

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



Reprodukční biologie polyploidů se zaměřením
na polyploidní komplex *Allium oleraceum*

Ludmila Hattanová

Bakalářská práce

předložená

na Katedře ekologie a ochrany životního prostředí

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků

na získání titulu Bc. v oboru

Ekologie a ochrana životního prostředí

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

Olomouc 2015

Hattanová, L.: Reprodukční biologie polyploidů se zaměřením na polyploidní komplex *Allium oleraceum*. Olomouc, 2015. Bakalářská práce. Katedra ekologie a ochrany životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.

Hattanová, L.: *Reproductive biology of polyploids with an emphasis on the polyploid complex Allium oleraceum*. Olomouc, 2015. Bc.Thesis. Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University of Olomouc.

Abstrakt:

Předložená práce se zabývá studiem reprodukční biologie polyploidního komplexu česneku planého (*Allium oleraceum*) L. U druhu *A. oleraceum* je doposud zjištěno šest cytotypů ($2n = 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x$). Tento modelový organismus byl dále zkoumán z hlediska reprodukce v počtu celkem 33 populací. Tyto populace jsou zapěstovány na pozemku Katedry botaniky v podmínkách běžné zahrady a jsou pro výzkumné účely zařazeny do mezinárodní databáze jedinců rodu *Allium*. Z databáze byly vybrány populace *A. oleraceum* a následně bylo provedeno studium fertility pylu u jednotlivých cytotypů pomocí techniky fluorescenční mikroskopie. Fertilita pylu v průměru nepřesáhla 50 procent v rámci jednotlivých cytotypů. Nejvyšší fertilita pylu byla zaznamenána u hexaploidů, nejnižší fertilita byla zaznamenána u triploidů.

Klíčová slova: Amaryllidaceae, polyploidní úrovně, životnost pylu, apomixie

Abstract:

The following thesis is concerned with biology of reproductive polyploid komplex *Allium oleraceum* L. There are known four cytotypes within *A. oleraceum*. Nowadays are still detected four cytotypes. This model organism has also been studied in terms of reproduction in the number of 33 populations. These populations was cultivates in the conditions of common garden and in a greenhouse of land Department of Botany Palacký University. The populations are included in the international database of *genus Allium*. From the database were selected populations of *A. oleraceum* and subsequently fertility of microspores study was done for each polyploidy level. Microspores fertility

does not exceed 50 percent on average within individual polyploidy level. The highest fertility microspores were observed in hexaploids lowest fertility was observed in triploids.

Key words: Amaryllidaceae, polyploidy levels, pollen viability, apomixy

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Martina Duchoslava, Ph.D. a jen s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci dne:

.....

podpis

Obsah

<i>Seznam tabulek</i>	7
<i>Seznam obrázků</i>	8
<i>Poděkování</i>	9
1. Úvod	1
<i>1.1 Reprodukční systémy u rostlin</i>	<i>1</i>
1. Alogamie	1
2. Autogamie	4
3. Apomixie.....	4
2. Cíle práce	6
3. Výhody a nevýhody reprodukčních systémů u rostlin	7
4. Polyploidie a polyploidizace	9
5. Modelový organismus – česnek planý (<i>Allium oleraceum</i> L.)	11
6. Reprodukční biologie polyploidního komplexu <i>A. oleraceum</i>	13
7. Materiál a metody	14
<i>7.1. Stanovení životnosti mikrospor</i>	<i>15</i>
<i>7.2. Stanovení fertility mikrospor</i>	<i>15</i>
8. Výsledky	17
<i>8.1. Fertilita mikrospor</i>	<i>17</i>
<i>8.2. Životnost mikrospor</i>	<i>22</i>
9. Diskuse	23
10. Závěr	24
Literatura	25
Přílohy	29

Seznam tabulek

Tabulka 1: Lokality sběru a úroveň ploidie <i>A. oleraceum</i>	14
Tabulka 2. Fertilita mikrospor celkem 33 evropských populací v procentech (číslo populace: rok/číslo populace).....	29
Tabulka 3. Výstup z ANOVy, fertilita mikrospor vs. ploidie.....	34
Tabulka 4. Výstup z GLM, velikost mikrospor vs. ploidie	34

Seznam obrázků

Obrázek 1. Fertilita mikrospor populací <i>A. oleraceum</i> v procentech – box plot.....	17
Obrázek 2: Histogram - četnost velikosti mikrospor u triploidů	18
Obrázek 3: Histogram - četnost velikosti mikrospor u tetraploidů	19
Obrázek 4: Histogram - četnost velikosti mikrospor u pentaploidů	20
Obrázek 5: Histogram - četnost velikosti mikrospor u hexaploidů	21
Obrázek 6: Fotografie mikrospor <i>A. oleraceum</i> při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/87B, tetraploid	31
Obrázek 7: Fotografie mikrospor <i>A. oleraceum</i> při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/87B, fluorescenční režim, tetraploid	31
Obrázek 8: Fotografie mikrospor <i>A. oleraceum</i> při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/88, tetraploid	32
Obrázek 9: Fotografie mikrospor <i>A. oleraceum</i> při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/2C, pentaploid.....	33
Obrázek 10: Fotografie mikrospor <i>A. oleraceum</i> při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/14C, pentaploid.....	33
Obrázek 11: Grafický výstup z GLM, velikost vs. ploidie	34

Poděkování

Tímto bych chtěla ráda poděkovat vedoucímu mého projektu RNDr. Martinu Duchoslavovi, Ph.D. za odborné vedení, podporu, pomoc a ochotu při řešení problému. Za pomoc v laboratoři při měření na cytometru děkuji Mgr. Michaele Jandové. Také děkuji RNDr. Boženě Navrátilové, Ph.D. a Mgr. Pavle Šikové za zasvěcení do metody fluorescenční mikroskopie na oddělení biosystematiky a ekologie rostlin. Dále děkuji doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za zaškolení a pomoc u fluorescenčního mikroskopu na oddělení fytopatologie a mikrobiologie. Mgr. Romanu Kalousovi mnohokrát děkuji za vzájemnou pomoc, ochotu a přípravu zeminy při terénních pracích i ve skleníku. Nikole Vackové tímto děkuji za pomoc při sběru populací *A. oleraceum*. Na závěr mnohokrát děkuji svým rodičům za jejich obětavost, péči a finanční podporu, kterou mi věnovali po celé studium.

V Olomouci dne:

1. Úvod

1.1 Reprodukční systémy u rostlin

U krytosemenných rostlin jsou známy tři základní způsoby rozmnožování neboli reprodukční systémy – alogamie (cizosprašnost), autogamie (samosprašnost) a apomixie.

1. Alogamie

Mnoho druhů kvetoucích rostlin využívá tento reprodukční systém. Alogamie zajišťuje u kvetoucích rostlin minimalizaci nebo úplné znemožnění samoopylení. Zabraňuje tak škodlivým dopadům příbuzenského křížení a podporuje vznik heterozygotů, genetickou variabilitu, výměnu genetické informace. Tyto uvedené důsledky jsou výhodné pro dlouhodobé přežití a adaptaci druhu a k jeho zachování (Briggs & Walters 2001).

Rostliny si vyvinuly jednotlivé mechanismy, jak podpořit alogamii. Například produkce tyčinek nebo pestíků na téže rostlině (jednodomost) nebo přítomnost pouze samčích nebo jen samičích květů na jedné rostlině (dvoudomost). (Dellaporta & Calderon – Urrea, 1993). Podíl dvoudomých druhů je v jednotlivých flórách odlišný. Pouze tři procenta krytosemenných rostlin jsou dvoudomá ve Velké Británii, zatímco ve flóře Havaje se uvádí mnohem vyšší podíl dvoudomosti (28%) a v rámci flóry Nového Zélandu také (13%). V tropických lesích se nachází opět vysoký podíl dvoudomých rostlin. Například 23% dvoudomých rostlin bylo zaznamenáno ve vzorku dřevin z nížinného deštného lesa v Kostarice (Briggs & Walters 2001).

Většina rostlin je oboupohlavná (Briggs & Walters 2001). Charakteristický květ krytosemenné rostliny se skládá ze souboru tyčinek s pylem, které jsou obklopeny plodolisty obsahující jedno nebo několik vajíček. Prostorová blízkost tyčinek a plodolistů je příhodná pro samoopylení (autogamie). Darwin studoval v roce 1866 dědičnost lnice květele (*Linaria vulgaris*). Z jednoho záhonu samosprášených semenáčků vyrostly rostliny nižší a celkově menšího vzrůstu. Druhý záhon rostlin byl založen jen z cizosprášených semenáčků. Tyto semenáčky byly v době úplného vzrůstu mohutnější a vyšší než semenáčky samosprášené. To vzbudilo Darwinův zájem a v následujících letech studoval vlivy alogamie a autogamie u dalších druhů jako kukuřice setá (*Zea mays*), kejklírka žlutá (*Mimulus luteus*). V průběhu svých experimentů zjistil, že samosprášení v některých případech vede ke sterilitě a nelze tak získat potomstvo. Tzv. autosterilita u rostlin má více příčin. U většiny rostlin existuje autoinkompatibilita (nesnášenlivost vlastního pylu), kdy po opylení vlastním pylem plodná hermafroditní rostlina nevytvoří zygoty. Brání tomu prezygotické mechanismy pylových buněk a pletiva blizny nebo čnělky (Briggs & Walters 2001).

Proti autogamii mají rostliny vyvinutou adaptaci, kdy v různé době dozrávají tyčinky a blizny ve stejném květu. Existují důkazy, že přítomnost geneticky podmíněných prezygotických mechanismy (autoinkompatibilita) může mít vliv na rychlost diversifikace (Ferrer & Good 2012).

Systém gametofytické inkompatibility existuje u většiny inkompatibilních druhů, ale ne u všech (Sims 1993). Jedná se o tyto fáze:

1. Každá rostlina je pro gen S heterozygotní. Například S_1S_2 , přičemž blizna a čnělka jsou samičí pletiva a je v nich obsažen diploidní počet chromosomů. Čnělka i blizna rostliny tak nese alely S_1S_2 , a má genotyp S_1S_2 .

2. Tvorbě pylu předchází meióza. Pylová zrna s haploidními jádry tak získají

vždy jen jednu ze dvou možných alel genu S. Pyl se při opylení chová podle toho, kterou z S-alel obsahuje.

3. Pylová zrna se dostanou na bliznu, která bývá zvlhčená sekrecí exudátů.

4. Pylové zrno vstřebá vodu, bobtná a vyklíčí z něj pylová láčka, jenž intracelulárně proniká specializovanou částí pletiva.

5. Pokud buňky pestíku obsahují stejnou S-alelu jako pylové zrno, zpomaluje se tak postupně prorůstání pylové láčky čnělkou. Vrcholek této inkompatibilní láčky roste abnormálně, až jej uzavře kalosová zátka. Jestliže se S-alely pylu a čnělky od sebe liší, pylová láčka roste normálně a může tak dojít k oplození (Briggs & Walters 2001). Výsledek tohoto genetického mechanismu nevede při samoopylení k získání potomstva. Přibližně 40% až 50% krytosemenných rostlin má geneticky podmíněn systém autoinkompatibility (Ferrer & Good 2012).

Američtí botanikové studující rody *Parthenium* a *Crepis* objevili v roce 1950 rozdílný typ inkompatibility tzv. sporofytickou inkompatibilitu (Gerstel, 1950). Odlišuje se od gametofytické inkompatibility tím, že pyl se během meiózy chová (bez ohledu na rozdělení alel v segregáčním poměru 1:1), jako by měl celý genotyp rostliny. Pokud otcovská rostlina, na níž vznikl pyl, nese tytéž S-alely jako blizna a čnělka, pyl není přijat (Briggs & Walters 2001).

Dalším rozdílem mezi oběma reprodukční systémy jsou jevy homomorfie, kdy přítomnost různých S-alel nedoprovází žádný morfologický rozdíl. Opakem je jev heteromorfie vyskytující se u sporofytických (využívající systém sporofytické inkompatibility) rostlin. Příkladem silně sporofytické autoinkompatibilní rostliny z čeledi Asteraceae je *Rutidosia leiolepis* (Young et al., 2001). Heteromorfie byla zaznamenána již Darwinem ve formě heterostylie (různočnělečnost) u prvosenky jarní (*Primula veris*) (Nowak et al., 2015).

Darwin pozoroval u *P. veris* dvě květní formy lišící se právě v délce čnělek (distylní, konkrétně krátkočnělečná a dlouhočnělečná). Tato morfologie zajišťuje snazší opylení květu hmyzem, kdy je při návštěvě dalších rostlin pyl umístěn jen na blizny. Heterostylie je tedy účinný způsob, jak zabránit samosprašení podpořením nepříbuzenského křížení (Nowak et al., 2015). Doposud je známo, že jev heterostylie se opakovaně vyvinul u 28 různých tříd krytosemenných rostlin (Barrett 1992).

2. Autogamie

Druhým reprodukčním systémem u rostlin je samosprašnost (autogamie). Úplná forma autogamie se nazývá kleistogamie, kdy k samoopylení dochází při zavřených květech. Nepřímými důkazy autogamie jsou například uniformita potomstva a autokompatibilita (předpoklad důsledku trvajících inbreedingu). Přímým důkazem autogamie jsou genetické markery (Briggs & Walters 2001). Autogamie je známa například u brukve řepky olejky (*Brassica napus*).

3. Apomixie

Třetím způsobem reprodukce rostlin je apomixie, při které se neuskuteční oplození buď částečně, nebo úplně. Je považována za nejmladší způsob rozmnožování rostlin odvozený od pohlavního rozmnožování. Jedná se o rozmnožování pomocí semen, jenž vznikají bez syngamie a nedochází tak ke vzniku zygoty. Rozlišují se dva typy: vegetativní apomixie (a) a agamospermie (b).

(a) Někteří autoři (Asker & Jerling 1992) považují vegetativní apomixii pouze za formu vegetativní rozmnožování a nikoliv za typ apomixie. Některé rostliny se rozmnožují pouze vegetativně, protože jim chybí schopnost sexuální reprodukce. Příkladem je vodní mor kanadský (*Elodea canadensis*). *Elodea canadensis* je dvoudomá vodní rostlina, byla v devatenáctém století introdukována do Evropy, a to pouze samičí

rostliny, které byly schopny se hojně rozšiřovat bez přítomnosti samčích rostlin. Jiné druhy, například lomikámen nicí (*Saxifraga cernua*) tvoří specializované orgány – pacibulky (propagule), jež jsou snadno odlučitelné. Pokud pacibulky vypučí a nedojde k somatickým mutacím, jedinec má totožný genotyp jako rodičovský jedinec (Briggs & Walters 2001).

(b) Druhým typem apomixie je agamospermie, při které se vytváří normální semena, které se vyvinou bez splynutí gamet. Potomstvo má opět tentýž genotyp jako rodičovská rostlina. Agamospermie byla poprvé popsána v roce 1841 J. Smithem u australské rostliny *Alchornea ilicifolia*. Apomixie je velmi častá u vyšších rostlin – kaprad'orostů i krytosemenných rostlin, například mnohé rody v čeledích *Rosaceae* a *Asteraceae* v rámci flóry mírného pásu. Doposud nejsou známy žádné nahosemenné apomiktické rostliny (Briggs & Walters 2001). U planě rostoucích rostlin se uplatňují kombinace jednotlivých reprodukčních systémů: alogamie kombinovaná s vegetativní reprodukcí (*Trifolium repens*, *Lysimanchia nummularia*); alogamie kombinovaná s viviparií (*Agrostis*, *Allium*, *Festuca*, *Poa*, *Saxifraga*); alogamie kombinovaná s příležitostnou autogamií (*Primula veris*); alogamie kombinovaná s pravidelnou alogamií (*Viola*), a další. (Briggs & Walters 2001).

2. Cíle práce

Cílem práce je provést literární rešerši na uvedené téma, realizovat studium fertility pylu u cytotypů *A.oleraceum* a zároveň navrhnout podobu experimentu testujícího mezicytotypovou reprodukční interakci u *A. oleraceum*, experiment založit a referovat o prvních dosažených výsledcích.

Cílem teoretického úvodu do tématu je předložit přehled o doposud zjištěných možných reprodukčních možnostech rostlin, poté i zkoumaného druhu *A. oleraceum*. Jedná se především o přípravu na diplomovou práci, jež bude navazovat na výsledky tohoto projektu.

3. Výhody a nevýhody reprodukčních systémů u rostlin

Aby bylo možno porovnat navzájem již zmíněné reprodukční systémy u rostlin, je třeba stručně uvést podstatu normálního způsobu pohlavního rozmnožování u krytosemenných rostlin. Proces je charakteristický vznikem buněk s haploidní sadou chromozomů, mikrospory a megaspor, meiotickým dělením. Následným mitotickým dělením se tyto haploidní sady replikují, proto jsou všechny samčí i samičí gamety haploidní. Po splynutí samčí a samičí gamety vzniká gameta s diploidní sadou chromozomů. Poté následuje mitotické dělení zygoty, vznik embrionálního sporofytu a později po vyklíčení semene vyrůstá dospělá diploidní rostlina (Briggs & Walters 2001). Všechny výše zmíněné reprodukční systémy mají své výhody a nevýhody z hlediska fitness.

Alogamie je ve srovnání s autogamií a apomixií výhodnější z hlediska genetické variability potomstva a umožňuje adaptaci na změny v prostředí (Briggs & Walters 2001). Zároveň však může dojít ke ztrátě výhodných genotypů adaptovaných na určitý typ prostředí a náhodné faktory prostředí ohrožují reprodukci, například výskyt opylovačů (Briggs & Walters 2001). Při alogamii je tak rostlinou vyplýváno na reprodukci mnohem více biomasy v podobě květů. Naproti tomu autogamie má výhodu v tom, že nedochází ke ztrátě adaptovaných genů (Briggs & Walters 2001).

Rostlina využívající reprodukční systém autogamie může tvořit gamety i v extrémních biotopech, přičemž není třeba do reprodukce vkládat mnoho energie, dostačuje jedna rostlina (u alogamie musí být dvě rostliny s různými alelami). (Briggs & Walters 2001). Nicméně existuje letální zatížení inbreedingu. Nevýhodou je také skutečnost, že podíl heterozygotních jedinců s dalšími generacemi klesá a tyto generace postupně nabývají shodného vzhledu (Briggs & Walters 2001).

Výhodou třetího typu rozmnožování, apomixie, je reprodukce početného množství rostlin genotypově totožných s rodičovskou rostlinou dobře adaptovaných na určitý typ prostředí, aniž by docházelo k větším genetickým ztrátám (Briggs & Walters 2001).

Apomixie dovoluje reprodukci rostlin (tvorbu semen) s lichými počty chromozomů (Briggs & Walters 2001). Zároveň zde není žádné riziko spojené s opylením a reprodukce není v ohrožení náhodnými faktory prostředí (Briggs & Walters 2001). Tento způsob reprodukce je zárukou udržení velkého podílu heterozygotnosti (Asker & Jerling 1992). Nevýhodou apomixie je, že může být limitována stárnutím rostliny a chorobami, například u rodu *Citrus* opakované vegetativní rozmnožování vede ke stárnutí (Frost 1938, cit. podle Briggs & Walters 2001).

4. Polyploidie a polyploidizace

Pojem „polyploid“ poprvé použil Strasburger E. (1908) pro označení rostliny s větším než diploidním počtem chromosomových sad. Krátce zmíním živočišnou říši, kde je polyploidní stav jedince méně častý a mnohdy neslučitelný se životem jedince. U rostlin je polyploidie velmi běžným jevem. Odhaduje se, že 47 až 70% kvetoucích rostlin jsou potomky polyploidních předků (Ramsey & Schemske 2002). Winkler (1906, cit podle Briggs & Walters 2001) publikoval významný a důležitý článek, kde popsal experimentální vznik polyploidie u druhu lilek rajče (*Solanum Lycopersicum*). Polyploidie je vysoce dynamickým procesem, jenž sehrává nemalou roli ve speciaci a evoluci nahosemenných rostlin a význam má též v evoluci dalších eukaryot (Thompson & Lumaret 1992, Soltis *et al.*, 2003). Je nedílnou součástí evoluční dynamiky rostlinných populací. Tato problematika se nevztahuje pouze k evoluční dynamice, ale je důležitá k pochopení procesů v rámci zachování biodiverzity (Thompson & Lumaret 1992). Briggs & Walters (2001) uvádějí, že vznik polyploidie a další chromozomové transformace je spojena se saltační (skokovou) speciací. Polyploidní stav může jedinec získat třemi způsoby: (i) autopolyploidie, tj. vznik polyploida prostým zdvojením chromozómové sady jedince vyvolenému například tepelným šokem a následným narušením průběhu mitózy. (ii) allopolyploidie nastává po předchozí hybridizaci mezi jedinci různých (ale blízké příbuzných) druhů, kdy na často sterilní hybridní rostlině procesem autopolyploidie může vyrůst polyploidní větev (Briggs & Walters 2001). V přírodě u planých druhů je mnohem častější než autopolyploidie (Soltis *et al.*, 2014), avšak u autopolyploidie se jedná často o skryté formy, protože je těžké bez analýzy chromozomů poznat, zda se jedná o autopolyploida (Duchoslav, ústní sdělení). (iii) somatická polyploidizace (Briggs & Walters 2001). Pokud se somatické buňky nějakým způsobem dostanou do rozmnožovacích orgánů

rostliny, může polyploidie postoupit do další generace (Briggs & Walters 2001). Polyploidii je možné experimentálně vyvolat působením kolchicinu (inhibitor dělicího vřeténka), jenž působí jako zábrana při normálním rozestupování chromozomů (Briggs & Walters 2001). Změna ploidie se u rostlin obecně projevuje například „gigas efektem“, kdy zdvojení počtu chromozomů má vliv na velikost buněk a přispívá tak ke zvětšení celkového vzrůstu rostliny (Levin 1983).

5. Modelový organismus – česnek planý (*Allium oleraceum* L.)

Podle nových molekulárních výzkumů je *A. oleraceum* řazen do rodu *Allium*, sekce *Codonoprasum*. Rod v sobě zahrnuje přibližně 750 druhů (Stearn 1992). Do rodu *Allium* náleží hospodářsky významné plodiny, jako je například pór zahradní (*Allium porrum*) nebo česnek setý (*Allium sativum*) a další.

A. oleraceum je geofyt s jednoletým zásobním orgánem, téměř kulovitou cibulí o velikosti 10 až 15 mm. Toulec, tvořen dvěma rozdílně dlouhými listeny, obaluje květenství. Polokulovitý až kulovitý lichookolíček může obsahovat 0 až 20 oboupohlavných květů. Zde se tvoří přibližně 10 – 60 pacibulek (Štěpánková et al. 2010). Okvětí má zvonkovitý tvar se špinavě bělavými okvětními lístky o délce 5,5-7 mm a šířce cca 2,2-3 mm s obsahem barevného - růžového či červeného i zeleného odstínu s viditelně výraznou tmavou střední žilkou. Tyčinky jsou kratší nebo stejně dlouhé jako je okvětí. Pestík z květu vystupuje. Květní stopky jsou ohnuté dolů a mají různou délku, která se pohybuje v rozmezí od 15-60 mm. Rostlina je zpravidla 25-100 cm vysoká. V lichookolíčku se nacházejí pacibulky, tvoří se nepravidelně, jsou elipsoidního tvaru až 1 cm dlouhé. Tyto pacibulky mohou posléze sloužit jako kompenzační mechanismus v případě, že rostlina nevykvetě a znemožní se tak její rozmnožení pohlavní cestou (Štěpánková et al. 2010). *A. oleraceum* roste na velmi širokém spektru stanovišť roztroušeně po našem území (Štěpánková et al. 2010).

U tohoto druhu bylo zjištěno šest různých ploidních stupňů (cytotypů). Základní chromozomové číslo druhu je $n = 8$. Na našem území byly zaznamenány pouze tři cytotypy. Jsou to tetraploidní, pentaploidní a hexaploidní jedinci, kde $2n = 32, 40, 48$ (Duchoslav et al 2010). Mimo Českou republiku se vyskytuje triploidní cytotyp ($2n = 24$) a je doložen se v Maďarsku (Krahulcová 2003) a v Rusku (Vachtina 1984). Nejčastější je pentaploidní cytotyp, následně hexaploidní a s nejméně frekventovaný je

tetraploidní cytotyp. Dosud byly nově nalezeny další ploidní stupně u *A. oleraceum*, heptaploidní a oktoploidní, kde $2n = 56, 64$ (Duchoslav et al. 2013). V rámci polyploidního komplexu nebyl zaznamenán u *A. oleraceum* diploidní cytotyp (Duchoslav et al. 2010). Bylo zjištěno, že jednotlivé ploidní stupně (u *A. oleraceum*) mohou mít souvislost s rozdílnými ekologickými nároky. Konkrétně tetraploidi jsou vázáni na skalní stepi nebo na suché trávníky v teplejších oblastech. Pentaploidi byli zjištěni hlavně v teplejších oblastech s nižší nadmořskou výškou s širokým spektrem biotopů. Hexaploidi se většinou vyskytují na okrajích polí a cest a také ve vyšších nadmořských výškách. (Duchoslav et al. 2010).

6. Reprodukční biologie polyploidního komplexu *A. oleraceum*

V úvodu bylo zmíněno, že rod *Allium* využívá k reprodukci alogamii spolu s viviparií. *A. oleraceum* má taktéž kombinovaný způsob reprodukce. Rozmnožuje se jednak sexuálně, pomocí alogamie, tvorbou semen a vegetativně (asexuálně) tvorbou pacibulek a dceřiných cibulí. Fialová & Duchoslav (2014) uvádí, že jedinci různých cytotypů jsou rozdílné v počtu květů a množství sušiny. U tří cytotypů (4x, 5x a 6x) zjistili, že čím je vyšší ploidní stupeň, tím více klesá počet květů, množství sušiny a také klesá počet pacibulek. Jak bylo uvedeno, hexaploidní jedinci mívají zpravidla nižší počet květů a na rozdíl od ostatních cytotypů jsou patrně schopni samoopylení (Jírová 2007).

Levan (1937) označil tento druh za autopolyploidní. Při svých experimentech křížil diploidní jedince *Allium paniculatum* a získal tetraploidní rostliny morfologicky téměř totožné s *A. oleraceum*. Avšak diploidní jedinci jsou dnes klasifikováni jako dva samostatné druhy (*Allium podolicum* a *Allium paniculatum*). Z toho důvodu se původ *A. oleraceum* považuje za allopolyploidní (Vosa 1976, Duchoslav et al. 2010). Tento druh má tedy dosud nejasný hybridní původ s vysokou podobností s *A. paniculatum* (Duchoslav et al. 2010).

7. Materiál a metody

Vzorky *A. oleraceum* jsem získala z již zapěstovaných evropských a českých populací, viz Příloha 1. U všech studovaných populací byl již dříve zjištěn stupeň ploidie pomocí průtokové cytometrie. Zároveň proběhl sběr populací z České republiky, které jsou určeny pro opylovací pokusy, viz příloha. Z jednotlivých rostlin byly odebrány vzorky pacibulek a umístěny do fytotronů, kde probíhal výzkum týkající se pučení těchto pacibulek v rámci bakalářské práce mé kolegyně Nikoly Vackové. Jakmile pacibulky vypučily, umístila jsem je do květináčů dle jednotlivých populací. Do květináčů jsem umístila zeminu smíšenou s rašelinou (Florcom, profesionální substrát) v poměru 2:1. Tyto populace byly přeneseny do skleníku Katedry botaniky UP. Z těchto pacibulek byly napěstovány rostliny a jednotlivě rozsázeny do malých květináčů o rozměrech 8x8 cm opatřených štítkem čísla populace a zároveň bylo přidáno dlouhodobé zahradní hnojivo (SUBSTRAL Osmocote, EXTRA dlouhodobé hnojivo, ZAHRADA). Následoval přesun malých květináčů s napěstovanými rostlinami na pozemek do síťové konstrukce. V příloze je k dispozici přehled všech populací doplněn údaji o úrovni ploidie a počtu jedinců v populaci. Tyto populace z České republiky bohužel v letošním roce nevykvetly, a proto jsem stanovovala životnost a fertilitu mikrospor ze vzorků již napěstovaných evropských populací. Před vlastním uskutečněním experimentu testujícího mezicytotypovou reprodukční interakci u *A. oleraceum*, bylo třeba stanovit životnost (viabilitu) a fertilitu mikrospor.

Tabulka 1: Lokality sběru a úroveň ploidie *A. oleraceum*

Lokalita sběru	Stupeň ploidie
Lumírov	4x
Venušina sopka	4x
Džbánov	5x
Přibílov	5x
Polsko	6x
Rovensko	6x

7.1. Stanovení životnosti mikrospor

Pro studium životnosti jsem použila metodu klíčivosti pylu *in vitro* (Dafni 1992). Připravila jsem 100 ml zásobního roztoku z 20 mg H_3BO_3 , 60 mg $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 17 g sacharosy a destilované vody. Roztok jsem nalila do 10 „ependorfek“ a zamrazila. Z 5 ml zásobního roztoku jsem připravila agarovou plenu. Do 5 ml zásobního roztoku jsem přidala 50 mg agaru a směs rozvařila ve vodní lázni. Ještě horkou směs jsem nalila na podložní sklíčka tak, aby jej rovnoměrně pokryla vrstvou tenkou přibližně 1 mm. Po zchlazení tenkého filmu jsem naprášila na jeho povrch čerstvě otevřené prašníky. Inkubovala jsem je po dobu 24 hodin v uzavřených krabičkách na buničině s destilovanou vodou při pokojové teplotě.

Za 24 hodin jsem pod mikroskopem pozorovala a spočítala klíčící pylové láčky a celkový počet mikrospor v zorném poli. Provedla jsem minimálně tři opakování u každého preparátu. Vždy bylo spočítáno minimálně 500 pylových zrn.

7.2. Stanovení fertility mikrospor

Pro studium fertility mikrospor *A. oleraceum* jsem odebírala květy jedincům všech cytotypů z již existujících populací zapěstovaných v pokusné zahradě v areálu PřF UP v Holici. Čerstvě rozkvetlý květ musel být odebrán vždy v dopoledních hodinách, aby se zachovaly zralé prašníky. Mikrospory jsem naprášila do kapky fluoresceindiacetátu na podložním skle odmaštěném lihem a inkubovala po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Kapku jsem přikryla krycím sklíčkem a pozorovala pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus Bx60, Olympus Optical Co. Europa GmbH), při stonásobném zvětšení. V zorném poli jsem spočítala všechny mikrospory a počet všech mikrospor, které pod fluorescenčním filtrem svítily jasně zelenou barvou. Z těchto počtů jsem získala poměr vyjadřující fertilitu mikrospor v procentech. Následně jsem pomocí softwaru QuickPHOTO CAMERA změřila délku alespoň u 100 pylových zrn v každém

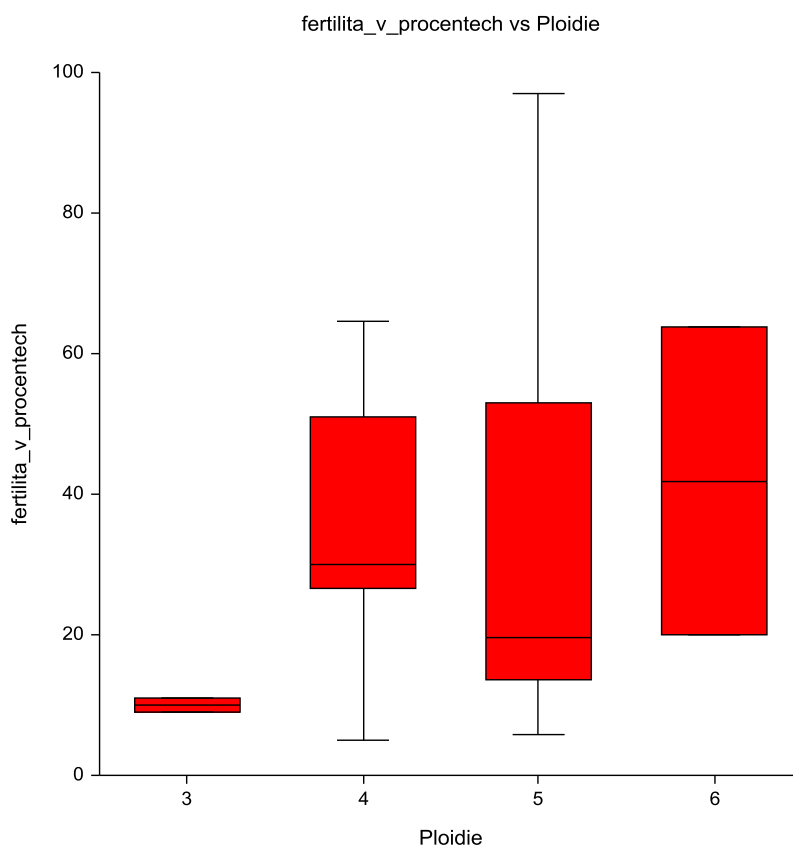
preparátu (viz Příloha). U každého preparátu jsem vyfotografovala pomocí kamery a softwaru snímek v normálním zobrazení. Jen u některých snímků bylo možné vyfotografovat svítící mikrospory v režimu fluorescence, viz příloha. Data byla zpracována v programu NCSS 9, pro vyhodnocení dat fertility mikrospor a ploidního stupně byla použita jednocestná ANOVA, pro data z měření délky mikrospor a ploidního stupně byl použit general linear model spolu s histogramy.

8. Výsledky

8.1. Fertilita mikrospor

Bylo zjištěno, že v průměru nejvyšší fertilitu vykazují hexaploidi, viz obr. 1 box plot.

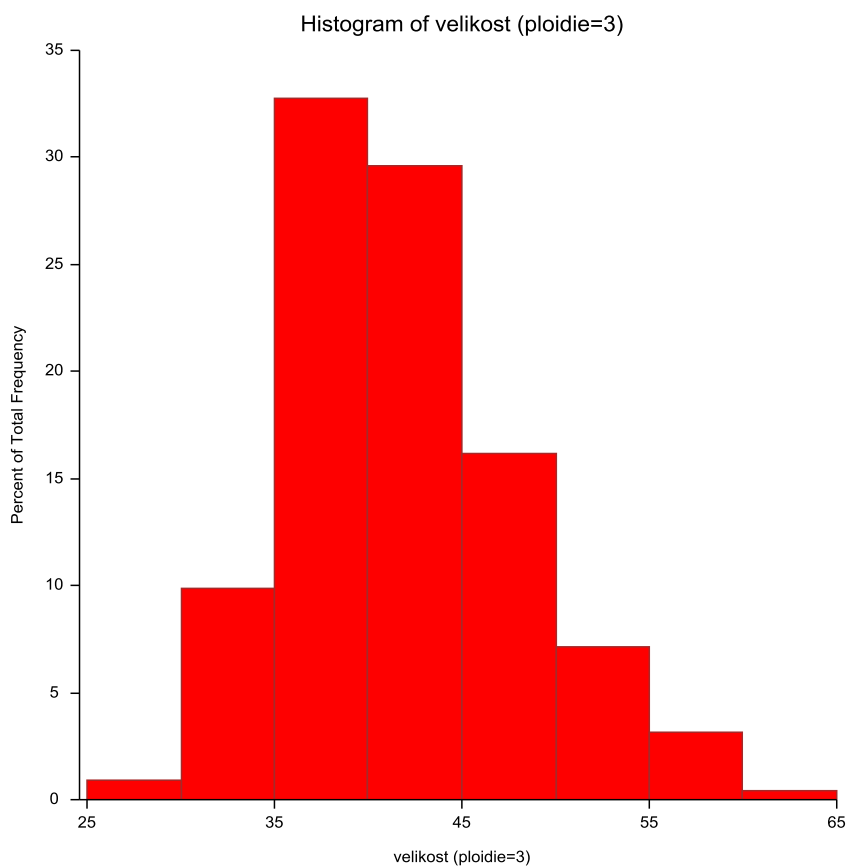
Celkově se fertilita mikrospor u jednotlivých ploidí liší. U triploidů byla zaznamenána nejnižší fertilita.



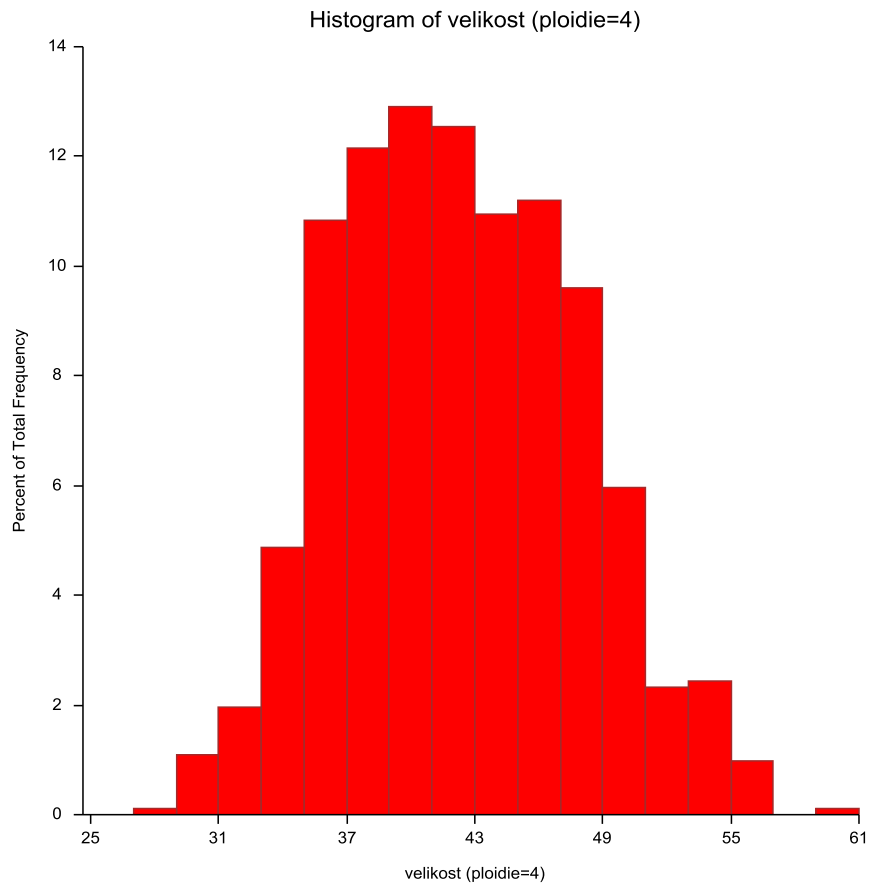
Obrázek 1. Fertilita mikrospor populací *A. oleraceum* v procentech – box plot

8.2. Velikost mikrospor

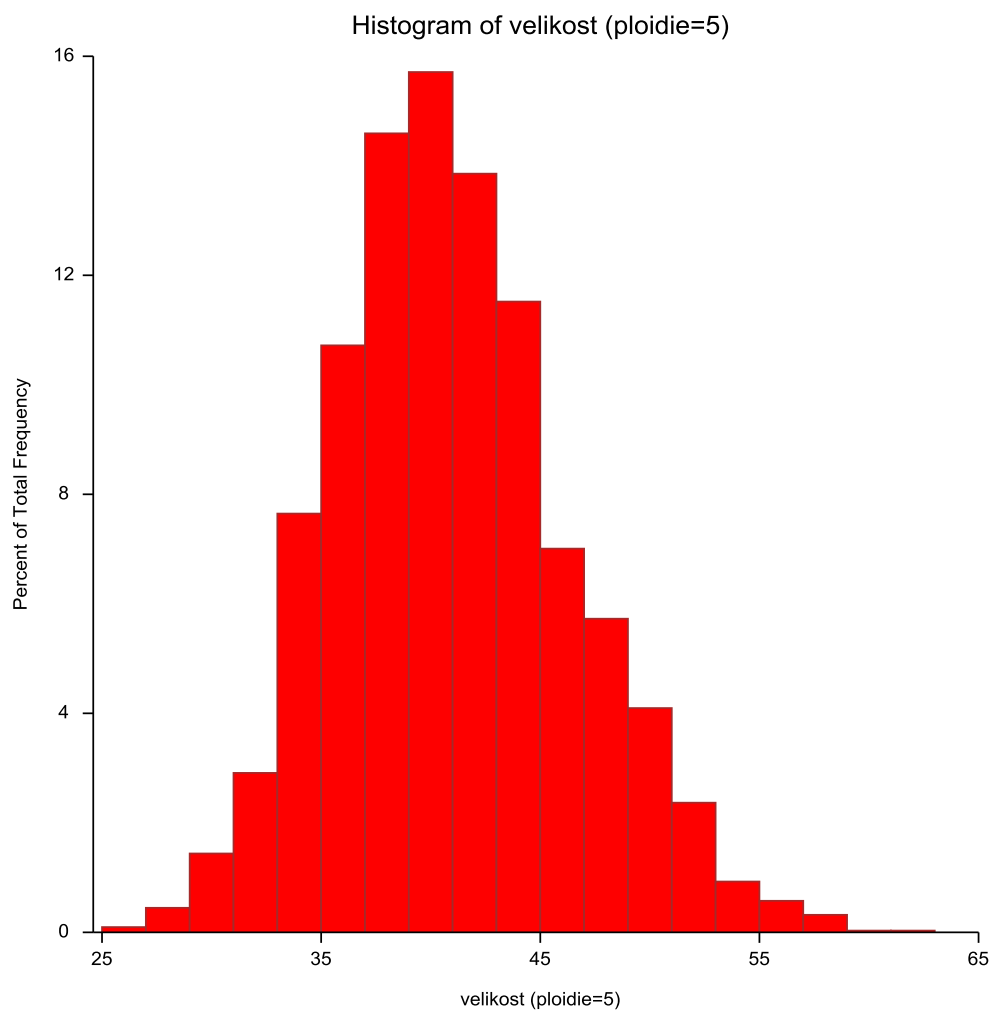
Nejvyšší délka velikost mikrospor v mikrometrech byla zjištěna u hexaploidů, viz obr. 5 a viz příloha.



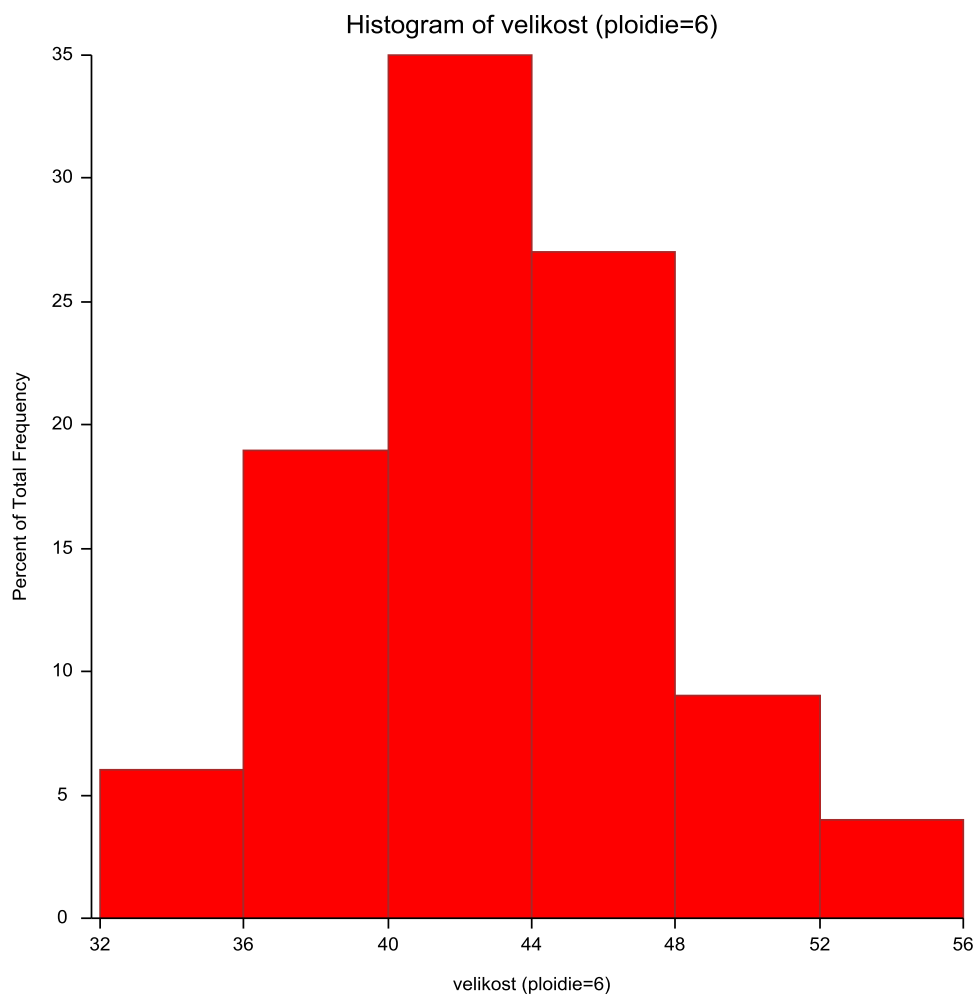
Obrázek 2: Histogram - četnost velikosti mikrospor u triploidů



Obrázek 3: Histogram - četnost velikosti mikrospor u tetraploidů



Obrázek 4: Histogram - četnost velikosti mikrospor u pentaploidů



Obrázek 5: Histogram - četnost velikosti mikrospor u hexaploidů

8.3. Viabilita mikrospor

Při určování životnosti mikrospor *in vitro* jsem narazila na problém, kdy na připraveném agaru mikrospory neklíčily, ačkoli mikrospory z totožných jedinců byly v ten samý den podrobeny určování fertility pod fluorescenčním mikroskopem (byly viditelně fertillní, a tím i živé). Proto tato metoda stanovení životnosti mikrospor byla upravena naředěním koncentrací roztoku od 10 – 90% s cílem nalezení vhodné koncentrace. To se však nepodařilo, mikrospory stále neklíčily. Zkoušela jsem také klíčit mikrospory ze zcela jiného druhu rostliny na tomto agaru, ale opět nevyklíčily, i když pod fluorescenčním mikroskopem zřetelně vykazovaly fertilitu. Proto nebyla metoda stanovení životnosti mikrospor *in vitro* zahrnuta do výsledků tohoto projektu.

9. Diskuse

U polyploidů obecně se naráží na problémy v rámci sexuální reprodukce u cytotypů s lichým stupněm ploidie. Jak výsledky ukazují, triploidi mají nejnižší hodnotu, co se týče fertility pylu. To může značit, že triploidi mají sníženou schopnost fertility pylu z podstaty již zmíněného problému s lichým stupněm ploidie.

Z výsledků je zřejmé, že by bylo vhodnější početně vyvážit zastoupení jednotlivých polyploidů. Méně časté ploidie jsou řidce zastoupeny, což může značně ovlivnit výsledky.

10. Závěr

V rámci 33 evropských populací jsem stanovila fertilitu mikrospor v procentech. Z primárních dat (viz Příloha) je patrné, že polyploidní stupně nejsou rovnoměrně zastoupeny, tudíž výsledky jsou touto skutečností ovlivněny. Je mi známo, že by bylo vhodné zajistit vyšší počet vzorků, tak aby byly rovnoměrně zastoupeny ploidní stupně jako takové, ale i z hlediska států, kde byly populace nalezeny.

Literatura

- Asker, Sven E, Jerling, Lenn.** 1992. *Apomixis in plants*. [Internet]. Boca Raton: CRC Press, 298 p. [cited 2015 December 3]; Dostupný z: https://books.google.cz/books?id=wbeW6_yVJbgC&lpg=PA76&ots=NYgEkiDPZvdq=recent%20advances%20in%20the%20embryogy
- Barrett Sch.** 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. *Monographs on Theoretical and Applied Genetics*. [Internet]. [cited 2014 September 9]; 15:1- 29. Dostupný z: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-86656-2_1
- Štěpánková J., Chrtek J. jun. & Kaplan Z. [eds].** 2010: Květena České republiky. Sv. 8. Praha: Academia. s. 706.
- Birchler, James A.** 2014. Interploidy hybridization barrier of endosperm as a dosage interaction. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. [cited 2014 September 9];vol.5, Dostupný z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00281/full>
- Briggs D., Walters S. M.** 2001. Proměnlivost a evoluce rostlin. 3. vyd., 1. čes. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. 531 s.
- Columbus, J., Travis, Mashayekhi, S.** 2014. Evolution of leaf blade anatomy in *Allium* (Amaryllidaceae) subgenus amerallium with a focus on the north American species. *Journal of Botany* [Internet]. [cited 2014 October 6]; Vol. 101.Issue 1. p. 63-85. Dostupný z: <http://www.amjbot.org/content/101/1/63.full.pdf+html>
- Dafni, A. a D.** 2000. Firmage. Pollen viability and longevity: Practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution* [Internet]. [cited 2014 September 22]; vol. 222, 1-4, p. 113-132 Dostupný z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00984098>
- Dafni, A.** 1992. *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford: IRL Press at Oxford University Press, xiv, 250 p. The practical approach series.
- Dellaporta, Stephen L., Calderon – Urrea, Alejandro** 1993. Sex Determination in Flowering Plants. *The Plant Cell* [Internet]. [cited 2015 June 23];Vol.5,p. 1241-1251. Dostupný z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC160357/pdf/051241.pdf>
- Duchoslav, M., L. Šafářová a M. Jandová.** 2013. Role of adaptive and non-adaptive mechanisms forming complex patterns of genome size variation in six cytotypes of polyploid *Allium oleraceum* (Amaryllidaceae) on a continental scale. *Annals of Botany* [Internet]. [cited 2015 January 6];vol.111,issue 3, p.419-431.

Dostupný z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579448/pdf/mcs297.pdf>

Duchoslav M., Šafářová L. & Krahulec F. 2010. Complex distribution patterns, ecology and coexistence of ploidy levels of *Allium oleraceum* (*Alliaceae*) in the Czech Republic. – *Annals of botany* 105 (5): 719-735.

Ferrer, M. M. a S. V. Good. 2012. Self-sterility in flowering plants: preventing self-fertilization increases family diversification rates. *Annals of Botany* [Internet]. [cited 2015 April 24];vol.110(3),p.535-553. Dostupný z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3400452/pdf/mcs124.pdf>

Fialová, M., M. Duchoslav a O. Loudet. 2014. Response to competition of bulbous geophyte *Allium oleraceum* differing in ploidy level. *Plant Biology* [Internet]. [cited 2014 September 26];vol.16, issue 1, p.186-196. Dostupný z: <http://doi.wiley.com/10.1111/plb.12042>

Fialová Martina, Michaela Jandová, Jiří Ohryzek, Martin Duchoslav. 2014. Biology of the polyploid geophyte *Allium oleraceum* (*Amaryllidaceae*): Variation in size, sexual and asexual reproduction and germination within and between tetra-, penta- and hexaploid cytotypes. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* [Internet]. [cited 2014 September 26];vol.209,issue 7,p.312-324. Dostupný z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367253014000449>

Flora Europaea. 1980. edited by T.G. Tutin [et]. Volume 5, Alismataceae to Orchidaceae (monocotyledones). Reprinted. Cambridge, England: Cambridge University Press, p. 49-70.

Gerstein A. C. & Otto S. P. 2009. Ploidy and the causes of genomic evolution. *Journal of heredity.* [Internet]. [cited 2014 September 20];100(5).p.571 – 581. Dostupný z: <http://jhered.oxfordjournals.org/content/100/5/571.full.pdf+html>

Gerstel, D. U. 1950. Self-inkompatibility studies in Guayule. II. Inheritance. *Genetics.* [Internet]. [cited 2014 September 20];35, 482-506. Dostupný z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1209496/pdf/482.pdf>

Group, The Angiosperm Phylogeny. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society.* [Internet]. [cited 2015 June 2];161(2):105-121. Dostupný z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x/epdf>

Igic, Boris, Russell Lande, Joshua R. Kohn. 2008. Loss of Self-Incompatibility and Its Evolutionary Consequences. *International Journal of Plant Sciences.* [Internet]. [cited 2015 June 2];169(1).p. 93-104. Dostupný z: http://www.jstor.org/stable/10.1086/523362?seq=1#page_scan_tab_contents

- Jandová, Michaela.** 2010 Cytogenetická studie generativního potomstva polyploidního komplexu *Allium oleraceum* [diplomová práce]. Univerzita Palackého v Olomouci. s. 91.
- Jírová, Alena.** 2007. Polyploidní komplex *Allium oleraceum* L. v Evropě [diplomová práce]. Univerzita Palackého v Olomouci. s. 89.
- Karpavičiene, Birutė.** 2012. Morphological, reproductive and karyological variability in *Allium oleraceum* in Lithuania. *Biologia* [Internet]. [cited 2015 January 15]; vol.67, issue 2, p.278-283. Dostupný z: <http://link.springer.com/article/10.2478/s11756-012-0003-3>
- Krahulcová A.** 2003. Chromosome numbers in selected monocotyledons (Czech Republic, Hungary, and Slovakia). *Preslia* 75: 97–113
- Krahulec F., Duchoslav M.** 2010. Alliaceae J. AGARDH – česnekovitě. In: Štěpánková J. (ed), Květena České republiky, Vol. 8, Academia, Praha.
- Knight, Charles A., Rachel B. Clancy, Lars Götzenberger, Leighton Dann, Jeremy M. Beaulieu.** 2010. On the Relationship between Pollen Size and Genome Size. *Journal of Botany* [Internet]. [cited 2014 September 29];vol. p. 1-7. Dostupný z: <http://www.hindawi.com/journals/jb/2010/612017/>
- Levan A.** 1933. Cytological studies in *Allium*, III. *Allium carinatum* and *Allium oleraceum*.– *Hereditas* 18: 101–114.
- Levan A.** 1937. Cytological studies in the *Allium paniculatum* group. *Hereditas* 23: 317–370.
- Levin D. A.** 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *American Naturalist*: 1-25.
- Nowak, Michael D, Giancarlo Russo, Ralph Schlapbach, Cuong Huu, Michael Lenhard, Elena Conti.** 2015. The draft genome of *Primula veris* yields insights into the molecular basis of heterostyly. *Genome Biology* [Internet]. [cited 2015 May 24];16(1). Dostupný z: <http://www.genomebiology.com/2015/16/1/12>
- Ramsey J, Schemske DW.** 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. [Internet]. [cited 2015 March 2];vol.33: 589-639. Dostupný z: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150437>
- Sims, Thomas L.** 1993. Genetic regulation of self-incompatibility. *Critical Reviews in Plant Sciences* [Internet]. [cited 2015 March 4];vol 12(1-2):p.129-167. Dostupný z: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/07352689309382359>

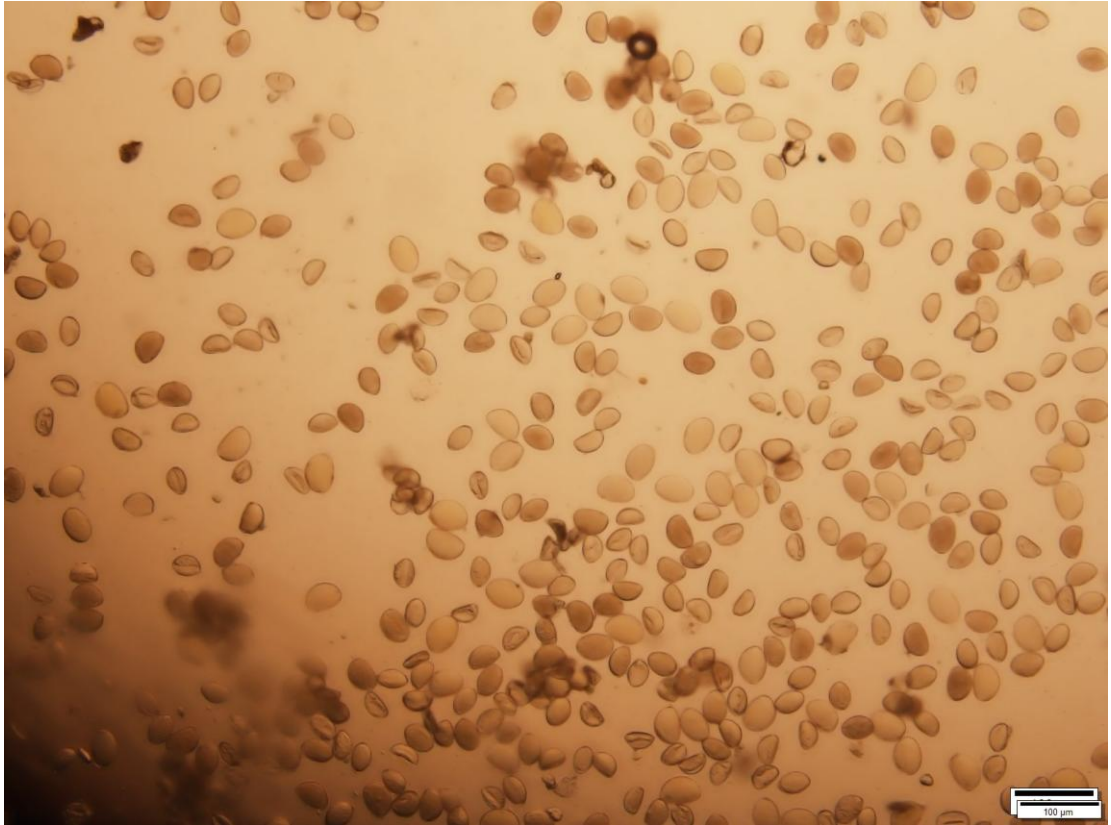
- Soltis D.E., Soltis P.S., Tate J.A.** 2003. Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist*. [Internet]. [cited 2015 January 15];vol.161: 173-191. Dostupný z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1469-8137.2003.00948.x/epdf>
- Soltis, D. E., Visiger, C. J., Soltis, P. S.** The polyploidy revolution then...and now: Stebbins revisited. *American Journal of Botany*.101(7): 1057-1078.
- Stearn W. T.** 1992. How many species of *Allium* are known? *Kew Magazine*. 9: 180–182. [Internet]. [cited 2014 September 29]; Dostupný z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-8748.1992.tb00096.x/pdf>
- Šafářová, Lenka.** 2011. Polyploidní komplex *Allium oleraceum* L. v Evropě. [disertační práce]. Univerzita Palackého v Olomouci. s. 117.
- Šafářová L., Duchoslav M., Jandová M. & Krahulec F.** 2011. *Allium oleraceum* in Slovakia: cytotype distribution and ecology. – *Preslia* 83 (4): 513-527.
- Thompson J, Lumaret R.** 1992. The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends in Ecology and Evolution* [Internet]. [cited 2015 February 9];vol.7:302–307. Dostupný z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169534792902284>
- Vachtina L. I.** 1984. Chromosome numbers in some species of the genus *Allium* (Alliaceae) in the Flora of USSR. *Bot. Zhur.* 70: 700–701.
- Vinter, V.** 2009. Rostliny pod mikroskopem: základy anatomie cévnatých rostlin. 2., dopl. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, s.200.
- Vosa C. G.** 1996. Some aspects of karyotype evolution in *Liliiflorae*: heterochromatin variation and ecology in *Allium pulchellum*. – *Bocconea* 5: 267-270.

Přílohy

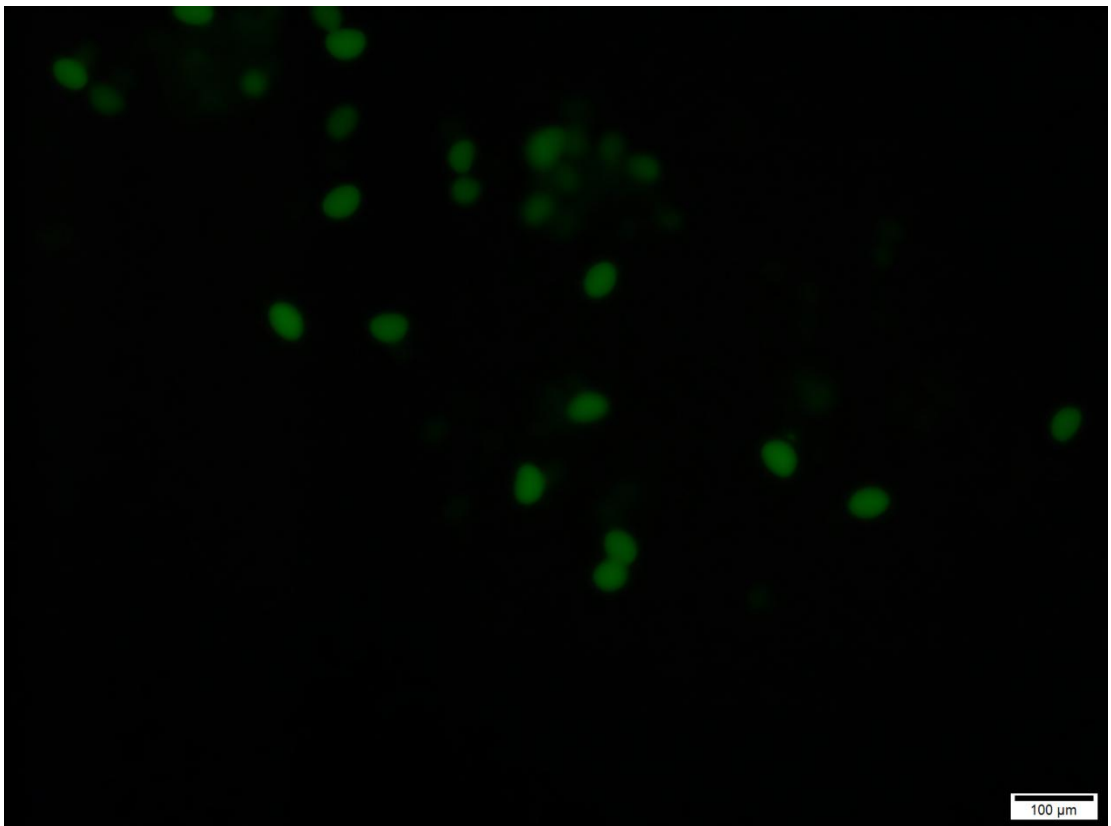
Tabulka 2. Fertilita mikrospor celkem 33 evropských populací v procentech (číslo populace: rok/číslo populace)

Populace	Jedinec	Fertilita mikrospor v %	Stupeň polyploidie	Stát
1	04/2C	18,08	5	Slovensko
2	04/4A	41,82	5	Slovensko
3	04/4C	9,44	5	Slovensko
4	04/5A	5,83	5	Maďarsko
5	04/5 C	19,71	5	Maďarsko
6	04/10E	19,53	5	Slovensko
7	04/12F	12,34	5	Slovensko
8	04/14 C	19,31	5	Slovensko
9	04/16	4,94	4	Slovensko
10	04/33E	10,90	5	Maďarsko
11	04/48C	20,00	6	Rakousko
12	04/86A	34,00	4	Slovensko
13	04/87B	29,00	4	Slovensko
14	04/88	30,00	4	Slovensko
15	04/103	64,70	4	Francie
16	05/133A	24,16	5	Německo
17	05/137	53,01	5	Německo
18	05/157	58,80	4	Slovensko
19	06/12B	58,70	5	Chorvatsko
20	06/14 A	52,77	5	Maďarsko
21	06/2A	26,75	5	Maďarsko

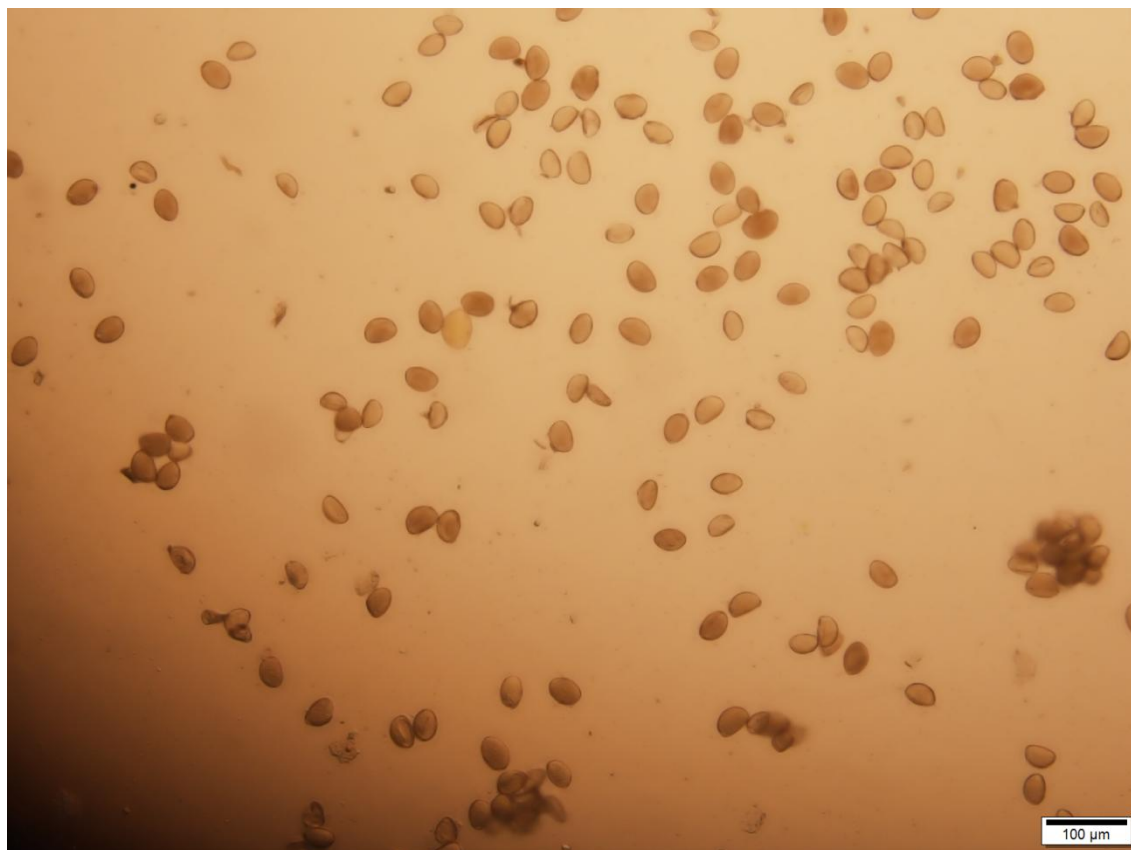
22	06/16 C	64,34	5	Maďarsko
23	06/24	11,00	3	Maďarsko
24	06/46	63,00	6	Itálie
25	06/48C	63,77	6	Itálie
26	09/54	9,07	3	Ukrajina
27	10/36	29,85	4	Litva
28	11/28A	56,40	5	Slovensko
29	11/43	96,96	5	Slovensko
30	11/10	17,12	5	Slovensko
31	11/62	6,14	5	Slovensko
32	11/44	37,20	4	Slovensko
33	12/81A	43,00	4	Španělsko



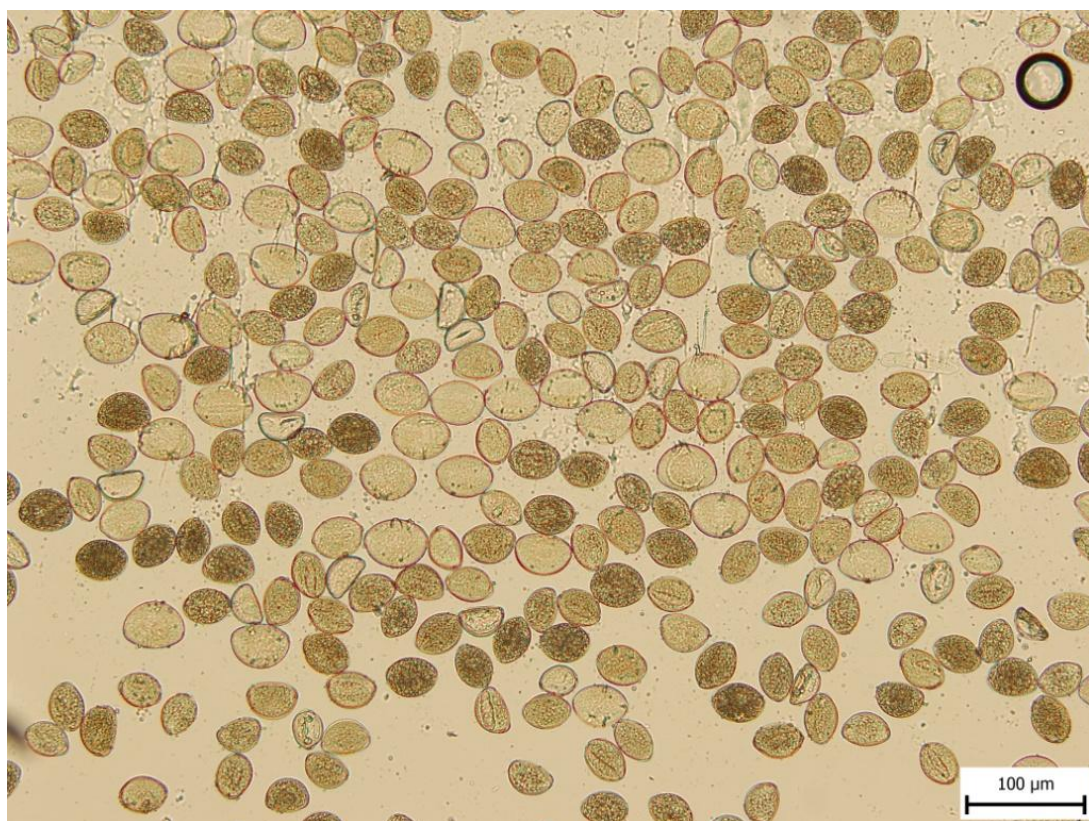
Obrázek 6: Fotografie mikrospor *A. oleraceum* při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/87B, tetraploid



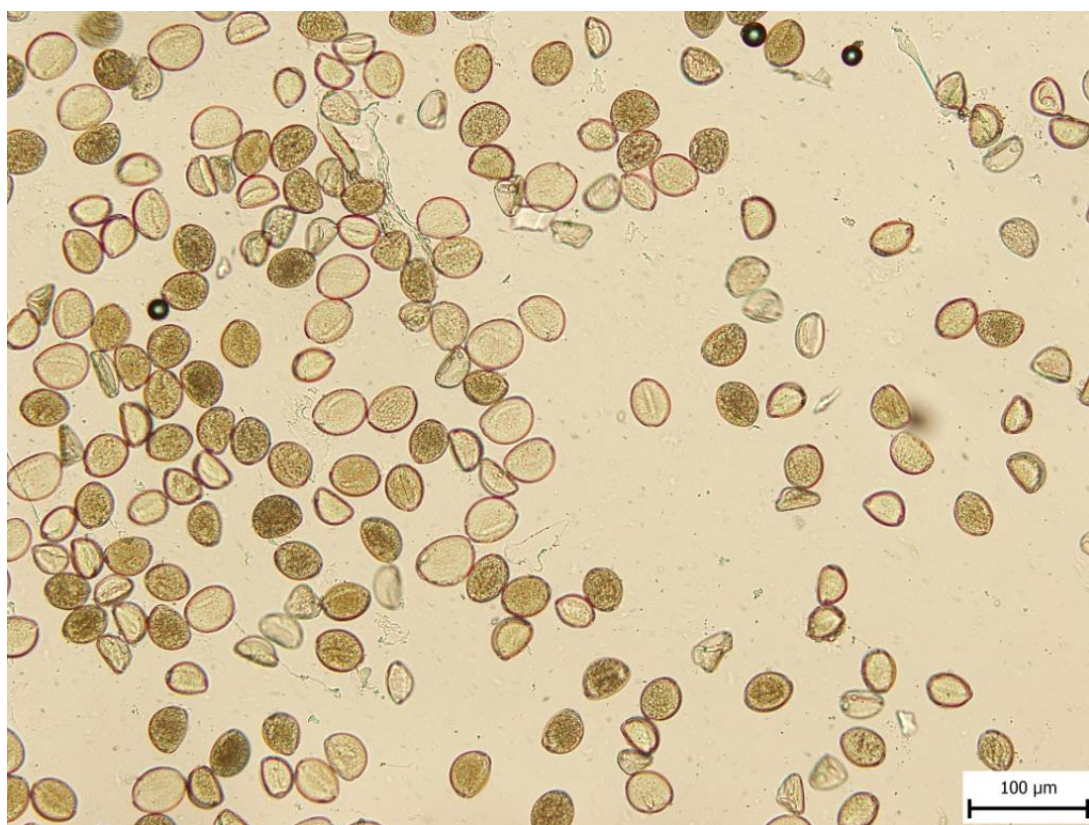
Obrázek 7: Fotografie mikrospor *A. oleraceum* při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/87B, fluorescenční režim, tetraploid



Obrázek 8: Fotografie mikrospor *A. oleraceum* při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/88, tetraploid



Obrázek 9: Fotografie mikrospor *A. oleraceum* při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/2C, pentaploid



Obrázek 10: Fotografie mikrospor *A. oleraceum* při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/14C, pentaploid

Tabulka 3. Výstup z ANOVy, fertilita mikrospor vs. ploidy

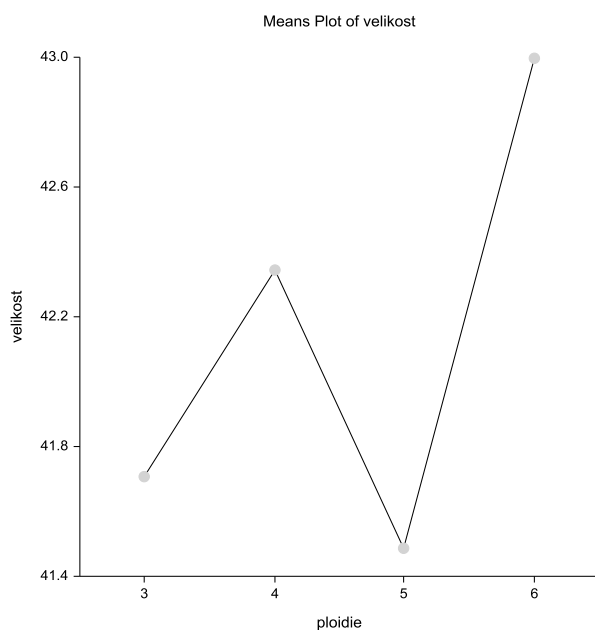
Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level
A: Ploidie	3	1336.188	445.3959	0.86	0.472246
S(A)	29	14996.98	517.1371		
Total (Adjusted)	32	16333.17			
Total	33				

Tabulka 4. Výstup z GLM, velikost mikrospor vs. ploidy

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level
A: ploidy	3	752.6857	250.8952	0.42	0.738832
B(A): jedinec	28	16656.19	594.8638	24.11	0.000000*
S	3487	86037.02	24.67365		
Total (Adjusted)	3518	103445.9			
Total	3519				



Obrázek 11: Grafický výstup z GLM, velikost vs. ploidy