami jednotlivých populací rovněž s následnou mikroskopickou kontrolou. Vzhledem k problematičnosti přesné kvantifikace jsou ve výsledcích informace o kvantitě pylu uvedeny pouze slovně.

3.2.2. Velikost pylových zrn

Měřena byla pylová zrna odebraná pro potřeby stanovení pylové viability pomocí barvení acetokarmínem (viz kapitoly 4.2.3. a 4.2.3.3.). Vzorky byly nafoceny na mikrofotografickém systému Olympus DP70 při zvětšení 100x a následně měřeny. Bylo změřeno vždy 100 pylových zrn. Byl měřen vnější průměr pylového zrna.

3.2.3. Pylová viabilita

Materiálem byla pylová zrna z čerstvě rozkvetlých květů. Úbory, jejichž květy byly použity, byly zaizolovány tkanivem ve fázi poupěte z důvodu zabránění transportu či kontaminace pylu.

Toho dne rozkvetlé květy (zpravidla 4 na vzorek) byly opatrně vytrženy z úboru a prašníky s čnělkou byly namočený do kapky barviva na podložním skle, kde byly prašníky pomocí preparační jehly otevřeny tak, aby se uvolnila pylová zrna. Jemným promáčkáním této tkáně v kapce barviva byla vytvořena pylová suspenze.

Pro zjištění pylové viability byly použity celkem tři barvící metody, které by měly být schopné rozlišit viabilní pylová zrna od neviabilních.

3.2.3.1. Alexandrovo barvení

Byla použita modifikovaná metodika (Daphni et al. 2005) původní Alexandrovy metody barvení pro rozlišení abortovaných a neabortovaných pylových zrn (Alexander 1969).

Složení barviva:

- 10 ml 95% etanolu
- 1 ml 1% malachitové zeleně v 95% etanolu

- 50 ml destilované vody
- 25 ml glycerinu
- 5 g fenolu
- 5 ml 1% chloral hydrátu v destilované vodě
- 50 ml fuchsinu (5 ml 1% roztoku v destilované vodě)
- 0,5 ml 1% oranže G v destilované vodě
- 4 ml ledové kyseliny octové

Pylová zrna byla přemístěna do kapky Alexandrova barviva na podložním skle. Po překrytí krycím sklem byl vzorek vložen do uzavřené Petriho misky s navlhčenou buničinou, aby nedocházelo k odpařování barviva. Vzorek byl zahřán na 50°C po dobu 15 minut.

Abortovaná pylová zrna se měla zbarvit zeleně, neabortovaná červeně. Analyzováno bylo vždy 100 pylových zrn na rostlinu.

3.2.3.2. Tetrazoliový test

Byla zvolena metodika úspěšně použitá u rodu *Cirsium* (Konečný 2007).

Složení barvicího roztoku:

- 0,5% roztok 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridu (TTC) ve 20% roztoku sacharózy v destilované vodě

Pylová zrna byla přemístěna do kapky barvicího roztoku na podložním skle. Po překrytí krycím sklem byl vzorek vložen do uzavřené Petriho misky s navlhčenou buničinou, aby nedocházelo k odpařování barviva. Petriho miska byla navíc zabalena do alobalu tak, aby k vzorku nepronikalo světlo (TTC je náchylný k fotooxidaci). Vzorek byl zahřán na 30°C po dobu 1 hodiny.

Viabilní pylová zrna by se měla zbarvit intenzivně červeně, neviabilní by měla zůstat bezbarvá. Analyzováno bylo vždy 100 pylových zrn na rostlinu.

3.2.3.3. Barvení acetokarmínem

Metoda úspěšně použitá při barvení pylu u několika rodů čeledi *Cichoriaceae* (Rotreklová 2008, Qureshi et al. 2009).

Složení barvicího roztoku:

- 1,5% roztok acetokarmínu (1,5 g acetokarmínu ve 100 ml 45% kyseliny octové)

Pylová zrna byla přemístěna do kapky barviva na podložním skle. Po překrytí krycím

sklem byl vzorek vložen do uzavřené Petriho misky s navlhčenou buničinou, aby nedocházelo k odpařování barviva, a byl probíráván 45 minut při pokojové teplotě.

Sytě červeně zbarvená pylová zrna byla považována za viabilní, nezbarvená nebo jen slabě zbarvená zrna byla považována za neviabilní. Analyzováno bylo vždy 100 pylových zrn na rostlinu.

3.3. Reprodukční systémy

Pro zjištění způsobu reprodukce byla analyzována semena odebraná z přírodních populací a semena rostlin zahrnutých do opylovacích experimentů. Rostliny, ze kterých byla odebrána semena, byly předem zcytometrovány pro zjištění ploidie (viz kap. 4.1.1). U přírodních populací byla semena odebrána z náhodně vybrané 1-10 rostlin. Do opylovacích experimentů byly vybrané rostliny z 5 morfologicky různých populací: FR (diploidní), R2 a KRA (triploidní) a OV a R1 (tetraploidní). Mezi rostlinami různé i stejné ploidie byla v různých kombinacích provedena hybridizace. Úbory byly ve fázi poupěte zaizolovány tkaninou znemožňující transfer či kontaminaci pylu. Po rozkvetení byly úbory ve stejné fázi vývoje vzájemně ručně opylovány, vždy jediný úbor jedné rostliny s jediným úborem rostliny druhé. Opylování každé dvojice úborů proběhlo opakovaně během 2-3 po sobě následujících dnech, vždy 1-2x za den.

Způsob reprodukce byl zjištěn metodou průtokové cytometrie, při které byla zjištěna ploidie embryí i endospermů. Metodický postup byl analogický s postupem při analýze ploidie pokusných rostlin (viz kapitola 4.1.1.) s následujícími úpravami: Cytometrovány byly celé nažky s odstraněným chmýrem. V jednom vzorku byly analyzovány zpravidla tři semena (maximálně pět semen). Nebyl použit vnitřní standard. Pro každou ploidiu bylo nastaveno specifické napětí tak, aby byl peak embryí nastaven na kanál 100. Peak endospermů ležel od tohoto bodu na ose vpravo.

Poměr mezi polohou peaku pro embryo a endosperm posloužil jako indikátor způsobu rozmnožování: endosperm s 2násobným množstvím DNA embrya vznikl apomikticky; endosperm s 1,5násobným množstvím DNA embrya vzniknul sexuálním způsobem (Matzk et al. 2000).

4. Výsledky

4.1. Pylové analýzy

K pylovým analýzám jsem vybral 12 populací. Zjištěné výsledky týkající se tvorby pylu, velikosti pylových zrn a pylové viability jsou shrnuty v tabulce 2.

Rostliny jednotlivých populací se lišily primárně již v tom, zda tvořily nebo netvořily pyl. Devět rostlin pyl tvořilo, tři tvořily pouze deformované částičky mikrosporogenetického pletiva, jedna rostlina tvořila jak pyl, tak deformované částičky mikrosporogenetického pletiva.

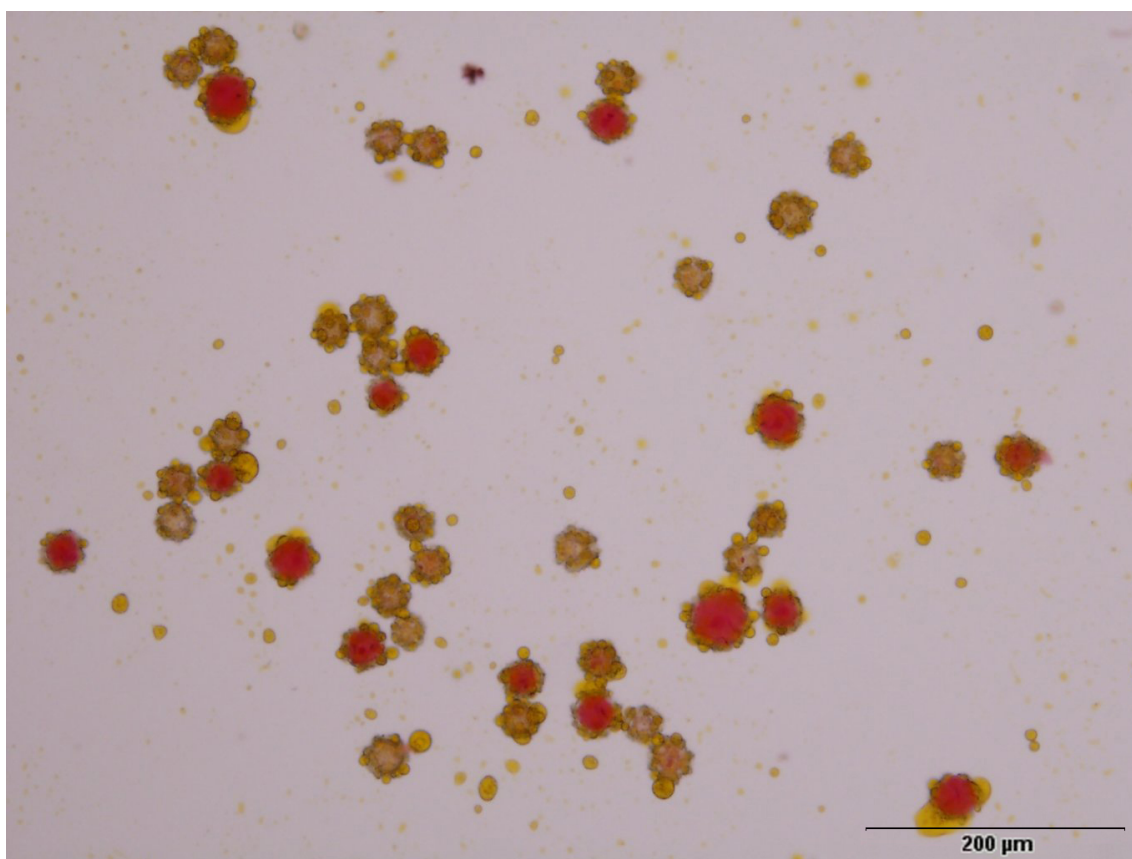
Vizuálním zhodnocením jsem zjistil, že většina rostlin tvořících pyl jej tvořila v relativně velkém množství (FR, K2, KRA, MFVKP, R2 a R1). Kvantita pylu byla nižší u rostliny populace Z, nízká u DKA a zcela nejnižší u ZSA (rostlina této populace nebyla pro minimální množství pylu zahrnuta do dalších pylových studií). Rostliny, které vůbec netvořily pyl, ale jen deformované částičky mikrosporogenetického pletiva, produkovaly tyto částičky jen v malém množství.

Celková průměrná velikost pylových zrn byla 33,4 μm . Mezi průměrnou velikostí pylových zrn jednotlivých rostlin ani jednotlivých ploidí není statisticky signifikantní rozdíl ($P < 0,05$). Všechny rostliny tvořily pyl heterogenní velikosti. Ze statistického hlediska měla velikost pylových zrn charakter spojitých proměnných.

Ploidie	Populace	Tvorba pylu	Velikost pylových zrn	Pylová viability		
				Alex	TTC	AK
2x	FR	✓	33,1 ± 4,19 μm	–	–	42 %
3x	HSD	✗	–	–	–	–
	K2	✓	32,1 ± 4,60 μm	–	–	43 %
	KRA	✓	33,2 ± 4,55 μm	100 %	0 %	44 %
	MFVKP	✓	34,4 ± 8,60 μm	–	–	35 %
	OSSPO	✗	–	–	–	–
	R2	✓	30,8 ± 3,45 μm	100 %	0 %	33 %
	Z	✓	33,8 ± 3,60 μm	–	–	29 %
4x	DKA	✓	34,8 ± 7,96 μm	–	–	29 %
	OV	✗	–	–	–	–
	R1	✓	34,4 ± 6,19 μm	100 %	0 %	66 %
	ZSA	✓+✗	–	–	–	–

Tabulka 2: Tvorba pylu, velikost pylových zrn a pylová viability vybraných populací jestřábníku věsenkovitého. (Vysvětlivky – Tvorba pylu: ✓= tvoří pyl, ✗= tvoří deformované částičky mikrosporogenetického pletiva, ✓+✗= tvoří pyl a deformované částičky mikrosporogenetického pletiva; Pylová viability: Alex = Alexandrovo barvení, TTC = tetrazoliový test, AK = barvení acetokarminem).

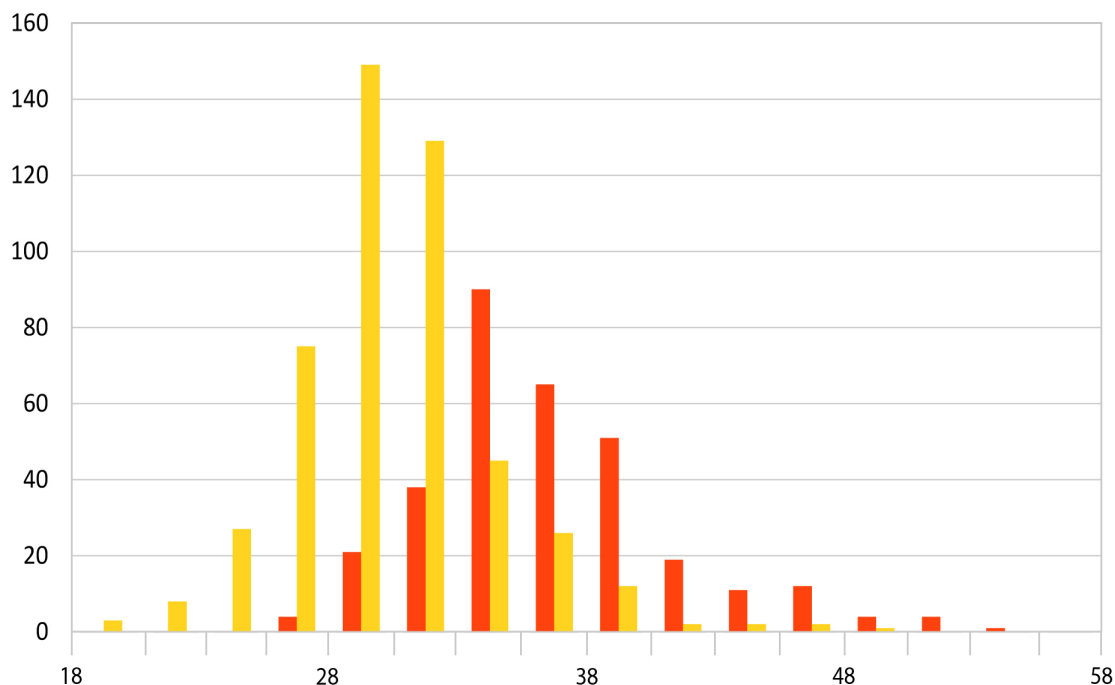
Studium pylové viability se ukázalo jako velice problematické. Ze tří použitých metod fungovala jediná. Alexandrovo barvení poskytovalo falešně pozitivní výsledky, tetrazoliový test naopak falešně negativní. Jedinou úspěšnou metodou bylo barvení acetokarmínem. Pylová zrna se vybarvila buď sytě červeně, světle červeně, nebo se nezbarvila vůbec (viz obrázek 2). Bylo tak možné rozhodnout, která pylová zrna jsou viabilní (sytě červená) a která nejsou (světle červená a nezbarvená). Nejčastěji se viabilita pohybovala kolem 40 %, ale mezi některými rostlinami byly významné rozdíly. Největší rozdíly jsem zaznamenal u tetraploidů. Mezi tetraploidy patří zároveň rostliny s nejnižší i nejvyšší zaznamenanou viabilitou (29 % u rostliny populace DKA resp. 66 % u rostliny populace R1). U triploidů je viabilita mezi rostlinami různých populací víceméně vyrovnaná. Viabilita diploidní rostliny (42 %) je srovnatelná s průměrnou viabilitou triploidních rostlin (37 %), a je tedy překvapivě nízká.



Obrázek 2: Pylová zrna rostliny z populace K2 obarvená acerokarmínem.

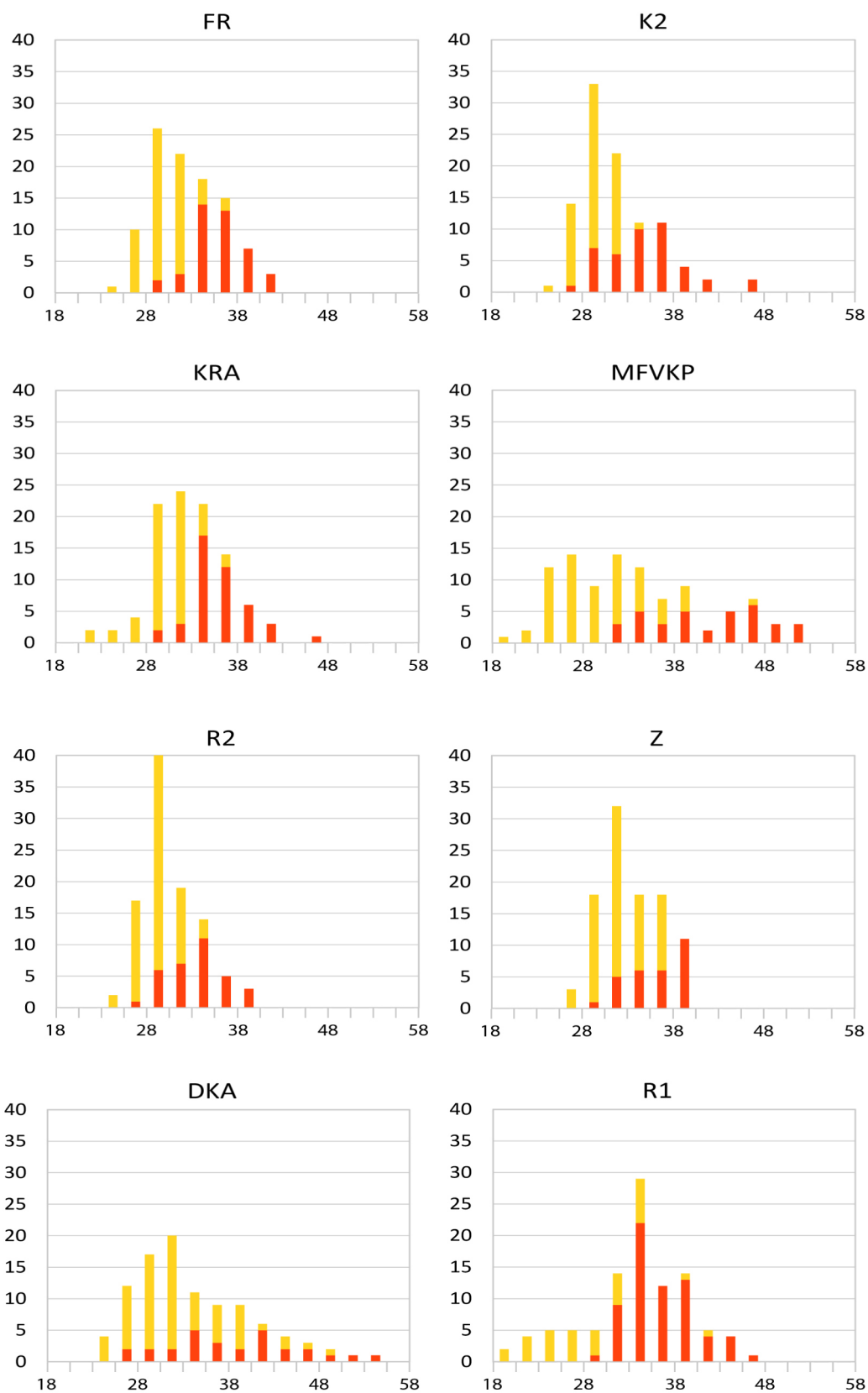
Zajímavým fenoménem je vztah mezi velikostí pylového zrna a jeho viabilitou. Menší pylová zrna vykazovala nižší viabilitu než pylová zrna větší. Průměrná velikost neviabilních pylových zrn byla 30,7 μm, průměrná velikost viabilních 37,2 μm. Křivky četnosti neviabilních a viabilních pylových zrn na velikostní škále mají podobný

průběh, jen jsou fázově posunuté o cca 6 μm a odlišné kvantitativně. Situaci znázorňuje graf na obrázku 3. Poměr viabilních a neviabilních pylových zrn u rostlin jednotlivých populací na velikostní škále je zobrazen v grafech na obrázku 4, které zároveň demonstrují strukturu velikostního rozptylu pylových zrn.



Obrázek 3: Poměr viabilních a neviabilních pylových zrn u rostlin všech populací na velikostní škále. Osa x – velikost pylového zrna v μm , osa y – počet pylových zrn. Viabilní zrna jsou značená červeně, neviabilní žlutě.

V pylových vzorcích populací KRA a zejména DKA a ZSA jsem zaznamenal vzácně i velmi velká až obrovská pylová zrna o velikosti více než 70 μm (největší 98 μm). Vzhledem k vzácnosti těchto extrémních případů a v důsledku použití náhodného výběru nedošlo k jejich zahrnutí do pylových analýz a následných výpočtů. Tato pylová zrna, představující z hlediska velikosti potenciální odlehlé hodnoty v jiném náhodném souboru pylových zrn, byla vždy viabilní.



Obrázek 4: Poměr viabilních a neviabilních pylových zrn u rostlin jednotlivých populací na velikostní škále. Osa x – velikost pylového zrna v μm , osa y – počet pylových zrn. Viabilní zrna jsou značená červeně, neviabilní žlutě.

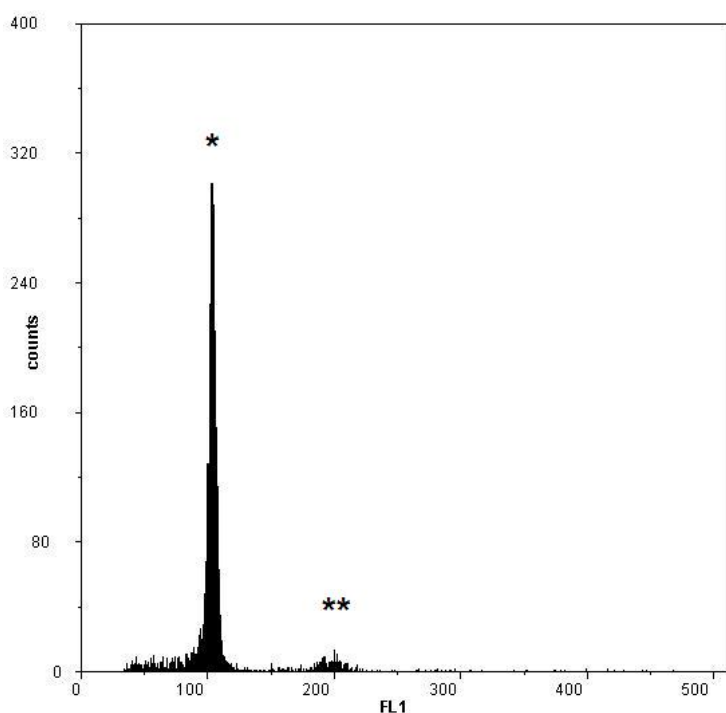
4.2. Způsob vzniku semen polyploidních rostlin přírodních populací

4.2.1. Způsob vzniku semen triploidů

Celkem jsem zanalyzoval 432 semen ve 112 vzorcích z 18 různých triploidních populací. Detekovatelná embrya (409, tj. 94,7 %) byla bez výjimky triploidní. Stejně tak detekovatelný endosperm (394, tj. 91,2 %) byl bez výjimky hexaploidní. Všechna zanalyzovaná semena, u kterých bylo detekovatelné embryo i endosperm zároveň, tedy vznikla apomikticky. U triploidních rostlin z přírodních populací jsem tak nezaznamenal žádný případ ani náznak jiného typu vzniku semen než prostřednictvím apomixie.

Počet vzorků/semenn	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
112/432	3x	409	94,7 %	6x	394	91,2 %
	N	23	5,3 %	N	38	8,8 %

Tabulka 3: Souhrn všech analyzovaných semen triploidních rostlin. Písmeno N označuje nedetekovatelné embrya nebo endospermy.



Mean embryo = 103,53
Mean endosperm = 197,16
Index = 1,904

Obrázek 5: Typický fluorescenční histogram vzorku tří semen triploidní rostliny jestřábníku věsenkovitého (populace R3) s polohou peaku endospermů ve 2násobku peaku embryí (= apomiktický způsob vzniku semen). Peak embryí je označený hvězdičkou, peak endospermů je označený dvěma hvězdičkami.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
1	4/12	3x	12	100 %	6x	12	100 %
2	4/12	3x	9	75 %	6x	9	75 %
		N	3	25 %	N	3	25 %
celkem	8/24	3x	21	87,5 %	6x	21	87,5 %
		N	3	12,5 %	N	3	12,5 %

Tabulka 4: Analýza semen populace K2.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
1	4/12	3x	12	100 %	6x	12	100 %
2	4/12	3x	12	100 %	6x	12	100 %
3	4/12	3x	9	75 %	6x	9	75 %
		N	3	25 %	N	3	25 %
4	4/12	3x	12	100 %	6x	12	100 %
5	4/12	3x	12	100 %	6x	12	100 %
6	4/12	3x	12	100 %	6x	12	100 %
celkem	24/72	3x	69	95,8 %	6x	69	95,8 %
		N	3	4,2 %	N	3	4,2 %

Tabulka 5: Analýza semen populace R2.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
1	4/12	3x	12	100 %	6x	12	100 %
2	4/12	3x	12	100 %	6x	12	100 %
3	4/12	3x	12	100 %	6x	12	100 %
4	4/12	3x	12	100 %	6x	12	100 %
5	4/12	3x	3	25 %	6x	3	25 %
		N	9	75 %	N	9	75 %
6	4/12	3x	12	100 %	6x	12	100 %
7	4/12	3x	12	100 %	6x	12	100 %
8	4/12	3x	9	75 %	6x	9	75 %
		N	3	25 %	N	3	25 %
celkem	32/96	3x	84	91,3 %	6x	84	91,3 %
		N	12	8,7 %	N	12	8,7 %

Tabulka 6: Analýza semen populace R3.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		

1	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
2	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
3	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
celkem	3/15	3x	15	100 %	6x	15	100 %

Tabulka 7: Analýza semen populace JVR.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
		1	1/5	3x	5	100 %	6x
celkem	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %

Tabulka 8: Analýza semen populace JPM.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
		1	2/10	3x	10	100 %	6x
2	2/10	3x	10	100 %	6x	5	50 %
					N	5	50 %
3	2/10	3x	10	100 %	6x	10	100 %
4	2/10	3x	10	100 %	6x	5	50 %
					N	5	50 %
5	2/10	3x	10	100 %	6x	10	100 %
celkem	10/50	3x	50	100 %	6x	40	80 %
					N	10	20 %

Tabulka 9: Analýza semen populace KRA.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
		1	1/5	3x	5	100 %	6x
2	1/5	3x	5	100 %	N	5	100 %
3	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
4	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
celkem	4/20	3x	20	100 %	6x	15	75 %
					N	5	25 %

Tabulka 10: Analýza semen populace MFSIBM.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
		1	1/5	3x	5	100 %	6x
celkem	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %

Tabulka 11: Analýza semen populace MFSIBT.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
1	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
2	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
3	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
4	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
celkem	4/20	3x	20	100 %	6x	20	100 %

Tabulka 12: Analýza semen populace MFSZH.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
1	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
2	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
3	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
celkem	3/15	3x	15	100 %	6x	15	100 %

Tabulka 13: Analýza semen populace MFMK.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
1	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
2	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
3	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
4	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
celkem	4/20	3x	20	100 %	6x	20	100 %

Tabulka 14: Analýza semen populace MFTA.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
1	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
2	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
3	1/5	N	5	100 %	N	5	100 %
4	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
celkem	4/20	3x	15	75 %	6x	15	75 %
		N	5	25 %	N	5	25 %

Tabulka 15: Analýza semen populace MFTB.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		

1	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
2	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
celkem	2/10	3x	10	100 %	6x	10	100 %

Tabulka 16: Analýza semen populace OS2LOK.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semenn	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
		1	1/5	3x	5	100 %	6x
2	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
3	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
celkem	3/15	3x	15	100 %	6x	15	100 %

Tabulka 17: Analýza semen populace OSNC.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semenn	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
		1	1/5	3x	5	100 %	6x
2	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
3	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
celkem	3/15	3x	15	100 %	6x	15	100 %

Tabulka 18: Analýza semen populace OSSPO.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semenn	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
		1	1/5	3x	5	100 %	6x
2	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
3	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
celkem	3/15	3x	15	100 %	6x	15	100 %

Tabulka 19: Analýza semen populace OSCNV.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semenn	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
		1	1/5	3x	5	100 %	6x
2	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
celkem	2/10	3x	10	100 %	6x	10	100 %

Tabulka 20: Analýza semen populace OSP.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semenn	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
		1	1/5	3x	5	100 %	6x

celkem	1/5	3x	5	100 %	6x	5	100 %
--------	-----	----	---	-------	----	---	-------

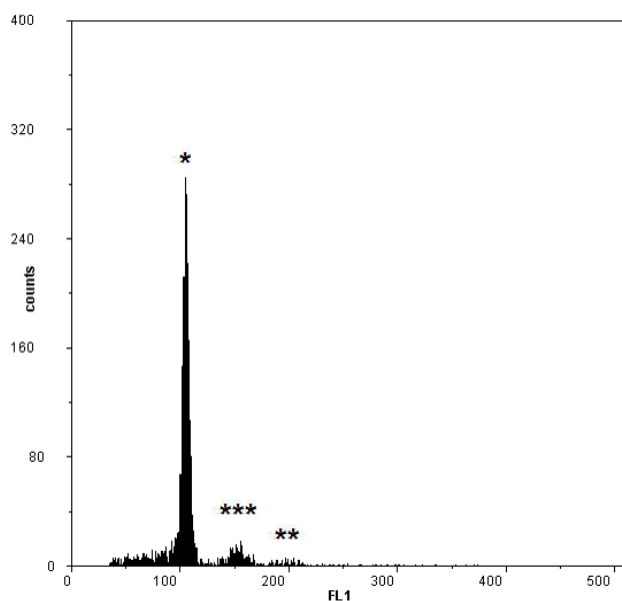
Tabulka 21: Analýza semen populace SPP.

4.2.2. Způsob vzniku semen tetraploidů

Celkem jsem zanalyzoval 274 semen v 84 vzorcích z 5 různých tetraploidních populací. Všechna embrya byla detekovatelná; naprostá většina (273, tj. 99,6 %) byla tetraploidní, jedno embryo (0,4 %) bylo oktoploidní. V případech, kdy byl detekovatelný endosperm, měla všechna tetraploidní embrya s výjimkou jednoho oktoploidního endosperm (grafické výstupy cytometrie byly z hlediska polohy peaku a embrya stejné jako na obrázku 5). Jedno tetraploidní embryo mělo hexaploidní endosperm (obrázek 6). Ojedinelé oktoploidní embryo mělo hexadekaploidní endosperm (obrázky 7 a 8). Naprostá většina semen s tetraploidním embryem i ojedinelé semeno s oktoploidním embryem tedy vznikla apomikticky. Jedno semeno s tetraploidním embryem a hexaploidním endospermem vzniklo sexuálním způsobem.

Počet vzorků/semenn	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
	84/274	4x	273	99,6 %	8x	213
	8x	1	0,4 %	N	59	21,5 %
				6x	1	0,4 %
				16x	1	0,4 %

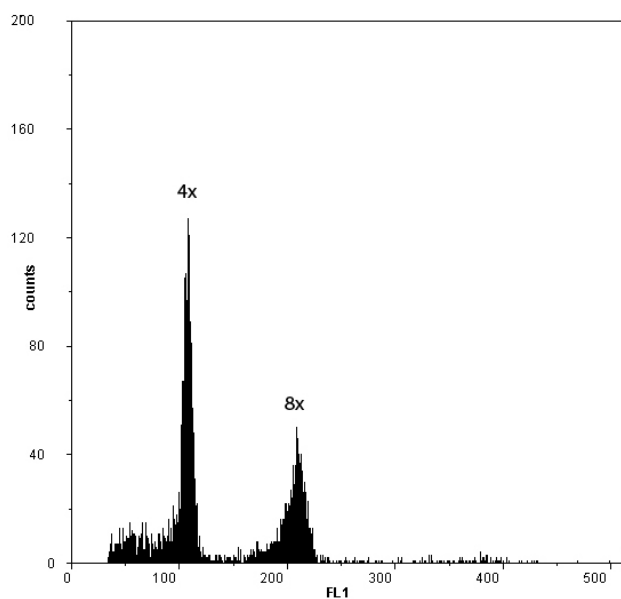
Tabulka 22: Souhrn všech analyzovaných semen tetraploidních rostlin. Písmeno N označuje nedetekovatelné endospermy.



Mean embryo = 105,04
Mean endosperm *** = 152,72
Mean endosperm ** = 197,35
Index embryo/endosperm *** = 1,454
Index embryo/endosperm ** = 1,879

Obrázek 6: Fluorescenční histogram vzorku tří semen tetraploidní rostliny jestřábníku věsenkovitého z populace OV s polohou peaků endospermů v 1,5násobku (= sexuální způsob vzniku semene) a v

2násobku (= apomiktický způsob vzniku semene) peaku embrya. Peak embrya je označený hvězdičkou, peak hexaploidního endospermu je označený třemi hvězdičkami, peak oktoploidního endospermu dvěma hvězdičkami.

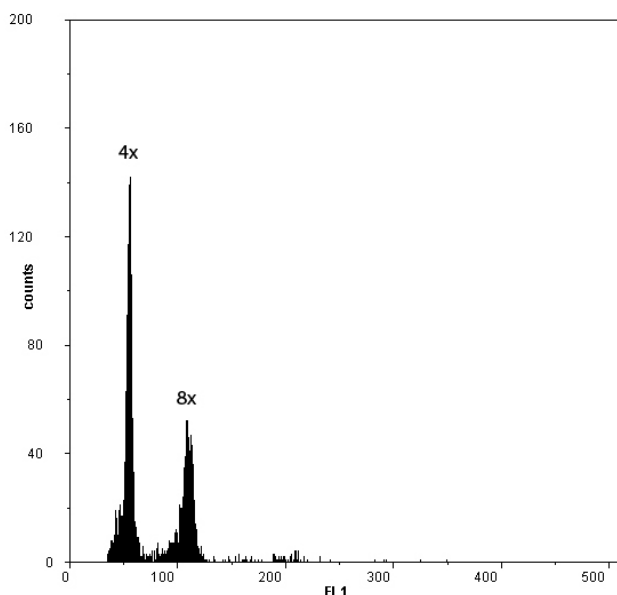


Mean embryo 4x = 107,11

Mean embryo 8x = 207,56

Index = 1,938

Obrázek 7: Fluorescenční histogram vzorku tří semen tetraploidní rostliny jestřábníku věsenkovitého z populace OV s dvěma tetraploidními embryi a jedním oktoploidním. Peak tetraploidních embryí je označený 4x, peak oktoploidních endospermů se překrývá s peakem oktoploidního embrya označeným 8x.



Mean embryo 4x = 54,90

Mean embryo 8x = 109,04

Index embryo 8x/4x = 1,986

Obrázek 8: Fluorescenční histogram vzorku tří semen tetraploidní rostliny jestřábníku věsenkovitého z populace OV s dvěma tetraploidními embryi a jedním oktoploidním. Stejný vzorek jako na obrázku 7 měřený s jiným napětím tak, že peak tetraploidních embryí je oproti obrázku 7 posunutý na kanál 50 (4x), peak oktoploidních endospermů se překrývá s peakem oktoploidního embrya (8x). Na kanálu 200 je neanalyzovatelný malý peak pravděpodobně hexadeploidního endospermu oktoploidního embrya.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
		1	4/12	4x	12	100 %	8x
					N	3	25 %
2	4/12	4x	12	100 %	8x	12	100 %
3	2/6	4x	6	100 %	8x	6	100 %
4	4/12	4x	12	100 %	8x	12	100 %
5	4/12	4x	12	100 %	8x	12	100 %
6	4/12	4x	12	100 %	8x	12	100 %
7	4/12	4x	12	100 %	8x	12	100 %
celkem	26/78	4x	78	100 %	8x	75	96,2 %
					N	3	3,8 %

Tabulka 23: Analýza semen populace R1.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
		1	4/12	4x	12	100 %	8x
					N	9	75 %
2	8/24	4x	24	100 %	8x	24	100 %
3	2/6	4x	6	100 %	8x	6	100 %
4	4/12	4x	12	100 %	N	12	100 %
5	3/9	4x	9	100 %	8x	6	66 %
					N	3	33 %
6	4/12	4x	12	100 %	8x	3	25 %
					N	9	75 %
7	7/21	4x	20	95,2 %	8 x	3	14,3 %
		8x	1	4,8 %	N	17	81 %
					16x	1	4,8 %
8	3/15	4x	15	100 %	8x	15	100 %
9	12/36	4x	36	100 %	8x	32	88,9 %
					N	3	8,3 %
					6x	1	2,8 %
10	3/9	4x	9	100 %	8x	6	66 %
					N	3	33 %
celkem	50/156	4x	155	99,4 %	8x	98	62,8 %
		8x	1	0,6 %	N	56	35,9 %
					6x	1	0,6 %
					16x	1	0,6 %

Tabulka 24: Analýza semen populace OV.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semenn	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
1	1/5	4x	5	100 %	8x	5	100 %
2	1/5	4x	5	100 %	8x	5	100 %
celkem	2/10	4x	10	100 %	8x	10	100 %

Tabulka 25: Analýza semen populace JRTH.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semenn	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
1	1/5	4x	5	100 %	8x	5	100 %
2	1/5	4x	5	100 %	8x	5	100 %
3	1/5	4x	5	100 %	8x	5	100 %
celkem	3/15	4x	15	100 %	8x	15	100 %

Tabulka 26: Analýza semen populace JHS.

Číslo rostliny	Počet vzorků/semenn	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
1	1/5	4x	5	100 %	N	5	100 %
2	1/5	4x	5	100 %	N	5	100 %
3	1/5	4x	5	100 %	N	5	100 %
celkem	3/15	4x	15	100 %	N	15	100 %

Tabulka 27: Analýza semen populace JOV6KV.

4.3. Hybridizační experimenty

Celkem jsem provedl pět různých kombinací křížení. Následují výsledky jednotlivých kombinací.

FR (2x) ♀ x R2 (3x) ♂

Vznikla pouze prázdná semena.

FR (2x) ♀ x KRA (3x) ♂

Vznikla pouze prázdná semena.

FR (2x) ♀ x R1 (4x) ♂

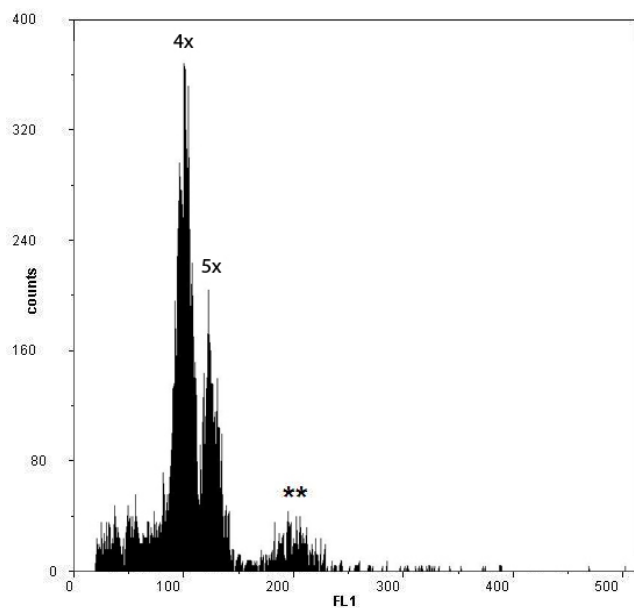
Z tohoto křížení vzniklo celkem 53 semen. 51 bylo nevyvinutých, 2 byla vyvinutá. V důsledku laboratorní nehody byl bohužel vzorek těchto dvou semen znehodnocen a nebylo možné jej cytometricky zanalyzovat.

R1 (4x) ♀ x FR (2x) ♂

Z tohoto křížení vznikla plná semena. Naprostá většina embryí byla tetraploidní. Jedno embryo bylo pentaploidní (obr. 9). S jednou potenciální výjimkou byl ve všech případech endosperm detekovatelný a byl oktoploidní. V případě vzorku 1 zahrnujícího dvě tetraploidní a jedno pentaploidní embryo byly snad přítomny dva oktoploidní endospermy tetraploidních embryí a jeden nonaploidní endosperm embrya pentaploidního – je přítomný však pouze jeden typicky malý peak endospermů, u kterého nelze rozhodnout, zda jej tvoří tři oktoploidní endospermy nebo dva oktoploidní a jeden nonaploidní. Pro ověření, zda se ve vzorku 1 opravdu nachází pentaploidní peak, byl zanalyzován společný vzorek listů tetraploidního *Hieracium prenanthoides* (R1) a pentaploidního druhu *Hieracium chrysostyloides* (z lokality Červená hora, Hrubý Jeseník; obr. 10). Ze srovnání indexů peaků embryí vzorku 1 a ověřujícího vzorku s *Hieracium chrysostyloides* vyplývá, že u vzorku 1 je skutečně přítomný pentaploidní peak.

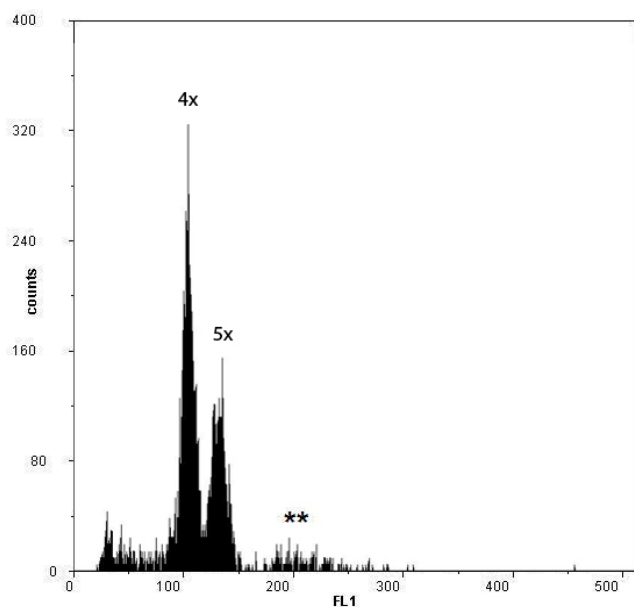
Vzorek	Počet semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
1	3	4x	2	67 %	8x	2	67 %
		5x	1	33 %	9x?	1	33 %
2	3	4x	3	100 %	8x	3	100 %
3	3	4x	3	100 %	8x	3	100 %
4	3	4x	3	100 %	8x	3	100 %
5	3	4x	3	100 %	8x	3	100 %
6	3	4x	3	100 %	8x	3	100 %
7	3	4x	3	100 %	8x	3	100 %
8	5	4x	5	100 %	8x	3	100 %
9	5	4x	5	100 %	8x	5	100 %
celkem	20	4x	19	95 %	8x	19	95 %
		5x	1	5 %	9x?	1	5 %

Tabulka 28: Analýza semen z křížení rostlin populací R1 (4x) ♀ a FR (2x) ♂.



Mean embryo 4x = 98,79
 Mean embryo 5x = 123,19
 Index embryo 5x/4x = 1,247

Obrázek 9: Fluorescenční histogram vzorku tří semen z křížení tetraploidní (R1, ♀) a diploidní (FR, ♂) rostliny. Peaky embryí jsou označeny svými ploidiemi (4x, 5x), peak endospermů je označen dvěma hvězdičkami.



Mean embryo 4x = 104,98
 Mean embryo 5x = 132,51
 Index embryo 5x/4x = 1,262

Obrázek 10: Fluorescenční histogram společného vzorku tetraploidního *Hieracium prenanthoides* (4x) a pentaploidního *Hieracium chrysostyloides* (5x). Drobný široký peak označený dvěma hvězdičkami zobrazuje buňky S2 fáze obou analyzovaných druhů.

OV (4x) ♀ x FR (2x) ♂

Z tohoto křížení vznikla plná semena. Všechna byla bez výjimky tetraploidní. Ve většině případů nebyl endosperm detekovatelný; v případech, kdy detekovatelný byl,

byl oktoploidní a semena tak vznikla apomikticky bez účasti pylu diploidní rostliny.

Vzorek	Počet semen	Ploidie embrya, absolutní a procentuální počet			Ploidie endospermu, absolutní a procentuální počet		
		4x	3	100 %	8x	3	100 %
1	3	4x	3	100 %	8x	3	100 %
2	3	4x	3	100 %	N	3	100 %
3	3	4x	3	100 %	N	3	100 %
4	3	4x	3	100 %	N	3	100 %
5	3	4x	3	100 %	N	3	100 %
6	5	4x	5	100 %	N	5	100 %
celkem	20	4x	20	100 %	8x	3	15 %
					N	17	85 %

Tabulka 29: Analýza semen z křížení rostlin populací OV (4x) ♀ a FR (2x) ♂.

5. Diskuze

5.1. Pylové charakteristiky *Hieracium prenanthoides* agg.

Pyl má klíčový význam v sexuálním procesu rostlin. Nevhodné vlastnosti pylu mohou zcela zablokovat sexuální proces na prezygotické úrovni. Kvalita pylu rovněž nepřímo vypovídá o genetických a cytologických vlastnostech rostliny resp. taxonu. Různorodost v produkci a vlastnostech pylu jestřábníku věsenkovitého byla očekávána, jedná se o charakteristický fenomén rodu *Hieracium* (Chrtek 1997, Mráz et al. 2002, Kovalčíková 2004, Meo 2005, Chrtek et al. 2006, Quareshi et al. 2009). Na základě výsledků předchozích studií se zdá, že v tomto rodě nelze pozorovat jasné a obecně platné palynologické trendy. Výsledky diplomové práce tento názor posilují.

Diploidní rostliny jestřábníku věsenkovitého tvořily pyl ve velkém množství. To je v souladu se zjištěními u diploidního *Hieracium alpinum* (Chrtek 1997, Mráz et al. 2002, Kovalčíková 2004, Chrtek et al. 2006). Naopak překvapivým výsledkem bylo, že diploidní *Hieracium prenanthoides* tvoří pyl heterogenní velikosti. Heterogenní velikost pylových zrn je charakteristická pro polyploidní jestřábníky (Mráz et al. 2002, Kovalčíková 2004), u kterých dochází k nepravidelnému rozcházení chromozomů do dceřinných buněk během značně narušeného procesu meiózy (Rosenberg 1927). Přestože palynologických studií diploidních jestřábníků je velmi málo, byla u diploidů zjištěna vždy jen pylová zrna homogenní velikosti, což je i v souladu s obecným charakterem sexuálně se rozmnožujících rostlin, u kterých je normálně probíhající meióza základním atributem správně fungujícího sexuálního procesu.

Překvapivost zjištění heterogenní velikosti pylových zrn diploidních rostlin byla dále prohloubena zjištěním jejich nízké viability (42 %). Ta je srovnatelná s průměrnou viabilitou pylu triploidů (37 %). Vysvětlením by mohl být hybridní původ rostlin, kvůli kterému si rostliny nesou genetickou zátěž způsobující narušenou meiózu. Hybridní původ by však musel být ověřen genetickými metodami a důvod, proč diploidní rostliny jestřábníku věsenkovitého tvoří velikostně heterogenní pylová zrna nízké viability, nelze v rámci současných znalostí zodpovědět. Fenomén nelze považovat za univerzální pro všechny diploidní populace *Hieracium prenanthoides*, byl vysledován pouze u (všech) tří studovaných rostlin z jedné populace. Celkově se nicméně jeví jako značně negativní z evolučního hlediska. Ke všem nevýhodám plynoucím z diploidie resp. ze sexuálního rozmnožování (energomateriálová náročnost tvorby pylu, závislost na opylovačích, nižší konkurenční zdatnost způsobená gracilnější tělní stavbou) se tak přidává narušení

tvorby samčích pohlavních buněk, z nichž většina je neuplatnitelná v sexuálním procesu v důsledku neviability a zároveň i určitá část viabilních pylových zrn je neuplatnitelná z důvodu jiného než haploidního počtu chromozomů (na což lze usuzovat z různé velikosti viabilních pylových zrn). Tyto atributy by se mohly zdát v souladu s nízkou fitness diploidů pozorovanou v kultuře a s geografickým omezením jejich výskytu na malé refugiální oblasti Alp. Přesto, v oblasti výskytu jsou diploidní populace velmi početné a vitální. Vysvětlení těchto vzájemně protichůdných faktů bude možné jen detailnějším studiem genetiky, rozmnožování a ekobiologie reliktních diploidních populací.

Většina triploidních rostlin tvořících pyl jej tvořila v relativně velkém množství. To je překvapivé vzhledem k anortoploidii, která předpokládá značně narušenou meiózu. Většina jiných triploidních druhů jestřábníků pyl netvoří, a i menšina druhů, které ho tvoří, tak činí zpravidla v malém množství (Chrtěk 1997, Slade & Rich 2007, Mráz et al. 2009, Thomas et al. 2011). Vzhledem k velmi nízké pravděpodobnosti uplatnitelnosti pylu v sexuálním procesu se vysoká tvorba pylu u triploidů jeví jako neohospodárná, evolučně nevýhodná investice.

Pro tetraploidní rostliny byla charakteristická největší rozkolísanost ve všech pylových charakteristikách – v tvorbě pylu (R1 velké množství, DKA malé, ZSA minimální a OV bez tvorby pylu), v jeho velikosti (R1 tvořila [v malém množství] nejmenší pylová zrna ze všech populací, naopak DKA a ZSA [ve velmi malém množství] největší) i viabilitě (u R1 nejvyšší viabilita ze všech populací, u DKA naopak nejnižší). Vzhledem k ortoploidii je to překvapivé. Odpovědi na otázky spojené s takto vysokou variabilitou jednotlivých palynologických charakteristik je patrně nutno hledat na genetické úrovni a v současnosti je nelze uspokojivě zodpovědět. Možným vysvětlením je allopolyploidní vznik tetraploidů, kdy u morfotypů se značně poškozenou tvorbou pylu (DKA, ZSA, OV) lze předpokládat hybridizaci dvou geneticky vzdálenějších ancestrálních druhů; naopak u morfotypu s vysokou viabilitou (R1) lze předpokládat geneticky bližší ancestrální druhy.

Průměrná velikost pylových zrn různých ploidií je velmi podobná a není statisticky významná. Neexistuje tedy vztah mezi velikostí pylových zrn a ploidií, podobně jako u příbuzných pampelišek (Doll 1973, Marciniuk et al. 2010). V rámci rodu *Hieracium* patří pylová zrna *Hieracium prenanthoides* ke středně velkým, velikostně jsou srovnatelná například s pylovými zrny druhů *Hieracium diaphanoides* nebo *Hieracium virosum* (32,5 resp. 30,3 μm ; Meo 2005). Velikost pylového zrna nemá

zcela přímý vztah s obsahem DNA (Knight et al. 2010), jako je tomu u somatických buněk (Beaulieu et al. 2008). Z velikosti pylového zrna tak nelze spolehlivě zjistit, jaký má obsah DNA. Přesto druhy s nenarušenou meiózou produkují pylová zrna homogenní velikosti – pokud dochází k tvorbě pylových zrn heterogenní velikosti, míra jejich velikostního rozptylu může vypovídat o míře poruchy samčí meiózy. Z tohoto pohledu by v rámci pyl tvořících rostlin měly mít nejporuchovější meiózu rostliny populací MFVKP a DKA. Zároveň je zajímavým fenoménem vztah mezi velikostí pylových zrn a jejich viabilitou. To, že menší pylová zrna vykazovala obecně nižší viabilitu (neobarvila se, postrádala tedy DNA) může být dáno právě poruchou meiózy, při které dochází k rozchodu chromozomů do dceřinných buněk značně asymetricky.

Dvě třetiny zkoumaných rostlin *Hieracium prenanthoides* tvořily pyl, navíc většinou ve velkém množství a sice s nízkou, ale nezanedbatelnou viabilitou. Ze sexuálního a evolučního hlediska tak tyto rostliny mohou sloužit jako potenciální otcovské rostliny. Vedle schopnosti tvořit viabilní pyl je však několik dalších možných prezygotických bariér – mnohé se týkají samičí složky sexuálního procesu. Problematika těchto a návazných fází sexuálního procesu je diskutována v následující kapitole 6.2.

V rámci pylových analýz došlo i k důležitým zjištěním, která se týkají metod zjišťování pylové viability. Studium pylové viability se ukázalo jako velice problematické. Metodou první volby byla Alexandrova metoda, která byla úspěšně použita jak u rodu *Hieracium* (Slade & Rich 2007, Thomas et al. 2011), tak u příbuzného rodu *Pilosella* (Rotreklová 2008) nebo např. u rodu *Cirsium* (Bureš et al. 2010). V případě jestřábníku věsenkovitého podávala tato metoda falešně pozitivní výsledky – v případě tří testovaných rostlin různých populací obarvila všechna pylová zrna červenofialově a vykazovala tak 100% viabilitu. V důsledku tohoto podezřelého zjištění jsem se rozhodnul namíchat barvivo znovu a opětovně pyl otestovat, navíc při různých teplotách (50°C, 35 °C, 20°C). Ve všech případech došlo opět ke 100% obarvení pylových zrn na červenofialovo. Následně jsem metodu podrobil dalšímu kritickému experimentu a pylová zrna jsem usmrtil jak fyzikálně (v mikrovlnné troubě po dobu 1 minuty na maximální výkon), tak chemicky (v 96% etanolu po dobu 5 minut). Přesto i takto usmrcená pylová zrna se následným barvením obarvila červenofialově a měla tak být viabilní. Alexandrovu metodu jsem vyhodnotil jako poskytující falešně pozitivní výsledky a upustil jsem od jejího dalšího použití. Metoda byla použita přesně podle metodiky, všechny použité chemikálie byly nově zakoupené a

tedy dlouho před datem spotřeby. Falešně pozitivní výsledky resp. výsledky značně nadhodnocující reálnou viabilitu však byly při použití Alexandrova barviva zjištěny v mnoha studiích (např. Parfitt & Ganeshan 1989, Kämpyllä 1991, Marcellan & Camadro 1996, Baez 2002). Úskalí metody patrně tkví v tom, že nebarví pylová zrna na základě viability jako spíš na základě jejich obsahu (Daphni 1992).

Opačný případ nastal u tetrazoliového testu. Ten je z hlediska použitých chemikálií, snadného a rychlého použití i mechanismu působení (barví enzymaticky aktivní – tedy jednoznačně živé – buňky) velmi elegantní. Přes dodržení přesného metodického postupu se však pylová zrna neobarvila vůbec. Funkčnost testu jsem se pokusil ověřit na pylových zrnech *Sonchus asper* (L.) Hill. (lokalita: experimentální pozemek Katedry botaniky PřF UP Olomouc v Olomouci, plevelná rostlina). U něj, jakožto u druhu s normálním sexuálním rozmnožováním, jsem předpokládal vysokou pylovou viabilitu. Přesto ani jeho pylová zrna se tetrazoliovým testem nepodařilo obarvit. Vyzkoušel jsem širokou škálu různých metodických modifikací podmínek (různé koncentrace sacharózy, různá teplota a čas působení), přesto pylová zrna vždy vykazovala 0% viabilitu. Při obarvení celého květu jestřábníku věsenkovitého (podle základního metodického postupu) se však některé jeho části zbarvily dočervena. Slabě až středně intenzivně červeně se zbarvily některé části blizny, čnělky, prašníků či dolní část liguly, sytě červeně se vybarvilo mladé pletivo budoucí nažky. Pylová zrna však vždy zůstala nezbarvená. Tetrazoliový test jsem pro účely zjištění pylové viability jestřábníku věsenkovitého vyhodnotil jako poskytující falešně negativní výsledky a upustil jsem od jeho dalšího použití. Neúspěšné použití TTC testu u studovaného druhu vyplývá s největší pravděpodobností z mechanismu působení. Vyzrálá pylová zrna mají značně utlumený metabolismus a velmi nízké nebo prakticky žádné buněčné dýchání – v důsledku nedojde k jejich obarvení. Účinnost metody se naopak prokázala u jiných částí pletiva květu, které se obarvily, protože jsou jednoznačně metabolicky velmi aktivní – například mladá vyvíjející se nažka, která se zbarvila sytě červeně.

Jako úspěšná tak byla vyhodnocena pouze metoda barvení acetokarmínem. Protože i tato metoda je občas kritizována za barvení mrtvých pylových zrn (Parfitt & Ganeshan 1989), je zapotřebí hodnotu dosažených výsledků považovat spíše za nejvyšší možnou viabilitu než za viabilitu průměrnou. Přesto, mechanismus jejího barvení založený na barvení DNA lze považovat za spolehlivý minimálně z hlediska potenciální viability. Metoda tak jasně prokazuje důležitou charakteristiku pylových zrn (obsah DNA), která je v přímém vztahu s jejich viabilitou.

5.2. Reprodukční systémy *Hieracium prenanthoides* agg.

Naprostá většina analyzovaných semen polyploidních rostlin jestřábníku věsenkovitého z přírodních populací vznikla apomikticky. Stejně tak semena polyploidů vzniklá po umělém zásahu v podobě experimentálního opylování vznikla v naprosté většině apomikticky, tedy bez účasti pylu. U analyzovaných morfotypů jestřábníku věsenkovitého tak funguje rovněž diplosporie typu *Antennaria*, stejně jako u jiných dříve analyzovaných druhů (Bergman 1941, Gustafsson 1946–1947, Skawińska 1962). Tento způsob rozmnožování zabraňuje sexuálnímu procesu ze své samotné podstaty – zárodečný vak vzniká mitotickým dělením samičí archesporální buňky, meióza je zcela potlačena (Bergman 1941, Gustafsson 1946–1947). Navíc je potenciální sexuální proces ještě více znepravděpodobněn, protože embryo se začíná formovat již v době před samotným rozkvetením květu (Skawińska 1962, Nogler 1984). Proto i v rámci relativně velkého souboru analyzovaných semen polyploidů např. z Rýchor nebyl zaznamenán jiný než apomiktický způsob vzniku semen. Přitom zde sympatricky jen pár desítek metrů od sebe roste v mozaice několik relativně bohatých populací triploidů i tetraploidů (Kocián 2012). Přestože obě populace patří k morfotypům tvořícím alespoň částečně vitální pyl a je zde hojná přítomnost opylovačů (Kocián, vlastní pozorování), nebyl v těchto populacích zaznamenán žádný sexuální proces. Stejně tak s jedinou výjimkou nedošlo k sexuálnímu procesu u polyploidů ani při nucené umělé hybridizaci.

U sexuálních alogamních diploidů, kteří byli použiti jako mateřské rostliny při umělé hybridizaci, byl předpoklad, že by mohli po opylení pylem polyploidů vytvořit sexuálně vzniklé nažky. To bylo prokázáno při experimentálním křížení dokonce dvou různých druhů různých ploidií – *Hieracium umbellatum* ($2x$, ♀) a *H. sabaudum* ($3x$, ♂; Mráz & Tomčíková 2004). Došlo přitom ke vzniku diploidního hybridního potomstva. U diploidů jestřábníku věsenkovitého nedošlo po opylení pylem triploidních rostlin ke vzniku žádných vyvinutých nažek. V případě opylení pylem tetraploidní rostliny vznikly v naprosté většině rovněž prázdné nažky, s výjimkou dvou. Tyto dvě nažky se bohužel nepodařilo cytometricky zanalyzovat v důsledku laboratorní nehody. Přesto, potenciální hybridizace při současném časoprostorovém výskytu diploidů a polyploidů s vitálním pylem se jeví jako značně nepravděpodobná, potenciálně probíhající jen ve velmi malé míře. U diploidů nedocházelo (s možnou výjimkou ojedinelých dvou vyvinutých nažek) ani k mentor efektu, tedy k indukci samoopylení v důsledku přítomnosti cizího pylu na blizně, který byl prokázán u diploidního *Hieracium alpinum*

(Mráz 2003).

U některých semen nebyl zaznamenán endosperm. To mohlo být v některých případech zapříčiněno dlouhým skladováním semen před jejich analýzou (v některých případech až dva měsíce), kdy endosperm byl embryem postupně spotřebován. Nápadná absence endospermu byla u populace OV, kdy endosperm často chyběl i v případě nedávno sklizených semen. To by mohlo svědčit o jeho narušené tvorbě (u této populace byla zjištěna i zcela narušená tvorba pylu demonstrovaná jeho úplnou absencí). Přestože tento stav značně snižuje možnost klíčení semen (ověřeno i experimentálním výsevem), v Jeseníkách se jedná o relativně rozšířený morfotyp (Kocián, nepubl.). Možným vysvětlením také je, že u tohoto morfotypu může docházet ve větší míře k tvorbě endospermu se somatickým počtem chromozomů. Tento jev byl vyzorován u triploidního *Hieracium alpinum* (Skawińska 1962). Endosperm by se v tom případě na fluorescenčním histogramu překrýval s peakem embrya a nebyl by tak cytometricky rozlišitelný. Toto vysvětlení, potenciálně prokázatelné embryologickou studií, se může týkat i ostatních populací, kde nebyl zaznamenán endosperm.

Celkovým zhodnocením lze konstatovat, že v naprosté většině případů vznikla analyzovaná semena apomikticky, bez sexuálního procesu, a byla tedy geneticky identická s mateřskou rostlinou. Přesto, vyskytly se tři ojedinělé výjimky, které mohou mít určitý evoluční potenciál. Zajímavé je, že všechny se vyskytly u tetraploidních rostlin. Jednotlivými případy se zabývají následující podkapitoly.

5.2.1. Semeno s tetraploidním embryem a hexaploidním endospermem

Výstupem cytometrické analýzy běžně sexuálně se rozmnožujících rostlin je fluorescenční histogram, kde peak endospermu je v 1,5násobku peaku embrya (Matzk et al. 2000). Takovýto ojedinělý histogram byl zaznamenán u jednoho vzorku tří semen rostliny jestřábníku věsenkovitého z tetraploidní populace OV (obrázek 6). Na kanálu 152,72 byl zaznamenán malý hexaploidní peak endospermu, na kanálu 197,35 pak drobný typicky umístěný peak oktoploidního endospermu. Protože byla v jednom vzorku analyzována tři semena, je otázkou, zda byly přítomny dva hexaploidní endospermy a jeden oktoploidní, nebo jeden hexaploidní a dva oktoploidní. Přestože velikost endospermových peaků by nasvědčovala první možnosti, vzhledem k ověřené velké vzácnosti sexuálního vzniku endospermu společně s častou absencí oktoploidního endospermu u rostlin populace OV se přikláním k druhé možnosti. Zanalyzované semeno s tetraploidním embryem a hexaploidním endospermem tak dokládá velmi

vzácnou reziduální sexualitu u tohoto morfotypu jestřábníku věsenkovitého.

Vzhledem k výše popsaným mnoha problémům zabraňujícím sexuálnímu procesu u polyploidních jestřábníků je vznik tohoto ojedinělého semene velmi pozoruhodný. Jistě vzniknul sexuálním procesem endosperm. U embrya je situace značně diskutabilní; vzhledem k zcela potlačené meióze je sexuální vznik embrya velmi nepravděpodobný. Meióza přesto u jestřábníků při tvorbě vajíček probíhá – Skawińska (1962) ji u triploidního *Hieracium alpinum* zaznamenala v asi 50 % případů, chromozomově nevyvážené tetrády však vždy bez výjimky abortoaly. U tetraploidní rostliny si vzhledem k ortoploidii lze představit možnou tvorbu viabilního redukovaného embrya se somaticky poloviční, tedy diploidní sadou chromozomů. Tento jev však nebyl nikdy pozorován.

V případě vzniku endospermu existují dvě možnosti. Buď vznikl klasickým sexuálním způsobem, tedy splynutím dvou redukovaných buněk ($2x + 2x = 4x$) s následným opylením diploidní pylovou buňkou ($4x + 2x = 6x$). Tento proces ovšem opět předpokládá předchozí chromozomově vyvážené meiotické dělení vedoucí k viabilnímu vajíčku. Nebo, pokud u tohoto morfotypu opravdu dochází k aberantnímu vzniku endospermu, který je tetraploidní, mohl endosperm vzniknout prostým oplodněním takového endospermu diploidní pylovou buňkou. Nebylo by tak zapotřebí meiózy – vajíčko by se vyvíjelo typickým apomiktickým procesem s tou modifikací, že by došlo k oplodnění endospermu. V prvním případě by tak rostlina vzniklá z tohoto semene nebyla geneticky identická s mateřskou rostlinou, v druhém případě by i přes jiný než apomiktický způsob vzniku endospermu geneticky shodná byla, jelikož by proces nezasahoval do genetického vývoje embrya.

V obou nastíněných případech vzniku endospermu by bylo oplodnění, ať už zahrnujícího i embryo nebo ne, zprocesováno diploidní pylovou buňkou. Taková pylová buňka může s určitou nízkou pravděpodobností vzniknout. Nemohla však pocházet od tohoto morfotypu jestřábníku věsenkovitého, protože pyl netvoří. Na dané jesenické lokalitě se kromě něj vyskytovalo ještě *Hieracium stygium*, *Hieracium* cf. *lachenalii* a *Hieracium* cf. *laevigatum*. Zda tyto rostliny tvoří pyl, není známo.

5.2.2. Oktoploidní embryo

Z jiné rostliny, ale ze stejné populace jako semeno popsané v kap. 6.2.1., pochází i semeno, které mělo oktoploidní embryo a hexadekaploidní endosperm (obrázky 7 a 8). Jedná se o doklad vzácné polyploidizace v přírodní populaci jestřábníků.

Polyploidizace, často v návaznosti na předchozí hybridizaci, je významným fenoménem podílejícím se na vzniku nových druhů (např. Herdén 1996, Guo et al. 2005, Schranz et al. 2005). V tomto případě došlo nejspíš k autopolyploidizaci, o čemž svědčí i apomiktický způsob vzniku endospermu. K procesu patrně došlo prostou poruchou buněčného cyklu v iniciálním stádiu samičí archesporální buňky.

Ze semene by po vyklíčení vznikla s největší pravděpodobností oktoploidní rostlina. Takovýto cytotyp není u jestřábníků, narozdíl od příbuzného rodu chlupáček (Schuhwerk 1996, Rotreklová et al. 2002), znám (Schuhwerk 1996, Chrtěk et al. 2007 a další chromozomové seznamy). Přestože v minulosti mohlo u jestřábníků k autopolyploidizaci docházet ve větší míře, zdá se, že je proti takto vysokým ploidím vyvíjen silný selekční tlak. Zda k autopolyploidizaci dochází u diploidů s následným vznikem tetraploidního cytotypu, nebylo možné u diploidních rostlin zjistit v důsledku jejich nízké vitality doprovázené nízkým počtem normálně vyvinutých úborů (většina úborů diploidních rostlin zasychala ve fázi pupat patrně z důvodu nevhodných ekologických podmínek při pěstování v nížině; normálně vyvinuté úbory tak byly vzácné a byly použity výhradně pro účely experimentální hybridizace s jinými ploidie).

5.2.3. Pentaploidní embryo

Po opylení tetraploidních rostlin rostlinami diploidními vznikla v naprosté většině případů tetraploidní embryo, a to apomiktickým způsobem. Původním předpokladem bylo, že tímto typem křížení by mohla vzniknout triploidní embryo (splynutím redukovaných gamet rodičovských rostlin). Tento předpoklad se nicméně nepodařilo experimentálním křížením dokázat. Překvapivě byla naopak tímto typem křížení prokázána možnost vzniku pentaploidního embryo (obrázek 9). Jednalo se o ojedinělý jev a pentaploidní embryo vzniklo s největší pravděpodobností splynutím neredukované gamety (4x) tetraploidní mateřské rostliny s redukovanou gametou (1x) diploidní rostliny otcovské.

Tento mechanismus je tak možným vysvětlením vzniku pentaploidních cytotypů jestřábníků. Pentaploidie je v rámci rodu *Hieracium* velmi vzácná. Byla zatím zjištěna jen u pěti druhů; jejich výčet společně s informací o výskytu příslušného cytotypu shrnuje následující tabulka:

Druh	Výskyt; počet lokalit	Zdroj
<i>Hieracium pentaploideum</i>	Skotská vysočina (Velká Británie); 1	Stace et al. 1995, Tennant & Rich

Sell & Tennant	lokalita	2008
<i>H. chrysostyloides</i> (Zahn)	Hrubý Jeseník (Česká republika); dříve	Chrtek 1996, Kocián nepubl.
Chrtek	více lokalit po celém hlavním hřebeni, dnes 5 lokalit	
<i>H. viosum</i> Pall.	Krasnojarsk (Rusko); 2 lokality	Pulkina & Tupitsyna 2000
<i>H. intermarginatum</i> Joh. & Sam	Dalarna (Švédsko); 2 lokality	Johansson & Samuelsson 1923, Tyler & Jönsson 2009
<i>H. cf. plumbeum</i>	Harz (Německo); 1 lokalita	Tyler & Jönsson 2009

Tabulka 30: Přehled známých pentaploidních druhů jestřábníků.

S výjimkou *Hieracium viosum* se jedná o druhy (*H. pentaploideum*, *H. chrysostyloides*, *H. intermarginatum*) resp. taxonomicky nevyřešené typy (*H. cf. plumbeum*) endemické a svým výskytem vázané jen na malé území. Tyto taxony mají jedinou ploidní úroveň – $2n = 5x = 45$. *H. viosum* má široký eurasijský areál (Üksip 1960) a z hlediska ploidie je vysoce heterogenní, nicméně pentaploidní cytotyp je známý pouze z dvou lokalit v Krasnojarsku (Pulkina & Tupitsyna 2000). V rámci rodu *Hieracium* se (s výjimkou *H. pentaploideum* a *H. chrysostyloides*) jedná o neblízce příbuzné druhy z různých sekcí.

Hypotetickým evolučním mechanismem zodpovědným za vznik těchto pentaploidních taxonů by tedy mohly být hybridizační události mezi apomiktickými tetraploidy a sexuálními diploidy. Nutným předpokladem by byl souběžný časoprostorový výskyt takových dvou cytotypů. Diploidi jsou však v současnosti vzácní a jejich výskyt je zpravidla vázán na malé refugiální oblasti v jihoevropských pohořích (cf. Szelağ et al. 2007). Je tedy otázkou, kde a kdy pentaploidní taxony vznikly.

Jedním možným řešením problému je, že v minulosti byli diploidi hojnější a rozšířenější a přicházeli do styku s polyploidy, resp. v tomto případě s tetraploidy. Endemický charakter výskytu pentaploidů by nasvědčoval jejich vzniku v oblastech současného výskytu (nebo v jejich blízkém okolí). Diploidní nebo oba rodičovské taxony mohly vyhynout a do dnešní doby se mohl udržet jen jejich pentaploidní potomek.

Druhým možným řešením problému je, že teoreticky není ani tak důležitá přítomnost diploidních rodičů, jako spíše haploidních pylových zrn. A taková pylová zrna mohou tvořit i polyploidy. V tom případě by pak diskutovaný model vzniku pentaploidů nebyl závislý na přítomnosti diploidů.

S těmito dvěma předpoklady lze nyní nastínit hypotézy vzniku konkrétních

pentaploidních taxonů. Obecným rysem všech diskutovaných pentaploidů je, že by se vzhledem k čtyřpětinové účasti mateřského genomu na složení genomu pentaploida měl tento morfologicky podobat mateřskému taxonu.

Hieracium chrysostyloides spadá do agregátu *H. nigrescens* (sekce *Alpina*, subsekce *Atrata*), jehož předpokládanými rodičovskými druhy jsou *H. alpinum* a *H. murorum* ($H. alpinum \geq H. murorum$; Zahn 1922–1938). Morfologicky, jak napovídá uvedená rodičovská formule, je *H. chrysostyloides* bližší *H. alpinum*, se kterým je navíc velmi podobné i ekologicky (Chrtek 2004). Z hlediska genetického podílu rodičů by tedy mateřskou rostlinou mělo být tetraploidní *H. alpinum* a otcovskou rostlinou diploidní *H. murorum* (nebo polyploidní *H. murorum* tvořící haploidní pylová zrna). Oba předpokládané rodičovské druhy v současnosti rostou v oblasti výskytu *H. chrysostyloides*, tedy v Hrubém Jeseníku (Chrtek 2004). Jejich výskyt je však altitudinálně oddělen – *H. alpinum* roste na horských holích, *H. murorum* dosahuje výškového maxima při horní hranici lesa (Skřivánek 1956). V současnosti jsou tak lokality obou druhů prostorově odděleny. Navíc velmi pravděpodobně nesplňují cytotypové podmínky rodičovských druhů: přestože nebyly jejich zdejší populace podrobeny karyologickému studiu, ze známých informací o ploidii obou druhů jinde v České republice i v celém areálu (cf. Schuhwerk 1996 a další chromozomové seznamy) lze předpokládat, že oba druhy jsou triploidní. V případě otcovského *H. murorum* by to nebyla překážka, pokud by tvořilo haploidní pyl. Nicméně přítomnost tetraploidního *H. alpinum* je nezbytnou nutností. Současné prostorové oddělení lokalit předpokládaných rodičovských druhů zároveň s absencí vhodných cytotypů minimálně v případě *H. alpinum* tak klade vznik *H. chrysostyloides* do minulosti do doby, kdy oba předpokládané rodičovské druhy mohly koexistovat na společné lokalitě, a to pravděpodobně v nižší nadmořské výšce. Tento stav mohl nastat nejpozději po poslední době ledové. S rozvojem lesa a s postupným zvyšováním jeho horní hranice v době poledové bylo *H. chrysostyloides* vytlačeno na vrcholové hole Hrubého Jeseníku, mateřské tetraploidní *H. alpinum* vyhynulo a otcovské *H. murorum* buď vyhynulo nebo se do současnosti vyskytuje v lesních porostech Hrubého Jeseníku.

Co se potenciálních rodičovských druhů *H. chrysostyloides* týče, jejich identita není zdaleka jasná a pravděpodobně je jiná než ta uváděná v parentální morfologické formulí. Je potřeba zdůraznit, že ustanovení předpokládaných rodičovských druhů je koncept starý více než století a vycházel ze znalosti morfologie v současnosti existujících druhů. Ve skutečnosti jsou však v mnoha případech rodičovské druhy resp.

genetické zdroje současných druhů zřejmě jiné, často pravděpodobně již vyhynulé taxony. Tyto se nicméně mohly podobat dnešním druhům uváděným jako rodičovské, případně se v současnosti uváděné rodičovské druhy mohly rovněž vyvinout právě z těchto vyhynulých taxonů. Na pozici tetraploidní mateřské rostliny tak existuje vhodnější adept než *H. alpinum*, jehož tetraploidní cytotyp pravděpodobně neexistuje (cf. Tennant & Rich 2008; což nicméně nevyklučuje jeho existenci v minulosti). Mohl by jím být přímo některý druh z okruhu *Hieracium nigrescens*, který zahrnuje (právě s výjimkou *H. chrysostyloides*) výlučně tetraploidní taxony (Chrtěk 1994, Mráz 2001). Takový druh nicméně v Hrubém Jeseníku v současnosti neroste; ať už byla identita mateřského taxonu jakákoliv, je pravděpodobně (i když ne nutně) vyhynulý. Ještě méně zřejmá je pravá identita otcovské rostliny. Při pouhém jednopětinovém genetickém podílu v genomu *H. chrysostyloides* je těžké ji odhadnout – mohlo se jednat o *H. murorum* stejně dobře jako o množství jiných druhů.

V případě *Hieracium pentaploideum* je situace poněkud jasnější. Druh je řazen do sekce *Alpina*. Na Skotské vysočině roste 33 druhů této sekce (Tennant & Rich 2008), z nichž dvě třetiny jsou tetraploidní (Stace et al. 1995, Stace et al. 1997) a čtyři tetraploidní druhy rostou přímo v oblasti výskytu *H. pentaploideum* (Tennant & Rich 2008). Mateřskou rostlinou tak mohl být některý z v současnosti existujících tetraploidních druhů (*H. hanburyi*, *H. kennethi*, *H. neomarginatum*, *H. perscitum*), donorem pylu buď vyhynulý diploid nebo do současnosti existující polyploid; v oblasti výskytu *H. pentaploideum* rostou dva triploidní druhy ze sekce *Alpina* – *H. alpinum* a *H. holosericeum*, z nichž však pouze druhý jmenovaný tvoří pyl (Slade & Rich 2007) a bylo by jej možné uvažovat jako potenciální otcovskou rostlinu. Soutěžící hypotézou vzniku druhu *H. pentaploideum* je ta, kterou vyslovili Slade & Rich (2007) a která staví roli rodičovských druhů přesně naopak. Autoři vysvětlují vznik *H. pentaploideum* možným splynutím neredukované triploidní gamety mateřského triploidního druhu (*H. alpinum* nebo *H. holosericeum*) s redukovanou diploidní gametou tetraploidního otcovského druhu (*H. kennethi*, *H. (neo)marginatum*, *H. perscitum*; pro další možné způsoby vzniku pentaploidů viz závěr této podkapitoly). *H. pentaploideum* tak nicméně v obou případech mohlo vzniknout i relativně nedávno vzácnou hybridizační událostí mezi v současnosti existujícími druhy, což by podporoval i jeho ryze stenoendemický charakter výskytu (jediná známá lokalita s jedinou populací; Tennant & Rich 2008).

Nově byly zjištěny dva pentaploidní taxony *Hieracium intermarginatum* a *H. cf. plumbeum* (Tyler & Jönsson 2009). K pentaploidní rostlině *Hieracium cf. plumbeum* z

německého pohoří Harz autoři uvádějí, že je morfologicky velmi podobná fenoskandinávskému *H. plumbeum*, které je tetraploidní (Chrtek et al. 2007, Tyler & Jönsson 2009). Totožnost rostliny nicméně nebyla zhodnocena odborníkem na středoevropskou flóru a může se tak jednat o jiný, blíže příbuzný druh (Tyler & Jönsson 2009). V rámci evolučních úvah ohledně vzniku této pentaploidní rostliny se nabízí, že se rostlina vyvinula z embrya vzniklého splynutím neredukované tetraploidní gamety *H. plumbeum* (které je i ve své typické formě ze střední Evropy známo; A. Sennikov in litt. 2013) s haploidní gametou otcovské rostliny.

Hieracium intermarginatum patří do sekce *Hieracium*, která je ve Skandinávii velmi druhově bohatá (Johansson & Samuelsson 1923). Vzhledem k vysoce retikulárnímu uspořádání morfologické variability druhů této sekce ve Skandinávii je při současných znalostech prakticky nemožné určit potenciální rodičovské taxony.

Konečně, specifickým případem je *Hieracium viosum*, u kterého byli pentaploidi zjištěni ve dvou značně cytotypově heterogenních sibiřských populacích (Pulkina & Tupitsyna 2000). Zvláště v populaci z rezervace Štolby, kde rostou diploidní i tetraploidní rostliny, se při vzniku pentaploidního cytotypu mohl ukázkově uplatnit diskutovaný model. Hybridizační událost tak mohla proběhnout teprve nedávno, resp. i v současnosti existují podmínky potřebné pro její uskutečnění (souběžný časoprostorový výskyt diploidního a tetraploidního cytotypu). Bylo by velmi zajímavé provést studii reprodukčních systémů polyploidního komplexu *Hieracium viosum*. Tento druh by byl díky existenci šesti euploidních a čtyř aneuploidních úrovní ještě lepším modelovým druhem než *H. prenanthoides*. Zároveň by se vzhledem k morfologické homogenitě jednotlivých cytotypů (Pulkina & Tupitsyna 2000) dala předpokládat nižší pravděpodobnost potenciálních hybridizačních překážek na genetické úrovni než je tomu hypoteticky v případě polymorfního (a polyfyletického?) *H. prenanthoides* agg.

Celá diskuze v této podkapitole vychází z premisy vzniku pentaploidních taxonů jestřábníků splynutím neredukované mateřské tetraploidní gamety s redukovanou otcovskou gametou haploidní. Existují nicméně další možné modely.

Jedním z nich by mohl být model uvažující rovněž neredukovanou tetraploidní gametu a redukovanou haploidní, ovšem v opačné rodičovské roli: haploidní gameta by byla samičí, tetraploidní samčí, tj. diploidní rostlina by byla mateřská a tetraploidní otcovská. Toto je pravděpodobný způsob vzniku zemědělsky významného pentaploidního jahodníku 'Jilin 4', který vznikl přirozenými procesy v horách

severovýchodní Číny (Lei et al. 2005). Experimentálně byl tento model vzniku pentaploida prokázán jako vzácný jev při zkřížení diploidní a tetraploidní pampelišky (Záveský et al. 2007). V případě jestřábíků je však tato možnost komplikovaná narušenou mikrosporogenezi polyploidů (Rosenberg 1927, tato studie) a obligátní účastí vzácných diploidních cytotypů při hybridizaci.

Další možnosti vzniku pentaploidních jestřábíků jsou ty, které uvažují účast dvou redukovaných gamet. Existují dva způsoby tohoto typu, které by mohly ke vzniku pentaploida vést: (1) hybridizace mezi diploidní a oktoploidní rostlinou a (2) hybridizace mezi tetraploidní a hexaploidní rostlinou. První možnost je nicméně nereálná kvůli neexistenci oktoploidních jestřábíků, druhá je nereálná z důvodu nemeiotické tvorby samičích gamet u polyploidních jestřábíků.

Kromě v této práci experimentálně ověřeného modelu možného vzniku pentaploidních jestřábíků je tak pravděpodobný patrně jen jediný další, a to ten již zmíněný u druhu *H. pentaploideum*, v němž je uvažováno splynutí neredukované triploidní mateřské gamety s redukovanou diploidní gametou tetraploidní otcovské rostliny (Slade & Rich 2007). Tento model byl experimentálně dokázán při křížení neapomiktické avšak diplosporické triploidní pampelišky s tetraploidní pampeliškou jako donorem pylu za vzniku pentaploidních semen (Záveský et al. 2007).

Experimentálně jsem tedy zjistil, že splynutím neredukované mateřské tetraploidní gamety s redukovanou otcovskou haploidní gametou může vzniknout pentaploidní embryo a to se dále vyvíjet minimálně do ontogenetické fáze zralého semene. Zda se tento model uplatnil při vzniku v současnosti existujících pentaploidních taxonů jestřábíků, je nicméně složité dokázat. Experimentálně by jej bylo možné prokázat nejlépe a nejsnadněji u *Hieracium virosum*, a to opylením tetraploidního cytotypu cytotypem diploidním s následnou cytometrickou analýzou semen/potomstva. Možné, i když v současnosti poněkud problematické a omezené, by bylo i použití molekulárních metod. Analýza chloroplastové DNA by mohla napovědět informaci o identitě mateřského rodičovského taxonu. Některá z metod analýzy jaderné DNA – např. GISH – by mohla pomoci zjistit složení jaderného genomu pentaploida. S rozvojem molekulárně-biologických metod by v budoucnu mohlo být i možné přesně identifikovat chromozomy mateřského i otcovského rodiče pentaploida. Pokud by bylo možné s jednotlivými chromozomy manipulovat, mohly by se z genomu pentaploida např. deletovat chromozomy otcovské rostliny a ze zbývajících genomu dopěstovat a tak rekonstruovat tetraploidní mateřský taxon.

Konečně, otázkou je, proč jsou pentaploidní cytotypy u jestřábníků tak vzácné. Příčiny nejsou objasněny, jsou zřejmě multifaktoriální. Obecně se vysoká ploidie u jestřábníků jeví jako negativní faktor, který patrně (vzhledem k nízkému počtu pentaploidních taxonů i nízkému počtu samotných jedinců těchto taxonů) podléhá silné selekci. Vzácnost pentaploidních taxonů je navíc patrně umocněna přirozeně evolučně vzácně probíhajícími událostmi, které vedou ke vzniku této vysoké ploidie.

5.4. Evoluční důsledky

Přestože od doby J. G. Mendela značně pokročily znalosti o rozmnožování jestřábníků, jejich patrně značně komplikovaná evoluční historie je stále neobjasněna. Hlavní teorii, že v minulosti docházelo k rozsáhlé mezidruhové hybridizaci s následnou polyploidizací (např. Tennant & Rich 2008), se nedaří experimentálně prokázat resp. ji blíže objasnit. Diploidní druhy jsou schopné vytvořit hybridogenní potomstvo, to je ale vždy opět diploidní (Mráz et al. 2005, Mráz & Paule 2006, Chrtek et al. in prep.). Při křížení diploidních druhů (♀) s polyploidy (♂) dochází buď k mentor efektu a indukci samoopylení (Mráz 2003), nebo nedojde k vytvoření vyvinutých nažek (tato studie), v některých případech byl zjištěn vznik hybridogenního diploida (Mráz & Tomčíková 2004) i hybridogenních triploidů (Paule 2004). Takto vzniklí triploidi však byli sterilní (Paule l. c.) a stále se tedy nedaří vysvětlit vznik tak obrovského množství úspěšných a široce rozšířených triploidních druhů. V opačných rodičovských rolích (diploidi ♂, polyploidi ♀) naráží hybridizace na značnou překážku v podobě apomixie polyploidů. Takovouto hybridizací může sice vzácně vzniknout hybridogenní potomstvo, které by vysvětlovalo např. vznik pentaploidních taxonů (tato studie), její podíl na vzniku v současnosti hojných tri- a tetraploidních druhů je však značně nepravděpodobný.

Zdá se tak, že rod *Hieracium* dospěl evolučně do stavu, kdy je speciace možná téměř výhradně jen na úrovni diploidních druhů. Přestože v evoluční historii rodu muselo značně extenzivně docházet k polyploidizaci, není tento jev v současnosti pozorován a nedaří se jej ani experimentálně vyvolat tak, aby vzniklo fertilitní potomstvo. Oproti rodu *Pilosella* se polyploidní zástupci rodu *Hieracium* zdají být evolučně zakonzervovanými liniemi, u kterých může k dalšímu vývoji docházet snad nanejvýš prostřednictvím mutací. Tento stav značně komplikuje možnosti studia rodu. Předkové současných druhů patrně měli genetický potenciál umožňující rozsáhlou hybridizaci spojenou s polyploidizací. Ti však patrně již vymřeli a dnes pozorujeme produkty tehdejších procesů, tedy současné druhy, které daný genetický potenciál

postrádají a stali se tak z evolučního hlediska slepými uličkami vývoje tohoto rozsáhlého rodu. Přesto jsou polyploidi široce rozšířeny a tedy alespoň v současnosti evolučně úspěšné.

6. Závěr

Diplomová práce se zabývala studiem reprodukčních systémů polyploidního komplexu jestřábníku věsenkovitého. Cílem bylo zhodnotit kvantitativní a kvalitativní charakteristiky pylu a způsob vzniku semen vzniklých v přírodních populacích a po experimentálním křížení. Celkově bylo do studie zahrnuto dvacet šest populací z Francie, České republiky a Slovenska.

Z palynologického hlediska bylo prozkoumáno 12 populací. Dvě třetiny populací tvořily pyl, většina ve velkém množství. Všechny rostliny tvořily pyl heterogenní velikosti. Viabilita pylu byla poměrně nízká, průměrně 40 %. Pro zjištění pylové viability byly použity tři metody. Alexandrovo barvení vykazovalo falešně pozitivní výsledky, tetrazoliový test naopak falešně negativní; obě tyto metody tak nebyly nakonec pro zjištění pylové viability použity. Osvědčilo se barvení acetokarmínem, které poskytovalo nejspolehlivější výsledky.

Po opylení diploidních rostlin pylem polyploidů došlo v naprosté většině případů k tvorbě nevyvinutých nažek; vzácně došlo k tvorbě nažek vyvinutých, a to buď v důsledku mentor efektu nebo hybridizace. Jak v přírodních populacích, tak po experimentálním křížení vznikla naprostá většina semen polyploidních rostlin apomikticky. Ve dvou tetraploidních populacích byly zjištěny tři ojedinělé výjimky dokládající vzácně probíhající polyploidizační procesy a reziduální sexualitu. Přestože tyto procesy mohou mít určitý evoluční potenciál, nevysvětlují rozsáhlou mezidruhovou hybridizaci spojenou s polyploidii, předpokládanou v evoluční historii rodu.

Výsledky diplomové práce posilují hypotézu, že rod *Hieracium* se vývojově dostal do slepé uličky evoluce. Přesto mají jestřábníky značný podíl na biodiverzitě holarktické oblasti. Z vědeckého hlediska je pak celý rod velmi cenným a významným dokladem složitých evolučních procesů, které stále čekají na své objasnění.

7. Literatura

- Alexander M. P. (1969): Differential staining of aborted and nonaborted pollen. – *Stain. Technol.* 44: 117–122.
- Allem A. C. (2003): Optimization theory in plant evolution: An overview of long-term evolutionary prospects in the angiosperms. – *Bot. Rev.* 69: 225–251.
- Asker S. E. & Jerling L. (1992): *Apomixis in plants*. – CRC Press, Boca Raton.
- Baez P., Riveros M. & Lehnebach C. (2002): Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in south Chile. – *New Zealand Journal of Botany* 40: 671–678.
- Barker W. W. (1966): *Apomixis in the genus Arnica (Compositae)*. – Ms. [dise. pr., depon. in University of Washington, Seattle].
- Barcaccia G. & Albertini E. (2013): Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma. – Dostupné na <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00497-013-0222-y>, přístup 7. 8. 2013.
- 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: 975–986.
- Bergman B. (1941): Studies on the embryo mother cell and its development in *Hieracium* subg. *Archieracium*. – *Svensk Botanisk Tidskrift* 35/1: 1–42.
- Böcher T. W. & Larsen K. (1950): Chromosome numbers of some arctic or boreal flowering plants. – *Medd. Grönl.* 147/6: 1–32.
- Bräutigam S. (1992): *Hieracium* L. – In: Meusel H., Jäger E. J. [eds]: *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora* 3. Gustaf Fischer, Verlag, Jena, Stuttgart, New York.
- Bureš P., Šmarda P., Rotreklová O., Oberreiter M., Burešová M., Konečný J., Knoll A., Fajmon K. &
- Šmerda J. (2010): Pollen viability and natural hybridization of Central European species of *Cirsium*. – *Preslia* 82: 391–422.

- Carman J.G. (1997): Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. – *Biological Journal of the Linnean Society* 61 (1): 51–94.
- Castro M., Mateo G. & Rosselló J. A. (2007): Chromosome numbers in *Hieracium* and *Pilosella* species (Asteraceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. – *Bot. J. Linn. Soc.* 153: 311–320.
- Danihelka J., Chrtěk J. & Kaplan Z. (2012): Checklist of vascular plants of the Czech Republic. – *Preslia* 84: 647–811.
- Dafni A. (1992): *Pollination Ecology: Practical Approach*. – Oxford Univ. Press, Oxford.
- Dafni A., Kevan P. G. & Husband B. C. (2005): *Practical Pollination Biology*. – Enviroquest. Ltd., Cambridge [Ontario, Canada].
- Doležel J., Doleželová M., Novák F. J. (1994): Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). – *Biologia Plantarum* 36: 351–357.
- Doležel J. (1997): Application of flow cytometry for the study of plant genomes. – *J. Appl. Genet.* 38: 285–302.
- Doležel J., Binarová P. & Lucretti S. (1989): Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. – *Biologia Plantarum* 31: 113–120. Doležel J., Doleželová M. & Novák F. J. (1994): Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. Balbisiana*). – *Biologia Plantarum* 36: 351–357.
- Doll R. (1974): *Die Gattung Taraxacum*. – A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt.
- Dostál J. (1989): *Nová květena ČSSR 2*. – Academia, Praha.
- Favarger C. (1969a): Notes de caryologie Alpine V. – *Bull. Soc. Neuchâtel Sci. Nat.* 92: 13–30.
- Favarger C. (1969b): [*Hieracium prenanthoides* chromosome numbers] In: IOPB chromosome number reports. – *Taxon* 18: 433–442.
- Fehrer J., Krahulcová A., Krahulec, F., Chrtěk J., Rosenbaumová R., Bräutigam S.

- (2007): Evolutionary aspects in Hieracium subgenus Pilosella. – In: Grossniklaus, U., Hörandl, E., Sharbel, T., van Dijk, P. (eds.) Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives, Regnum Vegetabile 147, Koeltz, Königstein.
- 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.
- Gustaffson A. (1946–1947): Apomixis in higher plants I–III. – Acta Univ. Lund. N.S. 42: 1–67, 43: 69–179, 43: 181–371.
- Hayirlioglu-Ayaz S. & Inceer H. (2004): Chromosome numbers of some species of the genus Hieracium s. str. (Asteraceae) from Turkey. – Folia Geobotanica 39: 319–325.
- Herdén M. (1996): Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European Dactylorhiza (Orchidaceae); evidence from allozyme markers. – Pl. Syst. Evol. 201: 31–55.
- Holub J. (1995): Rubus L. – In: Slavík B., Smejkal M., Dvořáková M. a Grulich V. [eds]: Květena České republiky 4. – Academia, Praha.
- Christoff M. & Popoff A. (1933): Cytologische Studien über die Gattung Hieracium . – Planta 20: 440–447.
- Chrtek J. (1996): Chromosome numbers in selected Hieracium species (Compositae) in the Sudeten Mts. and West and Ukrainian East Carpathians. – Fragm. Florist. Geobot. 41: 783–790.
- Chrtek J. (1997): Taxonomy of the Hieracium alpinum group in the Sudeten Mts., the West and the Ukrainian East Carpathians. – Folia Geobot. Phytotax. 32: 69–97.
- Chrtek J. (2004): Hieracium L. – In: Slavík B., Štěpánková J. [eds]: Květena České republiky 7. – Academia, Praha.
- Chrtek J., Mráz P. & Sennikov A. N. (2006): Hieracium ×grofae – a rediscovered diploid hybrid from the Ukrainian Carpathians. – Biologia 61/4: 365–373.
- Chrtek J., Mráz P., Zahradníček J., Mateo G. & Szelağ Z. (2007): Chromosome numbers

- and DNA ploidy levels of selected species of *Hieracium* s. str. (Asteraceae). – *Folia Geobotanica* 42: 411–430.
- Chrtek J., Zahradníček J., Krak K., & Fehrer J. (2009): Genome size in *Hieracium* subgenus *Hieracium* (Asteraceae) is strongly correlated with major phylogenetic groups. – *Annals of Botany* 104: 161–178.
- Johansson K. & Samuelsson G. (1923): *Dalarnes Hieracia Silvaticiformia*. – Leipzig.
- Jørgensen C. A., Sørensen T. & Westergaard M. (1958): The flowering plants of Greenland. A taxonomical and cytological survey. – *Dansk Vidensk. Selsk. Biol. Skr.* 9(4): 1–172.
- Käpylä M. (1991): Testing the age and viability of airborne pollen. – *Grana* 29: 430–433.
- Knight Ch. A., Clancy R. B., Götzenberger L., Dann L. & Beaulieu J. M. (2010): On the relationship between pollen size and genome size. – Dostupné na <http://www.hindawi.com/journals/jb/2010/612017/#B13>, přístup 2. 8. 2013.
- Kocián J. (2012): Rozšíření a cytogeografie jestřábníku věsenkovitého (*Hieracium prenanthoides* Vill.) v Sudetech a Západních Karpatech. – Ms. [bak. pr., depon. in: PřF UP, Olomouc].
- Koltunow A. M., Johnson S. D., & Bicknell R. A. (1998): Sexual and apomictic development in *Hieracium*. – *Sex. Plant Reprod.* 11: 213–230.
- Koltunow A. M., Johnson S. D., Bicknell R. A. (2000): Apomixis is not developmentally conserved in related, genetically characterized *Hieracium* plants of varying ploidy. – *Sexual Plant Reproduction* 12(5): 253–266.
- Koltunow A. M. G., Johnson S. D., Rodrigues J. C. M., Okada T., Hu Y., Tsuchiya T., Wilson S., Fletcher P., Ito K., Suzuki G., Mukai Y., Fehrer J. & Bicknell R. A. (2011): Sexual reproduction is the default mode in apomictic *Hieracium* subgenus *Pilosella*, in which two dominant loci function to enable apomixis. – *The Plant Journal* 66/5: 890–902.
- Konečný J. (2007): Pylová viabilita u střeoevropských druhů rodu *Cirsium* a jejich kříženců. – Ms. [dipl. pr., depon. in: PřF UP, Brno].

- Kovalčiková K (2004): Veľkosť peľu v blízko príbuzných rodoch Hieracium, Pilosella a Stenotheca (Asteraceae). – Ms. [dipl. pr., depon. in: PrF, Šafarikova Univerzita, Košice].
- Krahulcová A., Rotreklová O., Krahulec F., Rosenbaumová A. & Plačková I. (2009): Enriching ploidy level diversity: the role of apomictic and sexual biotypes of Hieracium subgen. Pilosella (Asteraceae) that coexist in polyploid populations. – Folia Geobotanica 44: 281-306.
- Lavrenko A. N., Serditov N. P. & Ulle G. (1990): Chromosome numbers in some species of flowering plants of the Urals (the Komi Autonomous Soviet Socialist Republic). – Bot. Žurn. 75: 1622–1624.
- Lei J., Li Y., Du G., Dai H. & Deng M. (2005): A natural pentaploid strawberry genotype from the Changbai mountains in Northeast China. – HortScience 40/5: 1194–1195.
- Löve Á. (1970): Íslensk ferðaflóra. – Almenna Bókafélagid, Reykjavík.
- Lysák M. A. & Doležel J. (1998): Estimation of nuclear DNA content in Sesleria (Poaceae). – Caryologia 52: 123–132.
- Marcellan O. N. & Camadro E. L. (1996): The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. – Scientia horticulurae 67/1–2: 101–104.
- Marciniuk J., Frabowska-Joachimiak A. & Marciniuk P. (2010): Differentiation of the pollen size in five representatives of Taraxacum sect. Palustria. – Biologia 65/6: 954–957.
- Matzk F., Meister A., Schuber I. (2000): An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. – The Plant Journal 21: 97–108.
- Meo A. A. (2005): Palynological studies of selected genera of the tribes of Asteraceae from Pakistan. – Ms. [dizer. pr., depon. in: Quaid-i-Azam University, Islamabad].
- Merxmüller H. (1975): Diploide Hieracien. – Anales Inst. Bot. Cavanilles 32: 189–196.
- Mráz P. (2001): Chromosome numbers in selected species of Hieracium sect. Alpina (Asteraceae) from Central and Eastern Europe. – Folia Geobotanica 36: 321–332.

- Mráz P. (2003): Mentor effects in the genus *Hieracium* s. str. (Compositae, Lactuceae). – *Folia Geobot.* 38: 345–350.
- Mráz P. & Tomčíková D. (2004): Experimental hybridization in the genus *Hieracium* s. str. – crosses between diploid *H. umbellatum* and triploid *H. sabaudum*. – *Thaiszia - J. Bot.* 14 Suppl. 1: 15–16.
- Mráz P, Kovalčíková K, Marhold K. (2002): Pollen shapes and size in *Hieracium* and related genera. – In: Gutterman W. [ed.] *Abstrakty příspěvků (přednášky a posterů) Šestáho Hieracium Workshopu, Hirschegg/Kleinwalsertal (Rakousko), Institut für Botanik der Universität Wien, Wien, 27.*
- Mráz P., Chrtek J., Fehrer J. & Plačková I. (2005): Rare recent natural hybridization in *Hieracium* s. str. – evidence from morphology, allozymes and chloroplast DNA. – *Pl. Syst. Evol.* 255: 177–192.
- Mráz P. & Paule J. (2006): Experimental hybridization in the genus *Hieracium* s. str.: crosses between diploid taxa. – *Preslia* 78: 1–26.
- Mráz P., Chrtek J. & Šingliarová B. (2009): Geographical parthenogenesis, genome size variation and pollen production in the arctic-alpine species *Hieracium alpinum*. – *Bot. Helv.* 119: 41–51.
- Nazarova E. A. (1984): Chromosome numbers in the Caucasian representatives of the families Asteraceae, Brassicaceae, Fabaceae, Limoniaceae. – *Bot. Žurn.* 69/7: 972–975.
- Nägeli C. & Peter A. (1885): *Die Hieracien Mittel-Europas. Monographische Bearbeitung der Piloselloiden mit besonderer Berücksichtigung der mitteleuropäischen Sippen.* – R. Oldenbourg, München.
- Nägeli C. & Peter A. (1886–1889): *Die Hieracien Mittel-Europas. II. Band. Monographische Bearbeitung der Archieracien mit besonderer Berücksichtigung der mitteleuropäischen Sippen. Hefte I–III.* – R. Oldenbourg, München.
- Nogler G. A. (1984): Gametophytic apomixis. – In: Johri B. M. [ed.]: *Embryology of angiosperms.* Springer, Berlin.
- Noyes R. D. & Soltis D. E. (1996): Genotypic variation in agamospermous *Erigeron compositus* (Asteraceae). – *American Journal of Botany* 83 (10): 1292–1303.

- Nygren A. (1967). Apomixis in the angiosperms. – In: W. Ruhland [ed.] *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. Springer-Verlag, Berlin.
- Orel V. (2003): *Gregor Mendel a počátky genetiky*. – Academia, Praha.
- Parfitt D. E. & Ganeshan S. (1989): Comparison of procedures for estimating viability of *Prunus* pollen. – *HortScience* 24: 354–356.
- Paule J. (2004): *Experimentálně Kríženie v rode Hieracium*. – Ms. [dipl. pr., depon. in: PrF, Šafarikova Univerzita, Košice].
- Pichot Ch., Fady B. & Hochu I. (2000): Lack of mother tree alleles in zymograms of *Cupressus dupreziana* A. Camus embryos. – *Annals of Forest Science* 57: 17–22.
- Plocek A. (1995): *Alchemilla* L. – In: Slavík B., Smejkal M., Dvořáková M. a Grulich V. [eds]: *Květena České republiky* 4. – Academia, Praha.
- Pulkina S. V. & Tupitsyna N. N. (2000): Poliploidnye komplekxy v rode *Hieracium* (Asteraceae). – *Turczaninowia* 3: 79–81.
- Qureshi S. J., Khan M. A., Arshad M., Rashid A. & Ahmad M. (2009): Pollen fertility (viability) status in Asteraceae species of Pakistan. – *Trakia Journal of Sciences* 7: 12–16.
- Richards A. J. (1997): *Plant breeding systems*. 2. vydání. – Stanley Thornes, Cheltenham.
- Richards A. J. (2003): Apomixis in flowering plants: an overview. – *Philos. Trans. Roy. Soc. B* 358: 1085–1093.
- Rosenberg O. (1926): Über die Verdoppelung der Chromosomenzahl nach Bastardierung. – *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 44: 455–460.
- Rosenberg O. (1927): Die semiheterotypische Teilung und ihre Bedeutung für die Entstehung verdoppelter Chromosomenzahlen. – *Hereditas* 8: 305–338.
- Rostovtseva T. S. (1979): Chromosome numbers of some species of the family Asteraceae Dumort. – *Bot. Žurn.* 64/4: 582–589.
- Rotreklová O. (2008): *Hieracium* subgen. *Pilosella*: pollen stainability in sexual,

- apomictic and sterile plants. – *Biologia* 63/1: 61—66.
- Rotreklová O., Krahulcová A., Vaňková D., Peckert T. & Mráz P. (2002): Chromosome numbers and breeding systems in some species of *Hieracium* subgen. *Pilosella* from Central Europe. – *Preslia* 74: 27–44.
- Sell P. D. & West C. (1976): *Hieracium* L. – In: Tutin T. G., Heywood D. A., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. [eds]: *Flora Europaea*, Vol. 4. – Athenaeum Press, Newcastle upon Tyne.
- Sell P. D. & Murrell G. (2006): *Flora of Great Britain and Ireland*. Vol. 4. – Cambridge University Press, Cambridge.
- Schou J. Ch. (2001): *Danmarks Høgeurter, Pilosella Hill og Hieracium L.* – Aarhus University Press, Aarhus.
- Schranz M. E., Dobeš Ch., Koch M. A. & Mitchell–Olds T. (2005): Sexual reproduction, hybridization, apomixis, and polyploidization in the genus *Boechera* (Brassicaceae). – *Am. Journ. of Bot.* 92/11: 1797–1810.
- Schuhwerk F. (1996): Published chromosome counts in *Hieracium*. – Dostupné na <http://www.botanischestaatssammlung.de/projects/chrzlit.html>, přístup 15. 4. 2013.
- Skawińska R. (1962): Apomixis in *Hieracium alpinum* L. – *Acta Biol. Cracow., Ser. Bot.* 5: 89–96.
- Slade K. & Rich T. C. D. (2007): Pollen studies in British *Hieracium* sect. *Alpina* (Asteraceae). – *Watsonia* 26: 443–450.
- Sokolovskaja A. P. & Strelkova O. S. (1960): Geografičeskoje rasprostraněnie poliploidnych vidov rastěnij v Evraziatskoj Arktike. – *Bot. Žurn.* 45: 369–381.
- Sokolowska-Kulczycka A. (1959): Apomixis in *Leontopodium alpinum* Cass. – *Acta Biol. Crac., Ser. Bot.* 2: 51–65.
- Stace C. A., Gornall R. J. & Shi Y. (1995): Chromosome numbers in *Hieracium* L. Section *Alpina* (Fries) F. N. Williams. – *Watsonia* 20: 367–377.
- Stace C. A., Gornall R. J. & Shi Y. (1997): Cytological and molecular variation in apomictic *Hieracium* sect. *Alpina*. – *Opera Botanica* 132: 39–51.

- Stebbins G. L. (1932): Cytology of *Antennaria*. II. Parthenogenetic species. – *Bot. Gaz.* 94: 322–345.
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P. & Krahulec F. (2006): Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. – *Taxon* 55: 447–450.
- Szeląg Z., Ilnicki T., Niketić M. & Tomović G. (2007): Diploid chromosome numbers in five *Hieracium* species from Serbia and Montenegro. – *Acta Biol. Crac., Ser. Bot.* 49/1: 119–121.
- Tennant D. J. & Rich T. C. G. (2008): British alpine hawkweeds. A monograph of British *Hieracium* section *Alpina*. – Botanical Society of the British Isles, London.
- Thomas S., Bailey J. P. & Rich T. C. G. (2011): Pollen and chromosome studies in *Hieracium* sect. *Alpestris* (Asteraceae). – *Nordic Journal of Botany* 29: 244–248.
- Trávníček B., Kirschner J., Štěpánek J. & Vašut R. J. (2011): *Taraxacum* L. – In: Štěpánková J., Chrtek J. & Kaplan Z. [eds]: *Květena České republiky 7*. – Academia, Praha.
- Tyler T. & Jönsson J. (2009): Ploidy level analysis of apomictic *Hieracium* (Asteraceae) reveal unexpected patterns and variation. – *Nordic Journal of Botany* 27: 490–502.
- Uhríková A. (1974): [chromozomové počty *Hieracium* prenanthoides]. – In: Májovský J. et al.: Index of chromosome numbers of Slovakian flora (part 3). *Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comenianae Bot.*, 22: 1–20.
- Üksip A. J. (1960): *Yastrebinika*. – In: Shishkin B. K., Bobrov E. G. [eds]: *Flora SSSR* 30. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moskva, Leningrad.
- Větvička V. (1995): *Rosa* L. – In: Slavík B., Smejkal M., Dvořáková M. a Grulich V. [eds]: *Květena České republiky 4*. – Academia, Praha.
- Winkler H. (1908): Über Parthenogenesis und Apogamie im Pflanzenreich. – In: Lotsy J. P. [ed.]: *Progressus Rei Botanicae* 2. Verlag von Gustaf Fischer, Jena.
- Zahn K. H. (1921–1923): *Hieracium*. – In: Engler A. [ed.]: *Das Pflanzenreich*. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Zahn K. H. (1922–1938): *Hieracium*. – In: Graebner P. [ed.]: *Synopsis der*

mitteleuropäischen Flora XII/1–3. Gebrüder Borntraeger, Leipzig.

Záveský L., Jarolímová V. & Štěpánek J. (2007): Apomixis in *Taraxacum paludosum* (section *Palustria*, Asteraceae): Recombinations of apomixis elements in inter-sectional crosses. – *Pl. Syst. Evol.* 265: 147–163.

Zlatník A. (1938): *Hieracia Alpina Sudetorum Occidentalium*. – *Stud. Bot. Čechosl.* 1: 37–51, 105–242.