

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Cytogenetická studie generativního potomstva
polyploidního komplexu *Allium oleraceum***

Cytogenetic study of generative progeny of polyploid *Allium oleraceum*

Diplomová práce

Michaela Jandová

Studijní program: biologie, studijní obor: botanika

Forma studia: prezenční

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

Olomouc 2010

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

V Olomouci dne: 24.8. 2010

.....

Poděkování

Na tomto místě bych v první řadě chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce RNDr. Martinu Duchoslavovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, udílené rady a spolupráci při řešení nejrůznějších problémů. Za všechnen čas, který mi věnoval. Dále děkuji Mgr. Martině Fialové za její pomoc a spolupráci při sběru, zpracovávání a pěstování rostlinného materiálu. Moje poděkování patří rovněž Mgr. Lence Šafářové a RNDr. Ivaně Doležalové Ph.D. za zasvěcení do problematiky průtokové cytometrie a poskytování odborné podpory při práci s průtokovým cytometrem. Rovněž děkuji RNDr. Jarmile Čihalíkové a RNDr. Pavle Válové za konzultace a spolupráci v oblasti cytogenetiky a karyologie. Chtěla bych poděkovat i Mgr. Petře Šarhanové a RNDr. Ľuboši Majeskému za odborné rady v oblasti vyhodnocování výsledků z průtokové cytometrie. Nemohu opomenout poděkovat ani pracovníkům oddělení fytopatologie a biosystematiky a ekologie rostlin za to, že jsem mohla využívat prostory laboratoří. Rovněž bych chtěla velmi poděkovat svým nejbližším a přátelům za trpělivost a podporu, kterou mi poskytli při zpracovávání této diplomové práce. Děkuji všem lidem dobré vůle, kteří mi pomohli.



*„V životě není nic nemožné a všechno má svou pravděpodobnost.“
(Mé životní motto)*

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Michaela Jandová

Název práce: Cytogenetická studie generativního potomstva polyploidního komplexu *Allium oleraceum*

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP Olomouc, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc - Holice

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

Rok obhajoby práce: 2010

Abstrakt: *Allium oleraceum* je obecně rozšířeným evropským taxonem, který představuje polyploidní komplex se čtyřmi známými cytotypy ($2n = 24; 32; 40; 48$). Z území České republiky jsou známy tři ploidní úrovně ($2n = 32; 40; 48$) rostoucí ve smíšených a homogenních populacích. Všechny tyto ploidní úrovně jsou schopny současně produkovat sexuální a asexuální potomstvo. Navzdory značným znalostem o ekologii, morfologii a fenologii tohoto druhu je dosud málo známo o koexistenci jednotlivých cytotypů v přírodě. Obecně může generativní reprodukce významně ovlivňovat genomový pool a cytogenetické složení jednotlivých populací. V rámci cytotypů *A. oleraceum* rostoucích v České republice bylo detekováno karyologicky variabilní generativní potomstvo se vzácným zastoupením aneuploidních jedinců. Tato variabilita byla výrazně větší mezi semeny ($3x - 8x$) nežli mezi semenáčky ($4x - 7x$) a dospělými rostlinami ($4x - 6x$), což svědčí o probíhající selekci působící proti anomálním chromosomálním kombinacím. Zjištěná cytotypová kompozice generativního potomstva je pravděpodobně jedním z hlavních faktorů ovlivňujících ploidní složení populací společně s migrací za pomoci vegetativních propagulí. K selekci zjištěné v časných vývojových stádiích semenáčků a později i u juvenilních rostlin přispívají i selekční procesy působící při opylení a dozrávání semen. Vypovídají o tom průměrné podíly abortovaných a nevyklíčených mrtvých semen u $4x$ (30,2/32,4 %), u $5x$ (30,2/20,8 %) a u $6x$ (28,6/17,5 %).

Klíčová slova: polyploidní komplex, selekce, *Allium oleraceum*, generativní potomstvo, karyologická variabilita, FCSS, FCM, karyologie

Počet stran: 91

Počet příloh: 5

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname: Michaela Jandová

Title: Cytogenetic study of generative progeny of polyploid *Allium oleraceum*

Type of thesis: Master

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc - Holic

Supervisor: RNDr. Martin Duchoslav, Ph.D.

The year of presentation: 2010

Abstract: *Allium oleraceum* is a common European polyploid complex of four cytotypes ($2n = 24, 32, 40, 48$). In the Czech Republic, there are known only three cytotypes ($2n = 32, 40, 48$) occurring in mixed or homogenous populations. All of these ploidy levels are able to simultaneously produce sexual and asexual (vegetative) offspring. Despite considerable knowledge about the ecology, morphology and phenology of this species it is still little known about the coexistence of different cytotypes in nature. In general, sexual reproduction may significantly affect the pool of genomic and cytogenetic composition of individual populations. Generative progeny of the three cytotypes occurring in the Czech Republic was found to be karyologically variable with rare representation of aneuploid individuals. This variability was significantly larger in the seeds ($3x - 8x$) than in the seedlings ($4x - 7x$) and mature plants ($4x - 6x$), this suggesting ongoing selection acting against abnormal chromosomal combinations.. Karyologically variable generative progeny is probably one of the main factors influencing ploidy composition of populations together with immigration of vegetative propagules. The selection found in the early developmental stages of seedlings and later even in juvenile plants also contribute to selection processes involved in fertilization and seed maturation. The average proportions of dead aborted and sprouted seeds in $4x$ were 30.2 / 32.4 %, in $5x$ 30.2 / 20.8 % and in $6x$ 28.6 / 17.5 %, respectively.

Keywords: polyploid complex, selection, *Allium oleraceum*, generative progeny, karyological variation, FCSS, FCM

Number of pages: 91

Number of appendices: 5

Language: Czech

1. ÚVOD	8
2. OBECNÁ ČÁST	9
2.1 Polyploidie.....	9
2.1.1 Názory na polyplodii	9
2.1.2 Vznik polyplodů	12
2.1.3 Četnost polyplodů.....	17
2.1.4 Vlastnosti polyplodů.....	19
2.2 Průtoková cytometrie.....	23
2.2.1 Vývoj průtokové cytometrie.....	23
2.2.2 Princip průtokové cytometrie	24
2.2.3 Stanovení DNA ploidní úrovně	25
2.2.4 Analýza reprodukčního modu (Flow cytometry seed screen - FCSS)	25
2.3 <i>Allium oleraceum</i> L. – objekt studia.....	26
2.3.1 Taxonomické zařazení a rozšíření	26
2.3.2 Popis	27
2.3.3 Původ druhu.....	27
2.3.4 Související studie.....	28
3. CÍLE STUDIA	31
4. METODIKA	32
4.1 Rostlinný materiál	32
4.1.1 Cytotypové složení populací	32
4.1.2 Sběr propagulí	35
4.2 Klíčení semen	36
4.3 Tetrazoliový test	37
4.4 Napěstování semenáčků, jejich přežívání a kvetení	38
4.5 Stanovení DNA-ploidní úrovně.....	39
4.6 Průtoková cytometrie semen	40
4.7 Karyologie – mitosa kořenových špiček	41
4.8 Statistické zpracování dat	42
4.9 Seznam použitých zkratk	43
5. VÝSLEDKY	44
5.1 Cytotypová kompozice populací	44
5.2 Produkce generativního potomstva	47
5.3 Germinační experiment	50

5.4	Cytotypová kompozice generativního potomstva	53
5.5	Přežívání	58
5.6	Variabilita generativního potomstva	60
5.7	Karyologie	63
5.8	Způsob rozmnožování - metoda FCSS	63
6.	DISKUSE	66
6.1	Způsob rozmnožování – metoda FCSS	66
6.2	Cytotypová kompozice populací a produkce generativního potomstva	67
6.3	Klíčení semen a dormance	69
6.4	Cytotypová kompozice generativního potomstva a původ smíšených populací	71
6.5	Selekce	76
7.	ZÁVĚR	77
	LITERATURA	79
	PŘÍLOHA	88

1. ÚVOD

Rod *Allium* v sobě zahrnuje více než 700 druhů jednoděložných rostlin, z nichž všechny, kromě *Allium dregeanum* jehož domovem je Jižní Afrika (De Sarker et al. 1997), rostou na severní polokouli (Konvička 1998; Nguyen 2008). Jako centrum diverzity je označována jihozápadní, střední a východní Asie, v Severní Americe pak Texas a Kalifornie. Převážná většina taxonů upřednostňuje sezónně suchá stanoviště. Kromě planě rostoucích druhů obsahuje tento rod i mnoho ekonomicky významných plodin jako je například *A. cepa*, *A. sativum* nebo *A. schoenoprasum* (Konvička 1998; Nguyen 2008). Proces polyploidizace hrál v evoluci této taxonomické skupiny důležitou roli (Brat 1965; Friesen et al. 1997; De Sarker et al. 1997; Ao 2008) stejně jako agamospermie, která provází evoluci polyploidů. Apomiktická reprodukce (tj. diplosporie, partenogeneze, pseudogamie) byla pozorována například u druhů *A. senescens* nebo *A. tuberosum* (Kojima & Nagato 1997; Kim et al. 1999). Evoluční a ekonomický význam polyploidizace v tomto rodě je stále předmětem řady výzkumných prací.

Předložená diplomová práce navazuje na bakalářskou práci, která sloužila jako výchozí bod ke studiu karyologické variability generativního potomstva druhu *Allium oleraceum*. Tento polyploidní taxon byl předmětem zájmu řady studií (přehled viz Duchoslav et al. 2010), avšak dosud je málo známo o vlivu generativního rozmnožování na možnost generování a udržování cytotypové variability populací a přežívání cytotypů. Prvotní výsledky (Jandová 2008) poukázaly na schopnost adultních rostlin produkovat semenáčky různého ploidního stupně. Největší podíl na této variabilitě měly semena pocházející od pentaploidních mateřských rostlin. Vzhledem k tomu, že se jedná o lichý cytotyp, není uvedený výsledek příliš překvapující, neboť lze předpokládat tvorbu gamet o různém počtu a charakteru chromosomových sad (Fialová 1996). Avšak překvapující je vysoká míra vitality jejich potomstva, neboť z výsledků bakalářské práce vyplývá, že procento přežívajících semenáčků je relativně vysoké a příliš se neodchyluje od hodnot zjištěných pro tetraploidní cytotyp (Jandová 2008). Tento výsledek už sám o sobě vybízí k podrobnějšímu studiu uvedeného fenoménu.

V následujících kapitolách jsou stručně shrnuty základní rysy polyploidie a její důsledky pro biologii a evoluci vyšších rostlin. Praktická část se pak zabývá karyologickou variabilitou generativního potomstva polyploidního komplexu *Allium oleraceum* a vlivu této variability na kompozici cytotypů uvnitř populací.

2. OBECNÁ ČÁST

2.1 Polyploidie

Obecná definice uvádí, že polyploidie je stavem jedince, kdy se v jádrech buněk jeho těla nachází větší počet chromozomů než dvě chromosomové sady (Kováčik 1983). Současné studie naznačují, že proces polyploidizace mohl hrát důležitou roli v evoluci všech eukaryotických organismů. Avšak zatímco u živočichů je formování nových polyploidů a existence polyploidních řad vzácná, u rostlin se jedná o běžný jev. Studium polyploidie se botanikové zabývají již více než sto let a v současnosti je uznávána jako jeden z klíčových adaptačních a speciálních mechanismů v evoluci rostlin (Ramsey & Schemske 1998; Wendel 2000; Briggs & Walters 2001; Wood et al. 2009).

2.1.1 Názory na polyploidii

První zmínky o polyploidii se začaly objevovat na počátku 20. století. Podle některých autorů pojem „polyploidní“ poprvé použil Strasburger ve své studii z roku 1910 pro označení rostliny s větším než diploidním počtem chromosomových sádek (Briggs & Walters 2001). Právě z této doby pochází hned několik cytologických studií zabývajících se druhy z rodu *Oenothera*. Za zvlášť zajímavé byly pokládány rostliny, které se vyznačovaly větším a mohutnějším vzrůstem než rodičovské rostliny. Takoví jedinci byli označováni jako „mutantní“ nebo „gigas“ formy. Byla jím například *Oenothera gigas* ($2n = 4x = 28$) nebo *Oenothera semigigas* ($2n = 3x = 21$). Podrobnějšími studiemi se podařilo zjistit, že tyto druhy řazené do okruhu *O. lamarckiana*, mají ve svých buňkách znásobený počet somatických chromosomů. Na základě dalších studií bylo uvažováno, že tyto druhy vznikly fúzí redukovaných a neredukovaných gamet (Gates 1908; De Vries 1914). Postupně se začalo objevovat stále více a více prací pokoušející se vysvětlit existenci a vznik nových cytotypů i u dalších taxonů. Příkladem může být cytologická studie polyploidního komplexu *Crepis capillaris* (Navashin 1925) nebo hybridizační pokusy s rodem *Nicotiana* (Clausen & Goodspeed 1925). S narůstajícími znalostmi o polyploidech bylo stále zřetelnější, že existuje více způsobů, jak mohou vznikat.

Briggs & Walters (2001) uvádějí, že Winge v roce 1917 byl pravděpodobně první kdo odhalil rozdíl mezi prostým zdvojením chromosomové sady jednoho jedince a hybridizací spojenou s polyploidizací. Avšak teprve až o devět let později byly zavedeny termíny

rozlišující oba procesy. V prvním případě jde o autopolyploidy (produkty intraspecifické polyploidizace) a ve druhém o allopolyploidy (produkty interspecifické polyploidizace). Za autory těchto termínů jsou považováni Kihara & Ono (1926 sec. Briggs & Walters 2001).

Stebbins (1947) kromě výše uvedených termínů zavedl pojem segmentální allopolyploid pro označení polyploidů jejichž genomy jsou pouze částečně diferencované, tj. homeologické. V takovém případě může docházet k tvorbě bivalentů a různých multivalentních formací mezi chromosomy dvou rodičovských taxonů.

Podle některých autorů je možné polyploidy dělit i dle časového horizontu, a to konkrétně na paleopolyploidy a neopolyploidy (Hilu 1993). V prvním případě se jedná o prastaré druhy s rozsáhlým genomem, které prošly procesem rediploidizace. Svými vlastnostmi a chováním se již spíše podobají diploidním druhům. V průběhu evoluce u nich došlo k chromozomální reorganizaci a genetickému umlčení („*gene silencing*“) duplikovaných genů prostřednictvím řady mutací, inzercí, translokací a delecí. Neopolyploidy jsou druhy, jejichž genetické chromozomové číslo je zmnožené základní diploidní chromozomové číslo, které lze nalézt v příslušných rodech. Můžeme je dále dělit dle původu do kategorií uvedených v předchozím odstavci.

V průběhu 20. století byla zavedena, dnes již ustálená, terminologie pro označení jednotlivých polyploidních stupňů. Písmeno „*x*“ označuje základní sadu chromosomů. Jde vlastně o chromosomové číslo monoploidního genomu. Vyšší ploidní stavy se pak označují následovně: $2n = 2x$ pro diploida (jen pro úplnost), $2n = 3x$ pro triploida, $2n = 4x$ pro tetraploida, $2n = 5x$ pro pentaploida atd., dle vzrůstajícího počtu chromosomových sad. U některých druhů kapradin mohou chromosomové počty stoupat do stovek až tisíců. Takovým druhem je například *Ophioglossum coriaceum* ($2n = 360$) nebo *O. reticulatum* ($2n = 1260$). Symbol „ $2n$ “ pak označuje neredukované diplofázické nebo také zygotické chromosomové číslo. „*n*“ je označení pro meioticky redukovaný haplofázický počet chromosomů (Brownlie 1957; Soltis & Soltis 1986; Greilhuber et al. 2005).

Společně s prvními odhady o zastoupení polyploidů v rostlinné říši se začalo objevovat i množství teorií pokoušející se vysvětlit jejich evoluční potenciál. Už Stebbins (1940) uváděl některé obecné charakteristiky vyšších cytotypů, které jim mohou, za určitých podmínek, přinášet jistou evoluční výhodu oproti rodičovským druhům. Mezi tyto charakteristiky patří vzrůstající velikost buněk polyploidů, prolomení některých reprodukčně izolačních bariér, posun od sexuálního rozmnožování k apomixii, obvykle větší ekologická tolerance a s tím související širší geografická distribuce. Avšak poslední uvedenou hypotézu o spojitost mezi ekologickou tolerancí a geografickou distribucí ve své pozdější práci zamítá

(Stebbins 1985). Jako hlavní důvod uvádí jednak existenci sekundárních kontaktních zón mezi rodičovskými druhy a jejich polyploidními potomky a pak také fakt, že mnoho nových cytotypů velmi dobře přežívá v podobných lokalitách jako jejich diploidní předci. Větší geografickou distribuci přičítá spíše na vrub vzrůstu heterozygotnosti vlivem mezidruhovému hybridizace.

Při podrobnějším zkoumání dospěli někteří autoři k názoru, že počty chromosomů u vyšších rostlin vykazují jistou periodicitu. Grant (1982) ve své práci zkompletoval dosavadní znalosti o počtech chromosomů u krytosemenných rostlin (celkem 5 287 bylin a 2 665 dřevin). Získal tak sérii chromosomových čísel v rozsahu $n = 2$ až 250, kde téměř každá úroveň byla obsazena nejméně jedním taxonem. Za pomoci statistických analýz pak odhaluje nejdůležitější základní chromosomová čísla, která jsou základem polyploidních řad u jednoděložných i dvouděložných rostlin.

Podobnou situaci lze pozorovat i na úrovni jednotlivých rodů. Takováto tendence byla sledována například u šťovíků z podrodu *Rumex*, kde počty chromosomů stoupají v sérii základního čísla $x = 10$ počínaje $2n = 2x = 20$ u *R. sanguineus* po $2n = 2x = 200$ u *R. hydrolapathum* (Briggs & Walters 2001).

S nástupem moderních molekulárních technik se postupně měnily i názory na původ a evoluci polyploidů. Zásadní byl objev rapidních strukturálních změn u nově zformovaných cytotypů. Jednou z metod dnes již celkem „běžně“ používaných je například tzv. GISH (Genome *In Situ* Hybridization), která umožňuje nejen identifikovat rodičovský genom v buňkách polyploida, ale i různé intergenomické translokace. Tyto translokace reprezentují jedno z možných uspořádání genomu polyploidů a jsou důležité pro pochopení jejich evoluce. Zvláště pak v případě nových cytotypů allopolyploidního charakteru mohou uvedené změny napomoci k obnovení fertility a nukleo-cytoplasmatické kompatibility. Tak byly identifikovány strukturální změny například u druhů z rodu *Avena* nebo *Nicotiana* (Leicht & Bennett 1997).

Mezi podobné metody ať už poněkud staršího nebo novějšího data, patří například RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) nebo analýza ITS (Internal Transcribed Spacer) sekvencí. Avšak navzdory novým postupům a metodám aplikovaných při studiu polyploidie jsou názory na evoluční význam polyploidů stále předmětem horečnatých diskusí. Bude ještě zapotřebí řada analýz a studií pro alespoň částečné porozumění mechanismům a příčinám jejich formace.

2.1.2 Vznik polyploidů

Všeobecně se dá říci, že na vzniku polyploidie se podílejí zejména tři procesy, kterými jsou hybridizace, tvorba neredukovaných gamet a somatická polyploidizace.

Pokud bychom se drželi základního rozdělení polyploidů, tak v případě autopolyploidů jde o jedince, kteří vznikají buď splynutím neredukovaných (redukovaných a neredukovaných) gamet téhož druhu nebo prostým zdvojením chromosomových sad v buňkách diploidního jedince (tzv. somatičtí polyploidi). Jestliže se somatické polyploidní buňky dostanou do rozmnožovacích orgánů, může polyploidní stav přejít do další generace. Je nutné si uvědomit, že buňky takovýchto jedinců nesou více než dvě sady identických (homologních) chromosomů. To sebou přináší hned několik problémů souvisejících zejména s průběhem meiotického dělení, neboť všechny chromosomy mají stejnou příležitost k párování (Briggs & Walters 2001). I přes tyto obtíže v průběhu tvorby gamet nejsou autopolyploidi sterilní. Jejich schopnost produkovat životaschopné generativní potomstvo je velmi variabilní a často je pouze velmi málo omezena. Někteří autoři to dávají do souvislosti s redukcí obsahu jaderné DNA, neboť ztráta některých částí genomu může přispět k udržení víceméně bivalentního párování v průběhu první meiotické profáze. Taková to situace byla pozorována například u experimentálně získaného tetraploida druhu *Paspalum notatum* (Martelotto et al. 2007). Nicméně existuje řada taxonů, u kterých ke ztrátě částí DNA nedochází, a přesto produkují životaschopná semena. Genom autopolyploidů podstupuje různé strukturální přestavby a epigenetické procesy. Tyto změny mají za cíl co nejvíce genom stabilizovat a přiblížit se tak diploidnímu stavu. Terminologicky se jedná o tzv. diploidizaci, která by měla mít významný podíl na přežití daného cytotypu (Martelotto et al. 2007; Parisod et al. 2009).

Allopolyploidy si lze představit jako produkty interspecifické hybridizace dvou příbuzných druhů, která musí být provázena zmožením chromosomových sad (Ramsey & Schemske 1998). K tomu může dojít stejným způsobem, jak je popsáno v předchozím odstavci, za pomoci autopolyploidizace somatických buněk s následným přechodem tohoto stavu do reprodukčních struktur (Briggs & Walters 2001). V případě, že není hybridizace následována polyploidizací, vzniká diploidní jedinec, který má v buňkách dvě nehomologní chromosomové sady. Ramsey & Schemske (1998) uvádí, že takoví hybridy jsou většinou zcela neplodní, avšak mohou vytvořit malé množství funkčních redukovaných i neredukovaných gamet. V případě jejich splynutí dochází ke vzniku triploidních ale i tetraploidních jedinců, kteří mohou v dalších generacích, například po zpětném křížení

s diploidními rodiči, produkovat polyploidní potomstvo. V nejjednodušším případě tak lze získat tetraploidního jedince.

Obecně se uvádí, že u allopolyploidů bývá průběh meiosi pravidelnější a chromosomy se mohou normálně párovat, což má pozitivní vliv na jejich fertilitu (Briggs & Walters 2001). Avšak Ramsey & Schemske (2002) popisují, že v případě neopolyploidů je fertilita allopolyploidů značně variabilní a srovnatelná s autopolyploidy. Stejně tak, pokud pocházejí obě sady chromosomů od blízce příbuzných taxonů, tj. je zachován vysoký stupeň homologie, může docházet k párování mezi více než dvěma chromosomy za vzniku různých multivalentních formací (Briggs & Walters 2001).

Nejlépe se dá výše uvedený proces dokumentovat na příkladu asi nejznámějšího allopolyploida, kterým je *Primula kewensis*. Ta je produktem mezidruhové hybridizace *P. floribunda* a *P. verticillata*. Poprvé byla objevena roku 1899 mezi semenáčky *P. floribunda* v Královské botanické zahradě v Kew (Anonym 1910). Tento hybrid byl z hlediska morfologie intermediálním přechodem mezi oběma rodiči a dokonce měl s nimi i shodný počet chromosomů ($2n = 18$). Samotný původ druhu byl ověřen umělým křížením mezi oběma domnělými rodiči. Nicméně i přes pravidelný průběh meiotického dělení zůstávaly hybridní jedinci neplodní. Avšak několikrát se stalo, že byly nalezeny rostliny produkující životaschopná semena. Jedinci, vypěstovaní z těchto semen, byly tetraploidní a fertilmí. Při podrobnějším zkoumání se ukázalo, že stvolý některých diploidních rostlin nesou tetraploidní buňky. Pravděpodobně díky této somatické mutaci se mohl původně neplodný hybrid stát fertilmím (Briggs & Walters 2001).

Nicméně novějších studie založené na moderních technikách molekulární biologie dokazují, že proces formace a stabilizace allopolyploidů je daleko složitější než je popsáno v předchozích odstavcích. Podle Bennetta (2004) může docházet díky působení premeiotických mechanismů ke změnám v párování jednotlivých chromosomů, což přispívá ke zvýšení fertility nově vzniklých allopolyploidů. Dle citovaného autora tyto mechanismy působí nejméně na dvou úrovních. V první řadě ovlivňují genomovou separaci a v druhé řadě kontrolují samotné homologní párování chromosomů. Stejně tak se na evoluci allopolyploidů podílejí rozsáhlé genomové přestavby i faktory působící proti těmto přestavbám. Navíc byly u experimentálně získaných i přírodních allopolyploidů detekovány výrazné epigenetické procesy významně ovlivňující genovou expresi (Ainouche et al. 2004).

Hybridizace spolu s polyploidizací hrála nezastupitelnou roli v evoluci rostlin, neboť po překonání počátečních problémů se sterilitou a nehomologností rodičovských genomů vznikne jedinec se zcela novým komplexem vlastností. To mu může přinést značnou výhodu

oproti rodičovským druhům. Hybridi tak mohou snáze obsazovat nové typy stanovišť a efektivně zvětšovat svůj areál rozšíření. Podle některých odhadů je až 27 500 druhů vyšších rostlin hybridního původu (Rieseberg 1997).

Průměrná frekvence tvorby neredukovaných gamet je odhadována na 0,56 % u diploidů a na 27,52 % u allopolyploidů. Neredukované mohou být oba typy gamet, tj. vajíčka i pylová zrna. Přesto, že existuje mnohem více studií zabývajících se mikrosporogenezí nežli megasporogenezí, je odhadováno, že intenzita tvorby neredukovaných gamet je podobná pro oba typy (Ramsey & Schemske 1998). Uvedené průměrné hodnoty neodrážejí plně situaci uvnitř jednotlivých druhů. Na této úrovni může být zastoupení polyploidních gamet velmi variabilní a zároveň se jejich procento může měnit v závislosti na dané rostlině. Například v rámci druhu *Trifolium pratense* ($2n = 14$ a 28) se produkce $2n$ pylu pohybuje v rozmezí 1% až 84 % (Parrott & Smith 1984). Intenzita tvorby neredukovaných gamet může být významně ovlivněna i vnějšími faktory. Jsou známy případy, kdy se jejich produkce zvýšila vlivem působení nízkých teplot, nutričního stresu nebo následkem napadení nějakým parazitem. Stejně tak může být frekvence neredukovaných gamet pod genetickou kontrolou. V takovém případě se většinou jednalo o jeden nebo několik málo recesivních genů (Levin 2002).

Produkce neredukovaných gamet může působit jako důležitý faktor při prolomení gametofytické autoinkompatibility u diploidních druhů a tím umožnit vznik embryí polyploidního charakteru. Zdá se, že existuje genetická interakce mezi geny v polyploidním pylu a geny samičích generativních struktur. Jsou popsány případy, kdy opylení diploidní rostliny vlastním polyploidním pylem vedlo k tvorbě nových cytotypů (Ramsey & Schemske 1998).

Z výše uvedených informací je zřejmé, že k formaci nových polyploidů za přispění neredukovaných gamet může docházet dvěma způsoby. V prvním případě se jedná o tzv. unilaterální polyploidizaci, při které dochází ke splývání redukované a neredukované gamety, v nejjednodušším případě za produkce triploidů. V druhém případě lze hovořit o tzv. bilaterální polyploidizaci, kdy se na tvorbě potomků podílejí pouze gamety neredukované. Pokud se jednalo o pohlavní buňky pocházející od diploidních rodičů, jsou produktem jejich splnutí tetraploidní jedinci. Podmínkou pro fungování bilaterální polyploidizace je dostatečná produkce neredukovaných gamet. Proto je tento proces z velké části závislý na existenci neobvyklých jedinců, kteří $2n$ gamety tvoří s vysokou frekvencí (Levin 2002).

Obecně je produkce životaschopných triploidů považována za vzácnou událost, neboť semena vzniklá fúzí n a $2n$ gamet jsou ve většině případů abortována. Příčinou je

pravděpodobně porucha ve vývoji endospermu. Tento jev je často popisován jako tzv. „triploidní blok“ (Marks 1966). Existuje řada hypotéz usilující o vysvětlení tohoto fenoménu. Lin (1984) ve svém experimentu s kukuřicí popisuje vývoj endospermu s různou úrovní ploidie ($2x - 9x$). Došel k závěru, že k jeho normálnímu vývoji dochází pouze v případě, když je triploidního nebo tetraploidního charakteru. V ostatních případech je endosperm abortován. Na základě tohoto výsledku odvodil, že jeho normální vývoj je možný pouze v případě, když je zachován poměr mezi dávkou maternálního a paternálního genomu 2 : 1.

Köhler et al. (2010) přistupuje k problematice triploidního bloku z komplexnějšího hlediska a souhrnně uvádí několik možných vysvětlení. V první řadě změna v dávkě maternálního a paternálního genomu inhibuje správný vývoj endospermu v důsledku nerovnováhy cytoplazmatických faktorů a množství organel. V další hypotéze pracuje s epigenetickými jevy a sex-specifickým genomovým imprintingem, neboť exprese genů v endospermu významně ovlivňuje vývin embrya. Parentální imprinting společně s nestejným příspěvkem genů od samčího rodiče vede k odlišným hladinám genové exprese v endospermu. Změna v dávkě maternálního a paternálního genomu způsobí porušení rovnováhy v počtu aktivních kopií imprintovaných genů. To má ve většině případů za následek nepřiměřený vývin endospermu a jeho následnou aborci (Kermickle & Alleman 1990). Tvorba životaschopných semen s normálně vyvinutým endospermem tedy závisí na vyváženém příspěvku mateřského a otcovského genomu v endospermu (2 : 1) a na vyrovnaném působení genetických kontrolních mechanismů (Köhler et al. 2010).

Některé studie naznačují, že kompletní fungování triploidního bloku lze předpokládat pouze u křížení mezi diploidy a tetraploidy a to ještě jen v případě, že donorem pylu je tetraploidní rostlina. Existuje i řada polyploidních komplexů, kde produkují životaschopná semena i vyšší ploidní úrovně. Navíc jsou i takové taxony, jejichž zralá semena endosperm vůbec neobsahují, a přesto běžně produkují vitální generativní potomstvo. Takové taxony najdeme například v čeledích, jako jsou *Asteraceae* nebo *Salicaceae* (Ramsey & Schemske 1998; Levin 2002). Avšak podle Köhler et al. (2010) může fungování triploidního bloku působit jako důležitý reprodukčně izolační mechanismus bránící produkci životaschopného potomstva ze zpětného křížení polyploidů s jejich rodiči, což má zásadní vliv na speciaci polyploidů.

Ačkoliv triploidi v průběhu redukčního dělení produkují převážně aneuploidní gamety, mohou vytvořit i velmi malé procento haploidních, diploidních i triploidních vajíček a pylových zrn. Průměrná fertilita jejich pylu se pohybuje okolo 31,9 % s rozdílem mezi autotriploidy (39,2 %) a allotriploidy (23,7 %) (Ramsey & Schemske 1998). Důkazem toho

může být produkce životaschopného potomstva z křížení mezi triploidy navzájem a mezi triploidy a diploidy. Schopnost triploidů přispívat k produkci životaschopného potomstva pocházejícího z mezicytotypového křížení je dávana do souvislosti s tzv. triploidním mostem. Ten má pravděpodobně důležitou úlohu při tvorbě a stabilizaci cytotypově smíšených populací (Husband 2004). Různé hybridizační experimenty mezi triploidy a jim nejbližšími cytotypy ($2n = 2x; 4x$) prokázaly tvorbu generativního potomstva různé ploidní úrovně s nezanedbatelným zastoupením tetraploidů, pentaploidů a hexaploidů. Tetraploidní semena byla produkována například ze zpětného křížení triploidů s jejich diploidními rodiči. Takto vzniklí tetraploidi mohou přežívat ve smíšených populacích s jejich rodičovskými cytotypy a posléze přispívat k produkci nových tetraploidů cestou zpětného křížení s triploidy. Za určitých podmínek tento proces může fungovat i v případech jiných cytotypů, jako jsou například penta- nebo hexaploidi (Ramsey & Schemske 1998).

Fungování triploidního mostu se tak významnou měrou podílí na genetické struktuře jednotlivých cytotypů. Obecně je genetický tok považován za klíčový faktor ovlivňující genetický pool a strukturu populací. Jeho omezení vede k divergenci populací, zatímco jeho udržování na vysoké intenzitě přispívá k homogenizaci genetických zdrojů. Naproti tomu některé studie uvádějí, že právě díky migraci genů může vzrůstat fitness a heterogenost populací (Coates & Byrne 2005). Příkladem vlivu triploidního mostu na genetickou strukturu populací může být situace u druhu *Chamerion angustifolium*. Různé počítačové simulace napovídají, že osud tetraploidů v diploidních populacích se liší v závislosti na relativní fitness triploidů, ploidii jejich gamet a míře zpětného křížení s rodičovskými cytotypy. Už jenom částečná vitalita triploidů může významně usnadnit stabilizaci tetraploidů v diploidních populacích (Husband 2004).

Genetický tok neovlivňuje genetickou strukturu populací pouze prostřednictvím triploidního mostu. Podobně může docházet k promíchávání genetického poolu přímo mezi různými ploidními hladinami a jejich rodičovskými cytotypy. Lumaret & Barrientos (1990) popsali vliv toku genů na genetickou strukturu tetraploidů u druhu *Dactylis glomerata* ($2n = 2x; 4x$). Částečný překryv doby kvetení zajišťuje dostatečnou distribuci gamet mezi oběma cytotypy. V důsledku toho byla zjištěna silná genetická podobnost mezi diploidy a tetraploidy. Pravděpodobně asi největší vliv na charakter populací má genetický tok směrem od $2x$ cytotypu k $4x$.

Obecně by výše popsané jevy nefungovaly, kdyby nedocházelo k uchycení nově zformovaných cytotypů v populacích jejich rodičů. V takových případech může působit proti novým cytotypům proces tzv. minoritní cytotypové nevýhody (Levin 1975). Vzácné ploidní

úrovně jsou ovlivněny pylovou produkcí rodičovských druhů, což způsobuje značné problémy při tvorbě životaschopných semen. Díky tomuto procesu dojde ke značnému poklesu početnosti minoritních polyploidních úrovní a tím i ke snížení možnosti jejich opětovné formace a stabilizace uvnitř rodičovských populací, což v konečném důsledku může vést až k jejich vymizení (Levin 2002). Pokud se vzácným polyploidům podaří překonat „minoritní cytotypovou nevýhodu“ a dostanou se do prostředí, kde nebudou pod selekčním tlakem rodičovského druhu, budou zde moci nadále přežívat. Stejně tak, pokud mají komplex vlastností, díky kterým jsou konkurenčně silnější než rodičovský cytotyp, mohou jej v konečném důsledku zcela nahradit (Fowler & Levin 1984). Levin (1975) popsal úplné fungování minoritní nevýhody pouze u 2x-3x-4x komplexu a to pouze v případě, kdy nedochází k samoopylení a vegetativnímu rozmnožování daného cytotypu. Kao (2007) připouští fungování uvedeného fenoménu i na vyšších ploidních úrovních a zároveň uvádí, že jednou z možností, jak se mohou minoritní cytotypy vyhnout zániku, je přechod od sexuálního rozmnožování k apomixii. Ta jim umožní překonat problémy s produkcí jejich potomstva (Kao 2007). Stejně tak i snížení vlivu imbrední deprese u polyploidů se může významným způsobem podílet na udržení nových cytotypů v populaci jejich rodičů (Rausch & Morgan 2005). Díky výše popsaným jevům tak může docházet ke stabilizaci a udržování cytotypově smíšených populací.

Z odborného hlediska je polyploidizace chápána jako tzv. saltační speciace. Jde o proces, který v sobě zahrnuje soubor rychlých a skokových změn významně ovlivňujících charakter a strukturu rostlinných populací (Briggs & Walters 2001). Formace a vnik polyploidů není otázkou pouze vzdálené historie, ale jde o neustále probíhající a dynamický proces zásadně ovlivňující rostlinnou evoluci.

2.1.3 Četnost polyploidů

Na základě různých předpokladů o hranici mezi nejvyšším základním chromosomovým číslem a polyploidii se neustále mění pohled na počet a zastoupení polyploidů v rostlinné říši. Mezi asi nejvíce citované autory, kteří přinesli jedny z prvních odhadů o procentickém zastoupení polyploidů mezi vyššími rostlinami, patří Grant (1963) - 47 % krytosemenných rostlin; Stebbins (1971) - 30 až 35 % krytosemenných rostlin; a Goldblatt (1980) - 70 % jednoděložných rostlin (sec. Levin 2002). Každý z nich měl trochu jiný názor na to, které ze základních chromosomových čísel je tím nejvyšším. Grant (1982) ve své originální práci hodnotí rozsah základních chromosomových čísel u jednoděložných i dvouděložných rostlin.

Na základě souboru tisíců údajů o počtech chromosomů usuzoval, že pro jednoděložné rostliny jsou zásadní základní chromosomová čísla o rozsahu $x = 6$ až 12 . Pro dvouděložné se tyto hodnoty dělily do dvou skupin. U bylin se s největší frekvencí vyskytuje $x = 7$ až 9 a pro dřeviny je nejčastěji zastoupeno $x = 11$ až 14 . Podobně byly popsány i základní chromosomová čísla u čeledi *Poaceae*, pro kterou jsou nejběžnější $x = 5$; 6 a 7 . Navíc se zdá, že polyploidie v této skupině organismů vznikla již velmi dávno, tj. před několika miliony let (Stebbins 1985).

Z novějších studií se uvedenou problematikou zabývá například Masterson, který na základě srovnání velikosti průduchů v současnosti existujících druhů s fosilními pozůstatky odhaduje, že asi 70 % všech druhů vyšších rostlin má polyploidní původ (Masterson 1994 sec. Levin 2002).

Stejně jako zastoupení polyploidů je i otázka frekvence polyploidní speciace velmi diskutovaným tématem. S rozvojem počítačových analýz a statistických modelů se objevila řada prací zabývajících se touto problematikou. Wood et al. (2009) na základě jejich výsledků dospěli k závěru, že 15 % speciálních událostí u cévnatých rostlin a 31 % u kaprad'orostů jsou provázeny polyploidizací. Uvedená procenta jsou až čtyřnásobkem hodnot, ke kterým dospěli Otto & Whitton (2000). Jejich odhady se pohybovaly v rozmezí 2 – 4 % pro kvetoucí cévnaté rostliny a okolo 7 % pro kapradiny.

Ramsey & Schemske (1998) ve své studii odhadují rychlost polyploidní formace za přispění neredukovaných gamet. Rychlost formování autotetraploidů je odhadována na $7,14 \times 10^{-5}$ tetraploidů v F1 generaci produkované diploidními rodiči v případě jejich samoopylení a $3,32 \times 10^{-5}$ tetraploidů v případě zpětného křížení vzniklých autotetraploidů s rodičovským cytotypem. Pro allotetraploidy je odhad o něco vyšší, a to $4,09 \times 10^{-2}$ tetraploidů v F1 generaci diploidních hybridů v případě jejich samoopylení a $1,22 \times 10^{-3}$ tetraploidů v případě jejich zpětného křížení s rodičovským cytotypem.

Obecně se dá říci, že polyploidie je všeobecně rozšířena mezi vyššími rostlinami. Výjimku tvoří rostliny nahosemenné, kde tento fenomén není tak častý. U nahosemenných rostlin byla polyploidie zaznamenána na třech úrovních, podobně jako je to u ostatních skupin vyšších rostlin. Různé cytotypy byly nalezeny jednak mezi semenáčky diploidních druhů a jednak i mezi dospělými jedinci (Khoshoo 1959). Asi největší zastoupení mají polyploidi v rodě *Ephedra*, kde má určitý stupeň polyploidie přibližně 50 % druhů. Různé cytotypy byly zaznamenány i v případě čeledi *Cupressaceae*. Za přírodní polyploidy jsou považováni například *Sequoia sempervirens* ($2n = 6x = 66$) nebo *Juniperus chinensis* 'Pfitzeriana' ($2n = 4x = 44$). Za nízkou frekvencí polyploidů u nahosemenných rostlin

pravděpodobně stojí vývojové vady u nově vzniklých cytotypů. Tento předpoklad je založen na pozorování experimentálně získaných polyploidů, u kterých docházelo k abnormálnímu růstu (Ahuja 2005). Polyploidie je známa i u hub, řas a mechorostů a v současnosti je předmětem intenzivních studií (Briggs & Walters 2001; Kapraun 2005; Leitch et al. 2005) stejně tak jako u živočichů. Zde byla potvrzena u přibližně 200 druhů hmyzu a obratlovců a další případy jsou popsány i u bezobratlých. Například u korýšů se haplofázické počty chromosomů pohybují v rozsahu $n = 27 - 188$ chromosomů (Otto & Whitton 2000).

2.1.4 Vlastnosti polyploidů

Jak již bylo uvedeno výše, mají polyploidi některé vlastnosti, kterými se výrazně odlišují od jejich rodičovských druhů. Zvýšení množství jaderné DNA sebou zákonitě nese i změny v celkové morfologii zasažených jedinců. Z historického hlediska byly tyto odchylky prvními kritérii, podle kterých se rozlišovaly polyploidní cytotypy. Stebbins (1940) uváděl, že buňky polyploidních rostlin mají celkově větší velikost než buňky stejného typu u jejich diploidních příbuzných. Tato skutečnost jde samozřejmě ruku v ruce se vzrůstem velikosti rostlinných orgánů i celého jedince. Segraves & Thomson (1999) pracovali se dvěma cytotypy druhu *Heuchera grossulariifolia* ($2n = 2x; 4x$). Autotetraploidi se jevily již na první pohled jako celkově větší a mohutnější rostliny. Produkovaly však mnohem méně květů, které ale měly v porovnání s diploidním cytotypem větší velikost.

Do souvislosti se zmnožením počtu chromosomů je často dáváno i zpomalení růstu a ontogenetického vývoje, které může mít za následek změnu v době nástupu a délce trvání fenologických fází nebo dokonce změnu životní formy. Ramsey & Schemske (2002) dávají tento jev do souvislosti se vzestupem počtu homologních chromosomů. Avšak Francis et al. (2008) usuzují, že zpomalení růstu polyploidů souvisí spíše se vzrůstem množství 1C DNA v jádře. Na této úrovni se jim podařilo prokázat pozitivní korelaci mezi stoupajícím obsahem 1C DNA a prodlužující se dobou buněčného cyklu. Naproti tomu Knight et al. (2005) uvádí, že vztah mezi velikostí genomu a rychlostí růstu souvisí spíše s ekologií a životní strategií daného druhu. Nízký jaderný obsah DNA nevyklučuje jeho možný polyploidní charakter. Rostliny s menší velikostí genomu představují nejčastěji invazivní druhy, které se rychle a intenzivně šíří (Kubešová et al. 2010). Většina druhů s rozsáhlým genomem jej získala v důsledku intenzivního působení transpozonů, které zvyšují množství nekódující DNA (Knight et al. 2005).

V souvislosti se zvětšením velikosti buněk a s pomalejším růstem polyploidů je často sledována velikost a produkce semen a jejich klíčivost. Obecně se dá říci, že vlivem polyploidizace dochází ke vzrůstu velikosti semen a k poklesu jejich klíčivosti (Levin 2002). Knight et al. (2005) popisuje, že rostliny s malým genomem tvoří velké množství malých semen a to i přesto, že mohou tvořit i semena velká. Jde pravděpodobně o evolučně výhodnější strategii, neboť jim umožňuje intenzivně se šířit do svého okolí a zároveň snižuje rychlost extinkce druhu. Naproti tomu rostliny s velkým genomem a tomu odpovídajícími většími semeny produkují výrazně méně generativního potomstva. Avšak tato nevýhoda je často kompenzována jejich schopností dobře přežít i při silném působení stresových faktorů. Podobně vztah mezi genomovou velikostí a velikostí semen studovala i Beaulieu et al. (2006). Autoři prokázali významnou pozitivní korelaci mezi velikostí genomu a průměrnou hmotností semene u krytosemenných i nahosemenných rostlin.

Z fyziologického hlediska polyploidní stav nejvíce ovlivňuje produkci rostlinných hormonů, vodní potenciál, fotosyntetickou aktivitu a produkci sekundárních metabolitů. To všechno souvisí se vzrůstem počtu kopií jednotlivých genů a novými genovými kombinacemi (Levin 2002).

Polyploidní stav nemusí nutně znamenat vzestup transkripční aktivity ani zvýšení koncentrace rostlinných metabolitů. Více méně se zdá, že celkový vliv zmnožení počtu chromosomů na daný cytotyp je závislý na genetické konstituci daného organismu a může se měnit mezi jednotlivými taxony (Levin 2002). Autotetraploidi druhu *Lycopersicon esculentum* produkují až o 15 % méně RNA a mají až o 25 % nižší aktivitu RNAsy než diploidní cytotyp (Tal 1977). Naproti tomu u experimentálně navozené polyploidní série *Zea mays* bylo zjištěno, že absolutní hladina genetické exprese na buňku vzrůstá společně se stoupající ploidní hladinou (Guo et al. 1996).

Obecně se uvádí, že polyploidi obvykle lépe snášejí vodní stres, což jim přináší značnou konkurenční výhodu. Mají sice celkově větší buňky průduchů, ale jejich počet na jednotku plochy je menší než u diploidů, což má negativní dopad na rychlost transpirace. Silnější epidermis na obou stranách listů rovněž přispívá ke snížení transpirace. Uvedený jev úzce souvisí s intenzitou výměny CO₂ a fotosyntetickou aktivitou. Z některých studií zabývajících se touto problematikou vyplývá, že v rámci tetraploidního cytotypu je celková rychlost fotosyntetické asimilace menší v porovnání s diploidním cytotypem (Levin 2002).

Avšak Knight et al. (2005) dávají změnu v intenzitě fotosyntézy spíše do souvislosti s obsahem jaderné DNA než přímo se změnou ploidní úrovně. Jejich předpoklad vychází z výsledku analýz, kterým podrobili údaje o rychlosti fotosyntézy a velikosti genomu u 24

druhů rostlin. Z výsledků vyplývá, že rostliny s menším genomem vykazují větší míru fotosyntetické aktivity a to v souvislosti i s malou hmotností jejich semen. Rostliny s lehkými semeny mají malé množství zásobních látek, a proto musí být tento nedostatek co nejdříve nahrazen produkcí vlastních asimilátů po vyklíčení. Beaulieu et al. (2008) testoval vztah mezi velikostí genomu a velikostí stomatálních a epidermálních buněk ve spojitosti s listovou plochou u tří růstových forem vyšších rostlin. Podařilo se jim odhalit významnou pozitivní korelaci mezi 2C obsahem DNA a velikostí svěřacích buněk a již méně významnou negativní korelaci mezi 2C obsahem DNA a hustotou stomat na danou plochu listů. Rozdíly mezi jednotlivými růstovými formami nebyly signifikantní. Ukázalo se však, že keře a stromy mají obecně menší buňky i obsah 2C DNA, ale větší hustotu stomat na plochu listů než byliny. Tyto výsledky tak potvrzují, že změny ve velikosti genomu spojené se změnou hustoty a délky stomat mohou významně ovlivňovat fyziologii a ekologii druhů.

Změny v produkci sekundárních metabolitů mohou významně ovlivnit interakci mezi rostlinou a jeho patogenem či herbivorem. Zmnožení počtu chromosomů nemusí nutně znamenat vzestup hladiny různých metabolických látek. Více méně je tento efekt závislý na genetickém základu daného druhu (Levin 2002). Například u *Solidago gigantea*, který je v přírodních populacích zastoupen třemi ploidními hladinami, byla sledována změna v koncentraci třech typů terpenoidů. Zatímco tetraploidi se v obsahu sledovaných látek lišili od svých diploidních rodičů pouze ve vyšší koncentraci sesquiterpenů, byla situace u hexaploidů odlišná od obou zmíněných cytotypů. Ti měli výrazně vyšší koncentraci monoterpenů a naopak menší koncentraci di- a sesquiterpenů. Uvedené rozdíly v kombinaci s dalšími vlastnosti mohou významně přispívat k evolučnímu úspěchu některých polyploidů. V tomto případě tetraploidů, neboť právě tento cytotyp je nejvíce rozšířen v Evropě i Severní Americe (Hull-Sanders et al. 2009).

Je známo, že zmnožení počtu chromosomů u polyploidů je provázeno četnými poruchami v průběhu meiosi a částečnou nebo úplnou sterilitou, což je jedním z podstatných důvodů, proč u nich dochází tak často k posunu od sexuálního rozmnožování k apomixii. V širším slova smyslu si pod pojmem apomixie lze představit tzv. vegetativní apomixii a agamospermii. V prvním případě jde vlastně o rozmnožování za pomoci různých specializovaných propagulí nebo vegetativních výhonů. Noví jedinci vzniklí touto cestou budou mít stejný genotyp jako rodičovská rostlina. V takovém případě mají na variabilitě daných populací podíl zejména somatické mutace. Jako agamospermii označujeme situaci, kdy rostlina vytváří normální semena, ale ta nevznikají jako produkty standardního sexuálního rozmnožování, tj. splynutím samčích a samičích gamet. Samotná agamospermie se

dále rozlišuje na velké množství typů. Apomixie přináší polyploidům hned několik výhod. V prvé řadě jim umožňuje tzv. únik před sterilitou. Za druhé ji lze chápat jako velmi dobrou adaptaci na nové nepříliš příznivé stanoviště. A v neposlední řadě je to vhodný způsob pro rychlé osídlení nové lokality a zajištění produkce nové generace. Je nutné si uvědomit, že pro většinu polyploidů je typickým způsobem rozmnožování fakultativní agamospermie, a proto se v dalších generacích může na složení populace podílet i sexuální potomstvo (Briggs & Walters 2001). Existuje velké množství polyploidů, pro které je apomixie s. l. zcela převažující typ rozmnožování. Například u rodu *Ficaria* jsou tetraploidní rostliny (*F. bulbifera*) téměř sterilní. Zato však tvoří dostatečné množství vegetativní propagulí (tzv. pacibulky). Naproti tomu diploidní *F. calthifolia* se rozmnožuje převážně generativně (Pogan & Wcisło 1981).

Polyploidizace může u některých druhů prolomit efekt autoinkompatibility a noví jedinci pak mohou vznikat cestou samoopylení. To jim umožňuje se rozmnožovat i při nedostatku kompatibilního pylu od ostatních rostlin v populaci (Levin 2002). Avšak podrobnější studie neposkytla důkaz o přímém vztahu mezi polyploidii a autokompatibilitou (Mable 2004). Může se zdát, že polyploidi nejsou ohroženi inbrední depresí a vznikem homozygotů tak, jako jejich diploidní rodiče. U tetraploidů se dokonce uvádí, že asi pouze 5,6 % potomků F1 generace je homozygotních (Briggs & Walters 2001). Nicméně jim tato zdánlivá a tradovaná výhoda může přinést i značné obtíže, a to v případě výskytu mutací. Jestliže genom diploidních rodičů obsahuje určitý počet mutací, pak jejich polyploidní potomek jich bude mít přinejmenším dvojnásobek. Takto mohou být poškozeny životně důležité geny, které pak negativně působí na přežívání zasažených polyploidů (Otto 2007).

Díky nové genetické konstituci polyploidů se mění i hladina jejich ekologické tolerance, což souvisí i s geografickým rozšířením (Levin 2002). Polyploidi jsou často adaptováni na extrémnější teplotní či vlhkostní režim než jejich diploidní protějšek. V současné době převažuje názor, že rozšíření a zastoupení polyploidů v rostlinné říši je převážně výsledkem působení dramatických klimatických změn v průběhu čtvrtohor a zvláště pak poslední glaciální periody (Brochman et al. 2004). Velká klimatická variabilita spojená i s pokračujícím formováním velkých pohoří vedla v těchto obdobích k rozsáhlým změnám v geografické distribuci druhů a k vývoji nových taxonů. V dobách meziledových se druhy mohly šířit do vyšších nadmořských výšek a také dále na sever, kde docházelo k jejich adaptaci na tamní životní podmínky. Tím vznikaly izolované populace s novými kombinacemi vlastností. Po nástupu doby ledové se vysokohorské i severské druhy stěhovaly zpět do nižších nadmořských výšek a dále k jihu. Tak mohly vznikat sekundární i primární

kontaktní zóny umožňující četné hybridizace a následně i vznik polyploidních linií. Po skončení poslední doby ledové postupovaly druhy opět na sever. Výše popsanými jevy je vysvětlováno tak vysoké zastoupení polyploidů na severní polokouli. Navíc jejich procento stoupá s rostoucí zeměpisnou šířkou. Důkazem je velké procento polyploidů vyskytujících se v arktické floře (Dynesius & Jansson 2000; Brochmann et al. 2004).

2.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie se jeví jako vhodná metoda pro analýzu rostlinného genomu, zvláště pak v případě polyploidů. Díky této jednoduché a rychlé metodě je možné snadno identifikovat například diploidně-polyploidní populace, prostorovou distribuci jednotlivých cytotypů, jejich absolutní obsah jaderné DNA a reprodukční mód (Doležel et al. 2007). Nicméně problémy mohou nastat při hodnocení jednotlivých plodných úrovní, neboť získaná data nemusejí být korelována s očekávanými chromosomovými počty. Proto je v některých případech důležité doplnit cytometrickou analýzu o výsledky z klasických karyologických technik. I přes tuto nevýhodu je průtoková cytometrie v současnosti jednou z nejběžnějších metod využívaných při studiu polyploidů (Suda et al. 2006).

2.2.1 Vývoj průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie je průlomovou metodou v oblasti analýzy jaderného genomu. První cytometr byl sestaven v USA v průběhu druhé světové války za účelem detekce bakterií v aerosolech používaných při biologických útocích. Byl vyvinut v laboratoři Jr. Guckera ve čtyřicátých letech 20. století. Unášecím médiem byl tehdy proud vzduchu, který vzorek unášel do černého pole mikroskopu. Buňky nebyly specificky barveny, pouze procházely skrz systém rozptýleného světla a čoček. Takto mohly být detekovány částice o velikosti 0,5 μm . Postupně jak docházelo k vývoji jednotlivých částí přístroje, rozšiřovalo se i spektrum jeho využití. Průlomový byl vývoj hydrodynamické fokusace a tudíž i zavedení tekutiny jako unášecího média vzorku. Tuto techniku zavedl Crosland-Taylor v roce 1953. Postupně byla průtoková cytometrie zavedena do humánní medicíny, kde se využívala k počítání krevních částic. Dalším průlomovým krokem bylo využití fluorescenčního barvení, ke kterému se přistoupilo v první polovině šedesátých let. Tímto způsobem mohly být odlišeny bezjaderné buňky od ostatních krevních částic. Jako barvivo se využívala akridinová oranž. V uvedeném období byla hned dvěma laboratořemi vyvinuta a zavedena metoda umožňující třídění buněk

(Fulwyler – Los Alamos, NM, USA; Kamensky – IBM). S vývojem průtokové cytometrie se zlepšovala kvalita analýzy, dostupnost a využitelnost pro jiné oblasti než medicíně a armádě. V současné době si tato metoda našla uplatnění v rozmanitých oborech počínaje už zmiňovanou medicínou nebo imunologií až po botaniku či zoologii. Pomocí průtokové cytometrie je možné nejen třídit buňky, ale i například jednotlivé chromosomy, stanovovat obsah DNA či RNA v jedné buňce nebo sledovat průběh buněčného cyklu (Shapiro 2007).

2.2.2 Princip průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda umožňující měřit optické vlastnosti (fluorescenci, rozptyl světla) izolovaných částic jako jsou buňky, jádra buněk nebo chromosomy. Základem průtokového cytometru je pět operačních jednotek. Jedná se o světelný zdroj (laser, oblouková lampa), průtokovou komůrku a fluidický systém, optický systém (čočky, zrcadla, filtry), zařízení pro zpracování signálu (fotodetektory, konvertory) a počítač pro zpracování dat (Suda 2004).

Suspenze částic, které jsou fluorescenčně značeny, je přiváděna do průtokové komůrky vyplněné unášecí tekutinou. Tou bývá v tom nejjednodušším případě deionizovaná voda. Zde se uplatňuje hydrodynamická fokusace. Unášecí tekutina je do komůrky hnána pod větším tlakem než suspenze. Následkem zrychlení v oblasti výtokového otvoru komůrky se mohou částice pohybovat pouze v centrální oblasti vodního paprsku, čímž je zajištěno, aby ohniskem excitačního světla procházely v tom ideálním případě po jedné. Vlnová délka světelného zdroje je zvolena tak, aby odpovídala excitační hladině použitého fluorescenčního barviva. Při průchodu obarvené částice skrz ohnisko excitačního paprsku dojde jednak k emisi fluorescence, ale pak také k rozptylu světla. Fluorescence emitovaná barvivem je snímána objektivem, za nímž se nachází soustava optických filtrů, které brání proniknutí excitačního světla a při použití více typů barviv umožňují analyzovat fluorescenci každého barviva odděleně. Za pomoci fotonásobičů jsou pulzy fluorescence měněny na pulzy elektrického proudu, které jsou následně zesilovány lineárními nebo logaritmickými zesilovači. Poté jsou elektrické signály převedeny do počítače a zpracovány. Výstupem je histogram distribuce intenzity fluorescence. Samotný průběh analýzy vzorku pomocí průtokové cytometrie je velmi rychlý a snadný. Přístroj je schopen zpracovat signál z více než tisíc částic za sekundu, takže samotné měření trvá v řádech minut. I samotná příprava vzorku pro analýzu není nikterak obtížná a navíc pro jeho přípravu je zapotřebí velmi malé množství studovaného materiálu, cca 20 mg (Doležel et al. 1997).

Nejčastěji používaná fluorescenční barviva jsou propidiumjodid, ethidiumbromid, DAPI, Hoechst, mitramycin, chromomicin a olivomycin. Jedná se o tři skupiny barviv, která se od sebe liší způsobem vazby na DNA, čehož bývá využíváno k odlišení různých typů chromosomů a jejich oblastí (Doležel et al. 1997; Suda 2004).

2.2.3 Stanovení DNA ploidní úrovně

Protože obsah jaderné DNA v G1 fázi buněčného cyklu buňky je odrazem její ploidní úrovně, je možné měření obsahu jaderné DNA využít ke stanovení ploidie. Vše je založeno na předpokladu, že poloha vrcholu na ose X je úměrná obsahu DNA v jádře a plocha píku je úměrná relativnímu počtu jader daného obsahu DNA. Vztah mezi úrovní ploidie a velikostí jaderného genomu je dán následovně: monoploid (1x) odpovídá 1C DNA, diploid (2x) odpovídá 2C DNA, triploid (3x) odpovídá 3C DNA a tak dále dle vzrůstající ploidie. Hlavní výhody této metody jsou rychlost, přesnost a snadnost. Navíc je to metoda nedestruktivní s využitím velmi malého množství rostlinného materiálu, který je dostačující k analýze velkého počtu buněk (Suda 2004).

Kvalitu měření pak odráží tzv. variační koeficient (CV) vrcholu (píku). Standardně se pohybuje v rozsahu od 1 % do 10 % procent v závislosti na vzorkovém materiálu, jeho přípravě a použitém fluorochromu. Pokud jeho hodnota přesahuje hranici deseti procent, je výsledek analýzy již dosti nepřesný, neboť čím menší je CV, tím menší rozdíl v obsahu DNA je možné zachytit. To znamená, že pokud má variační koeficient hodnotu 3 %, tak lze s jistotou detekovat rozdíl v obsahu jaderné DNA na úrovni 6 %. V případě, že se dva vzorky od sebe liší o méně procent, není již možné je od sebe rozpoznat (Doležel et al. 1997; Suda 2004).

2.2.4 Analýza reprodukčního modu (Flow cytometry seed screen - FCSS)

Tuto metodu poprvé představil Matzk et al. (2000) jako vhodnou cestu k identifikaci typu generativního rozmnožování u semenných rostlin. Vychází z principu dvojitého oplodnění, které je typické pro vyšší rostliny. Způsob rozmnožování tak může být identifikován na základě porovnání ploidní úrovně dvou základních tkání dormantních semen. Tak například o semenech, která mají jaderný obsah DNA embrya 2C a endospermu 3C lze říci, že vznikla jako produkty sexuálního rozmnožování. V případě 1C nebo 2C embrya v kombinaci s 3C, 4C nebo 5C endospermem vznikla semena parthenogenetickou cestou.

Obsah jaderné DNA embrya i endospermu je možné rozlišit za pomoci průtokového cytometru. Na základě poměru vzdáleností mezi oběma vrcholy lze identifikovat, zda semena vznikla sexuální nebo apomiktickou cestou. V rámci apomixie je možné rozlišit některé z jejich typů, jako je například pseudogamie, nebo aposporie. Problém nastává ve chvíli, kdy mají dva typy rozmnožování shodné poměry v obsahu jaderné DNA embrya a endospermu, např. autonomní apomixie a sexuální rozmnožování u *Arnica cordata* (Kao 2007). V takovém případě je prakticky touto metodou nelze odlišit a je nutné přistoupit k jiným metodám. Problém nastává i v případě, když jsou touto metodou studovány druhy, jejichž endosperm má velmi malé množství buněk nebo v případě, kdy je endosperm spotřebován v relativně krátkém čase tak, jako tomu je například u druhů z čeledi *Asteraceae*. Další nevýhodou je, že při analýze většího množství semen v jednom vzorku mohou zůstat některé ze vzácnějších kategorií rozmnožování neodhaleny (Krahulcová & Suda 2006; Matzk 2007).

2.3 *Allium oleraceum* L. – objekt studia

2.3.1 Taxonomické zařazení a rozšíření

Podle posledních molekulárních studií je druh *Allium oleraceum* L., česnek planý (sekce *Codonoprasum* REINCHENB.), řazen do rodu *Allium*, podčeledi *Allioideae*, čeledi *Amaryllidaceae*, řádu *Asparagales* a třídy *Monocotyledonae* (APG III. 2009). Podle starších taxonomických prací tvořil rod *Allium* samostatnou čeleď *Alliaceae* (APG 1998). Tomuto původnímu zařazení dává dosud řada botaniků přednost.

Allium oleraceum je běžný evropský druh s eurosoukontinentálním areálem sahajícím od Britských ostrovů (Stewart et al. 1994) a Skandinávie (Jalas 1965; Malmgren 1982; Lid 1987) po středomoří a Kavkaz (Meusel et al. 1965).

V České republice patří *Allium oleraceum* k nejčastěji se vyskytujícím druhům z rodu *Allium*. Tento taxon roste od nížin do pahorkatin (200 – 600 m n. m.) a velmi vzácně pak i ve vyšších nadmořských výškách (Bílé Karpaty, 908 m n. m.). Jeho nejčastějšími stanovišti jsou listnaté lesy, křoviny, skály, otevřená slunná stanoviště i okraje polí, často společně s *Allium vineale*. S tímto druhem je, zvláště ve sterilním stavu, velmi snadno zaměnitelný (Duchoslav 2001).

2.3.2 Popis

Allium oleraceum je geofyt s jednoletým zásobním orgánem. Tím je cibule, která dosahuje 10 až 15 mm v průměru a je obalena blanitou šupinou. U rostlin vytvářejících květonosnou lodyhu je na konci růstové sezony stará cibule nahrazována novou tzv. hlavní výhonkovou cibulí. Lodyha je 25 až 100 cm vysoká a více jak z poloviny obalena pochvami listů. Listy jsou 0,5 – 4 mm široké, čárkovité až nitkovité na rubu žebnaté v počtu 1 – 4 vyrůstajících z jedné cibule. Květenství je až do doby zralosti ukryto ve dvouklaném toulci, jenž je tvořen dvěma nestejně dlouhými zašpičatělými cípy, které v době květu zůstávají zachovány. V lichookolíku převažují pacibulky. Jedná se o vegetativní orgány, kterých v jednom květenství může být až několik set. Strukturou se podobají na stroužek česneku kuchyňského (*Allium sativum* L.). Na řezu je dobře rozeznatelný dužnatý list obalující jemný puk. Pacibulky slouží jako kompenzační mechanismus při selhání generativního rozmnožování. Počet květů v květenství je různý. Pohybuje se od nuly až po desítky zelenavých až špinavě červenofialových květů. Tyčinky se žlutavě zbarvenými prašníky jsou kratší nebo stejně dlouhé jako široce zvonkovité okvěti. Semeník je obvejčitý a trojpouzdrý se dvěma vyvinutými vajíčky v každém pouzdře. Plodem je tobolka. Kromě semen a pacibulek produkují rostliny také dceřiné cibule dorůstající do samostatného jedince (Dostál 1989; Konvička 1998; Duchoslav 2000, Krahulec & Duchoslav *in press*).

Allium oleraceum tvoří polyploidní komplex se základním chromosomovým číslem $x = 8$. V rámci Evropy jsou známy čtyři ploidní úrovně, přičemž triploidní cytotyp ($2n = 24 = 3x$) se vyskytuje s nejmenší frekvencí a je dosud znám pouze z území Maďarska, Ruska a Ukrajiny. Tetra- ($2n = 32 = 4x$), penta- ($2n = 40 = 5x$) a hexaploidní cytotypy ($2n = 48 = 6x$), jsou rozšířeny nerovnoměrně po celé Evropě. Pro Českou republiku jsou udávány tři ploidní úrovně ($4x$, $5x$, $6x$) rostoucí v cytotypově smíšených i homogenních populacích. V přirozených populacích zatím nebyly nalezeny žádné aneuploidní chromosomové počty (Fialová 1996; Krahulcová 2003; Duchoslav et al. 2010).

2.3.3 Původ druhu

Jedna z prvních studií, kterou vypracoval Levan (1933), upozorňuje na nápadnou morfologickou i karyologickou podobnost mezi *A. oleraceum* a *A. carinatum*. Na základě průběhu meiosis, shodného základního chromosomového čísla a podobnosti somatických chromosomů, řadí Levan oba druhy do jedné polyploidní série, kde (dle tehdejších znalostí)

A. oleraceum zastupuje 4x a *A. carinatum* 2x a 3x ploidní úroveň. Nicméně pozdější hybridizační experimenty, které Levan prováděl v rámci okruhu *A. paniculatum*, přinesly křížením dvou diploidních jedinců z geograficky vzdálených populací, označovaných jako různé druhy z okruhu *A. paniculatum*, tetraploidní rostliny morfologicky i karyologicky téměř shodné s *A. oleraceum* (Levan 1937). Tento výsledek donutil Levana přehodnotit jeho původní domněnku o autopolyploidním původu *A. oleraceum*.

Pozdější studie přinesly výsledky neumožňující jednoznačně rozhodnout o cytogenetických vztazích mezi uvedeným druhem a ostatními taxony sekce *Codonoprasum*. Vosa (1976) ve své studii využil metody C-banding k identifikaci míry příbuznosti některých druhů v rámci uvedené sekce. V případě *A. oleraceum* došel k závěru, že jde o allopolyloidní druh s vysokou mírou podobnosti s *A. paniculatum*. Fialová (1996) na základě charakteru metafáze I. pylové meiosis usuzuje na autopolyploidní původ, zároveň však nevylučuje i přítomnost cizího genomu.

Samotný původ druhu je tedy zatím nejasný. V současnosti převažuje názor, že se jedná pravděpodobně o allopolyploida, patrně polyfyletického a polytopického původu (Duchoslav et al. 2010).

2.3.4 Související studie

Jak již bylo uvedeno výše, *Allium oleraceum* představuje polyploidní komplex se čtyřmi známými cytotypy. Ve snaze porozumět mikroevolučním změnám a jejich významu pro uvedený taxon bylo v posledních dvou desetiletích vypracováno již několik studií zabývajících se biologií, ekologií a karyologií tohoto polyploidního komplexu.

Morfologické rozdíly mezi cytotypy studovali Fialová (1996) a Ohryzek (2007). Obecně lze říci, že tetra a pentaploidi vykazují vzájemně vyšší míru podobnosti v některých znacích než je tomu u hexaploidů. Habitus květenství tetraploidního a pentaploidního cytotypu se statisticky významně neodlišoval, jak v počtu květů na jedno květenství, tak ani v počtu pacibulek. Průměrný počet květů na květenství byl u obou cytotypů 11. V případě hexaploidů byla situace poněkud odlišná. Jedinci s tímto cytotypem projevovali menší míru diferenciaci květů a průměrně tvořili jeden květ na květenství. Tetraploidi i pentaploidi mnohdy tvoří květenství obsahující až desítky plně vyvinutých květů. U hexaploidů může zřídka nastat obdobná situace, avšak ve většině případů nesou jen několik málo květů (vlastní pozorování).

Z dalších znaků byla sledována například celková výška rostlin, šířka a délka okvětních lístků nebo velikost průduchů (Ohryzek 2007). Analýza velikosti průduchů ukázala, že

existuje tendence ke zvětšování jejich průměrné velikosti v závislosti na stoupající ploidní úrovni. Avšak signifikantně se od ostatních cytotypů (resp. od 5x a 6x) odlišovali pouze tetraploidi, jejichž průduchy byly v průměru nejmenší. Velmi zajímavá je situace u pentaploidů. Přestože jsou lichými ploidy, dosahují největších rozměrů jak v délce a šířce okvětních lístků, tak i v celkové výšce rostlin. Překvapivě mají i velmi vysokou klíčivost semen. Nejmenšího vzrůstu pak dosahují hexaploidi (Ohryzek 2007).

Fialová (2005) se ve své práci zabývá reprodukční biologii a mírou úspěšnosti v přežívání vegetativního a generativního potomstva. Podařilo se prokázat, že jedinci vypěstovaní z pacibulek přežívají mnohem lépe nežli semenáčky. Zároveň byl patrný trend, kdy se se zvyšující se ploidií mateřských rostlin snižovala schopnost přežívání rostlin vypěstovaných ze semen. U pacibulek tomu bylo právě naopak. Celkově se rozmnožování pomocí vegetativních propagulí jevílo jako efektivnější strategie. Svědčí o tom i fakt, že rostliny získané z pacibulek rostou rychleji a jsou schopny produkovat vlastní potomstvo již v prvním roce jejich života. Fialová (2005) to vysvětluje tím, že jedinci vypěstovaní z pacibulek mají větší množství zásobních látek v cibulce. To jim dává strategickou výhodu oproti semenáčkům, neboť ty musejí na začátku svého růstu spoléhat pouze na fotosyntézu. Jedinci pocházející z pacibulek tak mnohem dříve dosáhnou tzv. kritické velikosti biomasy (Dafni et al. 1981), díky čemuž může být odstartována tvorba květenství i dceřiných cibulí.

Jírová (2007) sledovala květní fenologii jednotlivých cytotypů *Allium oleraceum*. Podle prezentovaných výsledků dosáhli svého fenologického optima nejdříve tetraploidi následovaní pentaploidy a nakonec hexaploidy. Přestože u hexaploidů začínala fáze kvetení nejpozději ze všech cytotypů, kvetli nejkratší dobu. I přes rozdíly v délce a době kvetení dochází k výraznému překryvu této fáze u všech cytotypů, což skýtá potenciál pro možné mezicytotypové křížení. Pro stanovení fertility pylových zrn sledovala Jírová klíčivost pylu. Ta se pohybovala okolo 22 % u tetraploidů, 23 % u pentaploidů a 31 % u hexaploidů. Fialová (1996) sledovala fertilitu pylových zrn za pomoci acetokarmínových testů. Její výsledky se významně odlišovaly od výše uvedených hodnot a to zvláště v případě tetraploidního cytotypu, kde byla průměrná barvitelnost pylových zrn okolo 67 %. Pro pentaploidy byla tato hodnota spočítána na 30 %, hexaploidy autorka nestudovala. Fialová rovněž studovala charakter a průběh mikrosporogeneze u tetraploidního a pentaploidního cytotypu. I přes výraznou nepřehlednost a nepravidelnost metafáze I. zjistila, že pylové mateřské buňky tetraploidů obsahovaly různé kombinace univalentů, bivalentů a multivalentů. Podobná situace nastala i v případě druhého studovaného cytotypu (5x), kde kromě uvedených konfigurací zaznamenala i chromosomální mosty a opožděné chromozomy v průběhu anafáze

I. Na základě těchto zjištění uvažovala o možné existenci aneuploidních chromosomových počtů. Tuto domněnku se jí podařilo potvrdit nálezem dvou aneuploidních jedinců mezi čtyřmi semenáčky, které byly vypěstovány ze semen pentaploidních rostlin.

Distribuce a ekologická diference jednotlivých cytotypů na území České republiky byla studována v pracích Duchoslav et al. (2010) a Šafářová & Duchoslav (2010). V rámci studovaných populací představují pentaploidi převládající polyploidní typ vyskytující se v populacích jak samostatně, tak i v kombinaci se všemi ostatními cytotypy. Bylo zjištěno, že až 77 % z celkového počtu studovaných populací (325 populací) je tvořeno pouze jedním cytotypem. Ve zbylých případech se jednalo o populace tvořené z kombinací dvou (22 %) a velmi vzácně všech tří (1%) ploidních úrovní. Je zajímavé, že některé typy smíšených populací ($4x + 5x$ a $5x + 6x$) jsou velmi neobvyklé a pokud uvažujeme *in situ* vznik nových cytotypů v tzv. primárních zónách (*sensu* Petit et al. 1999), tak i obtížně vysvětlitelné. Tyto smíšené populace se vyskytují sympatricky s uniformními populacemi participujících cytotypů, a navíc se tyto smíšené populace vyskytují převážně na lokalitách s heterogenním prostředím. Tento fakt umožňuje uvažovat spíše o možné existenci sekundárních kontaktních zón. Zároveň zde autoři vyslovili i domněnku o existenci primárních kontaktních zón v místech sympatrického výskytu smíšených $4x + 6x$ a uniformních $4x$ populací. Tuto úvahu podporuje fakt, že hexaploidi jsou pravděpodobně velmi mladý cytotyp (je znám z České republiky, Rakouska a Španělska), který vznikl s největší pravděpodobností splynutím redukovaných a neredukovaných gamet v tetraploidních populacích. Šafářová & Duchoslav (2010) nicméně připouštějí, že pozorovaná cytotypová struktura populací *A. oleraceum* může odrážet i méně pravděpodobné procesy, mj. generování cytotypové variability pentaploidními rostlinami.

S ohledem na výše popsané výsledky (Fialová 1996; Šafářová 2004; Fialová 2005; Ohryzek 2007; Jírová 2007; Duchoslav et al. 2010; Šafářová & Duchoslav 2010) vyvstalo hned několik otázek. Jaký význam má generativní potomstvo pro cytotypovou kompozici populací a může docházet k opakované formaci jednotlivých cytotypů? Jak funguje koexistence cytotypů ve smíšených populacích? Jak silně působí selekce proti atypickým chromosomovým počtům? Možné odpovědi měla naznačit má bakalářská práce, zabývající se prvními výsledky studia karyologické variability generativního potomstva *Allium oleraceum* (Jandová 2008). Na vzorku celkem 163 semenáčků, napěstovaných ze semen pocházejících z cytotypově smíšených i homogenních populací, se podařilo prokázat existence variability v jejich ploidní úrovni. Zejména v případě potomků pocházejících od pentaploidních mateřských rostlin byly zjištěny semenáčky tří ploidí ($4x$; $5x$; $6x$). Dále pak z průběhu klíčení

vyplývalo, že přestože mají pentaploidi více abortovaných semen než ostatní cytotypy, je procento vyklíčených semen a přežívajících semenáčků dokonce o něco vyšší než u tetraploidů. Tyto výsledky jsou překvapující, neboť pentaploidní rostliny jakožto lichý cytotyp by měly mít značné problémy s průběhem meiotického dělení, což by se mělo projevit na snížení jejich fertility. Velmi zajímavě působí i fakt, že ačkoliv je generativní potomstvo pentaploidů cytotypově variabilní, neodráží se tato variabilita v kompozici přírodních populací. Kao (2007) se zabývala podobnou situací u polyploidního druhu *Arnica cordifolia*. Porovnávala květní fenologii, reprodukční mód a produkci semen u dvou ploidních úrovní (3x a 4x). Podobně jako v případě 4x a 5x ploidních úrovní *A. oleraceum* produkoval lichý i sudý cytotyp srovnatelné množství květů i semen, jejichž počet koreloval s počtem jednotlivých květů. Průtoková cytometrie odhalila přítomnost 5x a 6x cytotypů mezi semeny, avšak ne mezi semenáčky. Zároveň se za pomoci uvedené metody podařilo identifikovat způsob rozmnožování, kterým je převážně fakultativní pseudogamní apomixie. Výskyt 5x a 6x cytotypů mezi semeny Kao (2007) připisovala na vrub zbytkové sexuality. Zjištěná asexuální reprodukce je pravděpodobně hlavním činitelem umožňujícím koexistenci cytotypů ve smíšených populacích *Arnica cordifolia*.

Bakalářská práce tedy ještě více poukázala na potřebu dalšího podrobnějšího studia, zvláště pak co se týká způsobu generativního rozmnožování a působení selekčních mechanismů v časných vývojových stádiích generativních potomků.

3. CÍLE STUDIA

Jak již bylo zmíněno v úvodu, první výsledky poukazují na existenci cytotypové variability v rámci generativního potomstva. Proto jsem se zaměřila na:

1. Studium cytotypové kompozice generativního potomstva s ohledem na ploidní charakter rodičovských rostlin v populacích (tj. populace cytotypově homogenní a smíšené). Zastoupení jednotlivých cytotypů bylo sledováno na čtyřech ontogenetických úrovních, tj. mateřská rostlina, semeno, semenáček a dospělá rostlina.
2. Díky záměru popsaném v předchozím bodě byla získána informace o intenzitě selekce působící v časných vývojových stádiích generativního potomstva, tj. na úrovni semen, klíčení, přežívání semenáčků a později i u dospělých rostlin.

3. Zastoupení jednotlivých ploidních úrovní mezi semenáčky a uvnitř rodičovských populací je možné využít ke zhodnocení významu generativního rozmnožování pro cytotypovou variabilitu studovaných populací.
4. Zjištěná variabilita poukazuje na možnost existence aneuploidních cytotypů. Proto je nutné tuto možnost prověřit za pomoci klasických karyologických technik (mitosa kořenových špiček).
5. V závislosti na schopnosti všech ploidních úrovní produkovat nemalé procento životaschopného generativního potomstva (zvláště pak v případě pentaploidů) je nutné prověřit možnost existence agamospermie u studovaného druhu.

4. METODIKA

4.1 Rostlinný materiál

Na území České republiky bylo vybráno celkem 27 populací *A. oleraceum*, cytotypově smíšených či homogenních (= uniformních). Samotný výběr populací proběhl na základě dat z předchozí studie (Šafářová 2004) a vlastních nových nálezů. Populace byly zvoleny tak, aby byly zastoupeny všechny možné kombinace cytotypů (tab. 1; obr. 1).

4.1.1 Cytotypové složení populací

Za účelem ověření cytotypové kompozice byl proveden podrobný skrínink populací. Ten byl uskutečněn na jaře 2010 u 13 z celkem 27 populací. Ve zbylých případech byl skrínink buď již proveden v předchozích studiích (Šafářová 2004; Duchoslav et al. 2010; Šafářová & Duchoslav 2010), nebo bude ještě doplněn v následujícím roce (tab. 1 a obr. 1).

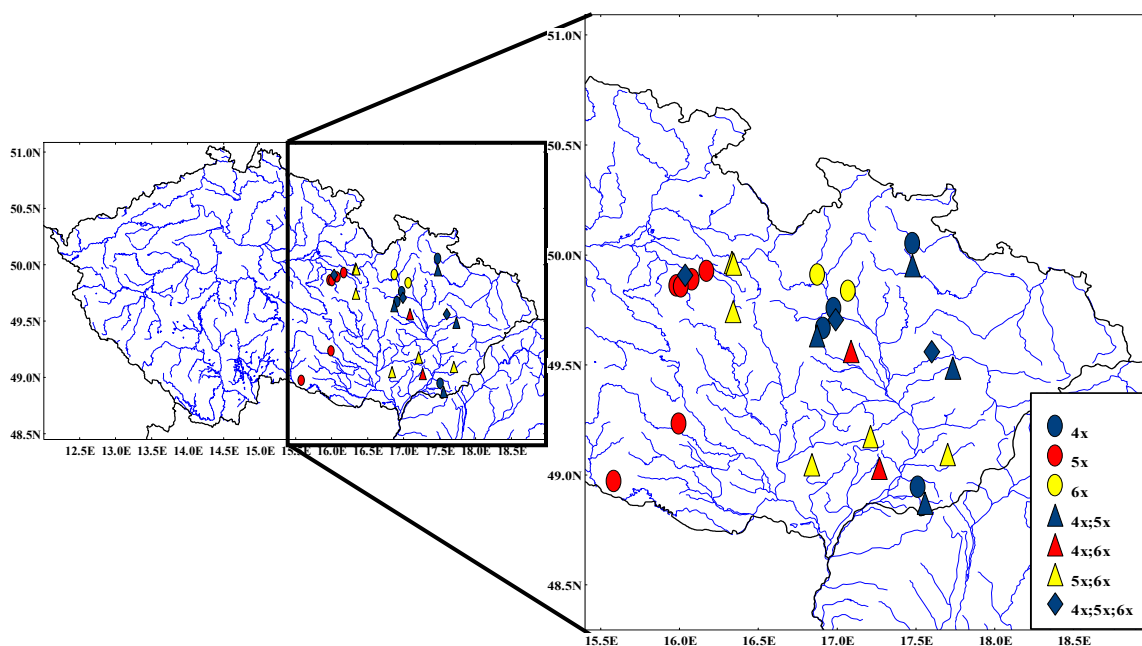
Na lokalitě proběhl plošný odběr listů jedinců *A. oleraceum*. Aby nedošlo ke zkreslení výsledků vlivem lokální cytotypové homogenity v důsledku vegetativního rozmnožování (viz Duchoslav et al. 2010), nebyli odebíráni jedinci v těsné blízkosti. Každý odebraný jedinec představoval jeden vzorek a počet odebraných rostlin odrážel velikost jednotlivých populací. U odebraných vzorků proběhlo stanovení jejich ploidní úrovně za pomoci průtokového cytometru (kap. 4.5). Počet změřených rostlin na populaci se pohyboval v rozsahu 12 – 100 rostlin.

Tab. 1. Seznam lokalit, ze kterých byl odebírán rostlinný materiál (* ...Šafářová 2004, jinak vlastní odhad).

Číslo populace	Ploidie populace	Velikost populace	Obec	Popis	Stanoviště	Nadmořská výška	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Rok sběru propaguli
1	4x	100-300	Moravičany	PR Doubrava, subxerothermní doubrava nad hájovnou, u řeky Moravy	les	299	49°45'25''	16°58'42''	2007; 2009
2	4x	300-500	Březina	PR Špraněk - skály	skála	470	49°40'0''	16°54'40''	2009
3	4x	10-50*	Široká Niva	stráň pod silnicí - sv. <i>Arrhenatherion</i>	louka	450	50°3'6''	17°28'43''	2006
4	4x	> 500	Blatnička	stepní porost, sv. <i>Bromion</i>	step	253	48°56'40''	17°30'48''	2008
5	5x	> 500*	Příbylov	opuková suť a stepní porost, sv. <i>Bromion</i>	step	356	49°51'35''	15°58'54''	2006; 2007; 2009
6	5x	> 500*	Džbánov	ruderální porost, železniční násep	žel. násep	293	49°55'34''	16°10'22''	2009
7	5x	10-50*	Sřemošice	opuštěná pastvina, stepní stráň sv. <i>Bromion</i>	step	380	49°53'17''	16°4'47''	2008
8	5x	100-300	Štěpánov	stepní porost, sv. <i>Bromion</i> , J až JZ svah	step	395	49°51'20''	16°0'39''	2008
9	5x	100-300	Bačkovice	stepní stráňka, fragmenty stepních porostů s <i>Festuca vallesiaca</i> a <i>Salvia nemorsa</i> , zarůstá trnkami	step	435	48°58'14''	15°35'4''	2009
10	5x	300-500*	Smrk	kamenitá stráňka a řídký akátový les, SZ od obce	akátina - mez	469	49°13'55''	15°59'49''	2006; 2009
11	6x	> 500	Nová Hradečná	mez u nádraží, ruderalní porost	mez	280	49°50'9''	17°4'12''	2008
12	6x	300-500	Rovensko	mez u pole	mez	305	49°54'34''	16°52'36''	2008; 2009
13	4x; 5x	> 500	Ludmírov	vápencové stráňky s <i>Festuca rupicola</i> , paseno	step	500	49°37'54''	16°52'21''	2006; 2008

Číslo populace	Ploidie populace	Velikost populace	Obec	Popis	Stanoviště	Nadmořská výška	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Rok sběru propaguli
14	4x; 5x	100-300*	Venušina sopka	luční porost pod lesem	louka	645	49°57'2''	17°28'43''	2007
15	4x; 5x	300-500*	Suchov Jazevčí	PR Jazevčí - okraje stepních porostů, sv. <i>Bromion</i>	step - křovina	350	48°52'19''	17°33'28''	2008
16	4x; 5x	> 500*	Opatovice	ruderalizovaný švestkový sad, porosty svazu <i>Arrhenatherion</i>	louka	350	49°29'5''	17°44'5''	2007
17	4x; 6x	> 500	Slatinice	ovsíková louka	louka	270	49°33'38''	17°5'19''	2006; 2007; 2008; 2009
18	4x; 6x	300-500	Syrovín	louka sv. <i>Arrhenatherion</i> zarůstající trnkovými křovinami přecházejícími v akátinu	louka	292	49°1'46''	17°16'6''	2006
19	5x; 6x	300-500*	Bošovice	stepní porosty a akátina, sv. <i>Bromion</i>	louka	600	49°2'45''	16°50'25''	2006; 2008
20	5x; 6x	> 500*	Květná	suché stráňky zarůstající křovinami, přecho sv. <i>Bromion</i> - <i>Arrhenatherion</i>	step	551	49°44'32''	16°20'25''	2006
21	5x; 6x	> 500	Biskupice	trnkami zarůstající švestkový sad, sv. <i>Bromion</i>	step	241	49°5'31''	17°42'5''	2008
22	5x; 6x	300-500	Hrádek	křoviny a louka, okraj pastviny	pastvina	410	49°57'55''	16°19'56''	2009
23	5x; 6x	100-300	Řetůvka	mez na kraji obce, ruderalní porost, J až JZ svah	mez	383	49°57'30''	16°20'39''	2009
24	5x; 6x	300-500*	Lísky	NPR Oulehla - step s <i>Brachypodium pinnatum</i> , křoviny as. <i>Ligustro-Prunetum</i>	step - křovina	289	49°10'29''	17°12'43''	2006; 2007; 2008
25	4x; 5x; 6x	300-500*	Bílá Lhota	PR Třesín, stepní porosty a křoviny	step	300	49°42'19''	16°59'26''	2006; 2008; 2009
26	4x; 5x; 6x	300-500*	Loučka	trnkové křoviny, remíz mezi poli, bývalá švestková alej, ovčíková alej	křovina	299	49°33'36''	17°36'2''	2007
27	4x; 5x; 6x	300-500*	Voletice	křoviny a mladý dubohabrový les, porosty sv. <i>Bromion</i>	křovina	340	49°54'27''	16°2'9''	2007

Obr. 1. Mapa lokalit, ze kterých byl odebírán rostlinný materiál (4x: číslo lokality 1 – 4; 5x: číslo lokality 5 – 10; 6x: číslo lokality 11 – 12; 4x 5x: číslo lokality 13 – 16; 4x 6x: číslo lokality 17 – 18; 5x 6x: číslo lokality 19 – 24; 4x 5x 6x: číslo lokality 25 - 27).



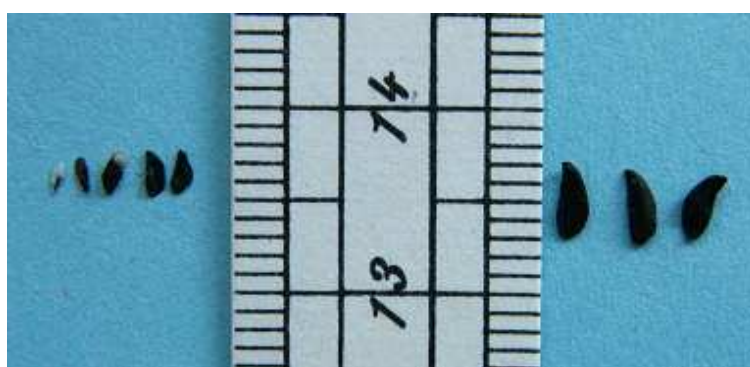
4.1.2 Sběr propagulí

Rostlinný materiál (semena a pacibulky) použitý pro účely této práce pochází z terénních sběrů, které proběhly vždy koncem srpna a začátkem září v letech 2006 až 2009 na území České republiky. Z celkem 27 cytotypově smíšených nebo homogenních populací (tab. 1 a obr. 1) byly odebrány lodyhy generativních jedinců, které byly ve fázi dozrávání semen a pacibulky byly již zralé, těsně před opadáváním. Při sběru byla lodyha odštířena těsně nad zemí a květenství převázáno sáčkem z netkaného materiálu, aby nedocházelo ke ztrátám propagulí. Z každé populace byl odebírán nestejný počet vzorků, neboť z důvodů různého počtu generativních jedinců a variabilního množství semen v každém lichookolíku nebylo možné velikosti vzorků sjednotit. Počty nasbíraných rostlin na populaci se pohybovaly v následujícím rozsahu: sběry 2006 12 – 53 kvetoucích jedinců; sběry 2007 25 – 103 kvetoucích jedinců; sběry 2008 4 – 58 kvetoucích jedinců; sběry 2009 2 – 86 kvetoucích jedinců.

V laboratoři se rostliny umístily do nádob s vodou, aby semena mohla dozrát. Po dozrání (cca 1-2 týdny) byla květenství rozebrána na jednotlivé části (tj. pacibulky, květy, semena), po jejichž spočítání byly semena i pacibulky uloženy do papírových sáčků s kódem označujícím populaci a číslo rostliny, ze které byly propagule odebrány. Zvlášť byla počítána

semena nedovyvinutá neboli abortovaná (tj. malá, svraskalá, křehká a s nedovyvinutým osemením; dále se neuchovávala; obr.2) a zdravě vypadající (obr.2). Podobně byly hodnoceny i jednotlivé květy. Jako neabortované květy byly označeny ty které neměly zdeformovaný vzhled, nebyly seschlé a obsahovaly semena bez ohledu na jejich kvalitu. Abortované květy byly ty, které byly nedovyvinuté, seschlé a neprodukovaly žádná semena (obr. 3). Každý papírový sáček obsahoval propagule z jednoho lichookolíku. Takto zpracované vzorky byly uskladněny v papírové krabici a ponechány při pokojové teplotě do doby dalšího zpracování.

Obr. 2. Na obrázku jsou znázorněny dvě kategorie, do kterých byla rozdělena semena po rozebrání jednotlivých lichookolíků (tj. abortovaná semena = na obrázku vlevo; neabortovaná semena = na obrázku vpravo).



Obr. 3. Na obrázku jsou znázorněny dvě kategorie, do kterých byly rozděleny květy po rozebrání jednotlivých lichookolíků (tj. * ...abortované květy ; neabortované květy = ostatní květy na obrázku).



4.2 Klíčení semen

Semena ze sběrů 2006 – 2009 byla podrobena experimentu, který měl stanovit jejich klíčivost. V letech 2006 a 2007 byla experimentu podrobena všechna zralá nasbíraná semena. V letech 2008 a 2009 byly sběry generativních propagulí rozděleny na dva soubory. Z každé populace byl vybrán různý počet jedinců (viz výše) a to tak, aby počet semen na populaci byl

v každém souboru přibližně stejný. Jeden ze souborů byl použit v tomto experimentu a druhý posloužil jako vzorek pro průtokovou cytometrii (kap. 4.6).

Test klíčivosti probíhal vždy v prvních čtyřech měsících následujícího roku. Výjimku tvořil sběr z roku 2009, kdy bylo klíčení zahájeno již na konci října téhož roku a jeho ukončení proběhlo v polovině ledna 2010. Pacibulky, jakožto klonální propagule geneticky i karyologicky shodné s mateřskou rostlinou, sloužily jako kontrola ploidní úrovně mateřských rostlin.

Před začátkem experimentu byla semena ještě prohlédnuta a nezdravě vypadající odstraněna (tj. abortovaná). Pacibulky a neabortovaná semena byly vyrovnány do plastických krabiček (velikost 4,5 cm x 10 cm a 2,5 cm x 10 cm) omytých silně zředěným roztokem Sava. Roztok měl zamezit okamžitému rozvoji houbových a bakteriálních kolonií napadajících oba typy diaspor. Dno krabiček vyplňovala netkaná textilie, která byla vyprána rovněž v uvedeném dezinfekčním roztoku (příloha 1). Textilie byla navlhčena destilovanou vodou, krabičky uzavřeny, popsány kódem pro daný vzorek a umístěny do lednice, ve které po celou dobu pučení a klíčení panovala stálá tma a teplota 7 °C. Uvedený režim představuje optimální podmínky pro klíčení/pučení propagulí *Allium oleraceum* (Hæggröm & Åström 2004; Ohryzek 2007). Stav a počty vyklíčených/vypučených semen/pacibulek uvnitř krabiček byly kontrolovány v pravidelných intervalech. Dle potřeby byla textilie opakovaně vlhčena destilovanou vodou uchovávanou v lednici společně s krabičkami.

4.3 Tetrazoliový test

Semena, která do doby ukončení germinačního experimentu nevyklíčila, byla podrobena tetrazoliovému testu (též také TTC test). Ten je v běžné praxi používán pro detekci vitality semen. Cílem bylo zjistit, zdali nevyklíčená semena jsou ve fázi dormance nebo jsou mrtvá. Pro účely této práce byl použit čerstvý 1 % roztok 2,3,5-trifenyl tetrazolium chlorid uchovávaný po dobu testu ve tmě v lednici. Roztok byl připraven rozpuštěním 1g uvedené chemikálie ve 100 ml destilované vody (Ellis et al. 1985). Nenaklíčená semena byla přenesena do Petriho misek (průměr 3 cm) a rozříznuta na dvě části. Takto připravené vzorky umožnily proniknout roztoku ke všem jejich tkáním. Do misek bylo přidáno 5 ml roztoku tetrazolia. Jejich následné zabalení do hliníkové folie zamezilo nežádoucímu rozkladu chemikálie v průběhu testu. Semena byla v roztoku ponechána po dobu tří hodin při pokojové teplotě a poté vyhodnocena. Hodnocení probíhalo rozdělením testovaných semen do dvou

skupin dle metodiky uvedené v práci Ellis et al. (1985). Jasně červené zbarvení (karmínově červená) testovaných tkání indikovalo živé buňky. Nezbarvené, částečně obarvené (růžová nebo světle červená) a tmavě červené až hnědé zbarvení detekovalo mrtvou tkáň. Tento test proběhl u semen pocházejících ze sběrů let 2007, 2008 a 2009.

4.4 Napěstování semenáčků, jejich přežívání a kvetení

Propagule z výše popsaného experimentu (kap. 4.2) byly použity jako materiál pro další práci. V průběhu následujících týdnů od započetí experimentu byly naklíčené a napučené propagule (délka kořínku přibližně 1 cm) sázeny do květináčů (velikost 7 x 8 cm a 8 x 8 cm) naplněných směsí zeminy a substrátu (výsevný substrát Profesional, Agro profi Garden) v poměru 1:1 a umístěny do skleníku, který byl v zimních měsících mírně vyhříván. Každý květináč byl označen štítkem s kódem označujícím danou populaci a mateřskou rostlinu, ze které propagule pocházejí. Od každého vzorku se vysazovalo vždy po dvou pacibulkách (pokud byly k dispozici, jinak jen po jedné) společně do jednoho květináče a maximálně dostupný počet semenáčků po jednom na květináč. Semenáčky i rostliny z pacibulek byly napěstovány ve skleníku. V prvním a v každém následujícím roce proběhlo hnojení, a to na konci května přípravkem značky KRISTALON start (AGRO CS a.s., Česká Skalice, 100 % vodorozpustné hnojivo) formou zálivky.

Před přemístěním semenáčků na pozemek byly květináče, u kterých propagule nevytvořily nadzemní část a mohly by tak být považovány za mrtvé, vždy po jednom vysypány a zkontrolovány. Semena totiž mohla místo vegetativních částí vytvořit drobnou cibuli a v této fázi vyčkat příznivějších podmínek pro růst.

Ve všech letech byly květináče přeneseny ze skleníku na pozemek vždy v průběhu června. Před přemístěním napěstovaných semenáčků na pozemek proběhla jeho příprava. V roce 2007 a 2010 (tj. sběry 2006 a 2009) byla sadba umístěna do předem vykopaných čtverců o rozloze cca 1 m x 1 m (v roce 2007; příloha 2A) a 2 m x 1,5 m (v roce 2010) o jednotné hloubce cca 11 cm. Pro zamezení intenzivního růstu nežádoucích rostlin byly čtverce vyloženy černou netkanou textilií (Nohel Garden). Pro sadbu z roku 2008 a 2009 (tj. sběry 2007 a 2008) proběhla příprava pozemku vykopáním brázdy dlouhé cca 15 m (příloha 2B) do které se zatlačilo pletivo (velikost ok 1 x 1 cm). Tento bezpečnostní prvek měl omezit poškození sazenic, které je způsobeno zejména hlodavci. Do připravené brázdy byly přeneseny květináče, které pak tvořily dvě řady. U všech semenáčků byl po dobu dvou sezón od vysazení sledován a zaznamenáván jejich růst (výjimku tvoří sadba ze sběrů roku 2009).

Vždy v polovině června bylo u každého vzorku zaznamenáno, zda došlo k vytvoření nadzemních orgánů. V červenci pak bylo sledováno, kteří jedinci vytvořili květenství. Zároveň s tímto údajem byly zaznamenány (tj. písemně a fotodokumentací) lichookolíky odchyloující se od standardu pozorovaném v dané populaci a cytotypu.

4.5 Stanovení DNA-ploidní úrovně

Pro účely stanovení DNA-ploidní úrovně (Suda et al. 2006) napěstovaných rostlin *Allium oleraceum* byly odebrány z každého jedince zdravé části listů (nejlépe horní konce, cca 5 cm), ty následně uloženy do igelitových sáčků a uchovány do doby měření v lednici. Sběr vzorků a jejich zpracování probíhalo vždy v ten samý den. Vzhledem k biologii daného druhu bylo možné provádět odběr materiálu pro měření v průběhu téměř celého roku. Výjimku tvoří prakticky pouze období mezi červencem a začátkem října, kdy přežívajícím generativním jedincům zasychají listy a veškeré zdroje jsou alokovány do podzemní cibule a reprodukčních struktur. V některých případech však pacibulky nenapučely nebo mladé rostliny časně uhynuly. Avšak i tento problém se podařilo odstranit, a to přímo měřením DNA-ploidní úrovně pacibulek, které jakožto vegetativní propagule mají ploidii mateřské rostliny. Pacibulky byly původně shledány jako nevhodné pro cytometrické zjišťování ploidního stupně (Šafářová L., osobní sdělení), protože většina jejich pletiva je tvořena zásobními buňkami s cukry a signál byl velmi slabý s vysokým CV. Zaměřila jsem se tedy na meristém ukrytý uvnitř obalných zásobních šupin: odstranila jsem obalné zásobní listy a měřila jen vlastní meristém (příloha 3). Pro kontrolu byly měření podrobeny vždy dvě pacibulky/mladé rostliny pocházející z téže mateřské rostliny.

Samotné měření bylo provedeno na průtokovém cytometru značky Partec PAS (Germany) za použití metody vnitřního standardu se známým obsahem DNA – *Triticum aestivum* cv. 'Saxana' $2C = 34,24$ pg - kalibrováno s *Hordeum vulgare* $2C = 10,43$ pg (Doležel et al. 1989). Pšenice byla vyseta na perlit a pěstována ve fytotronu (noc 10°C , den 15°C) a později ve skleníku. Pro účely analýzy se používaly pouze zdravé a čerstvé listy.

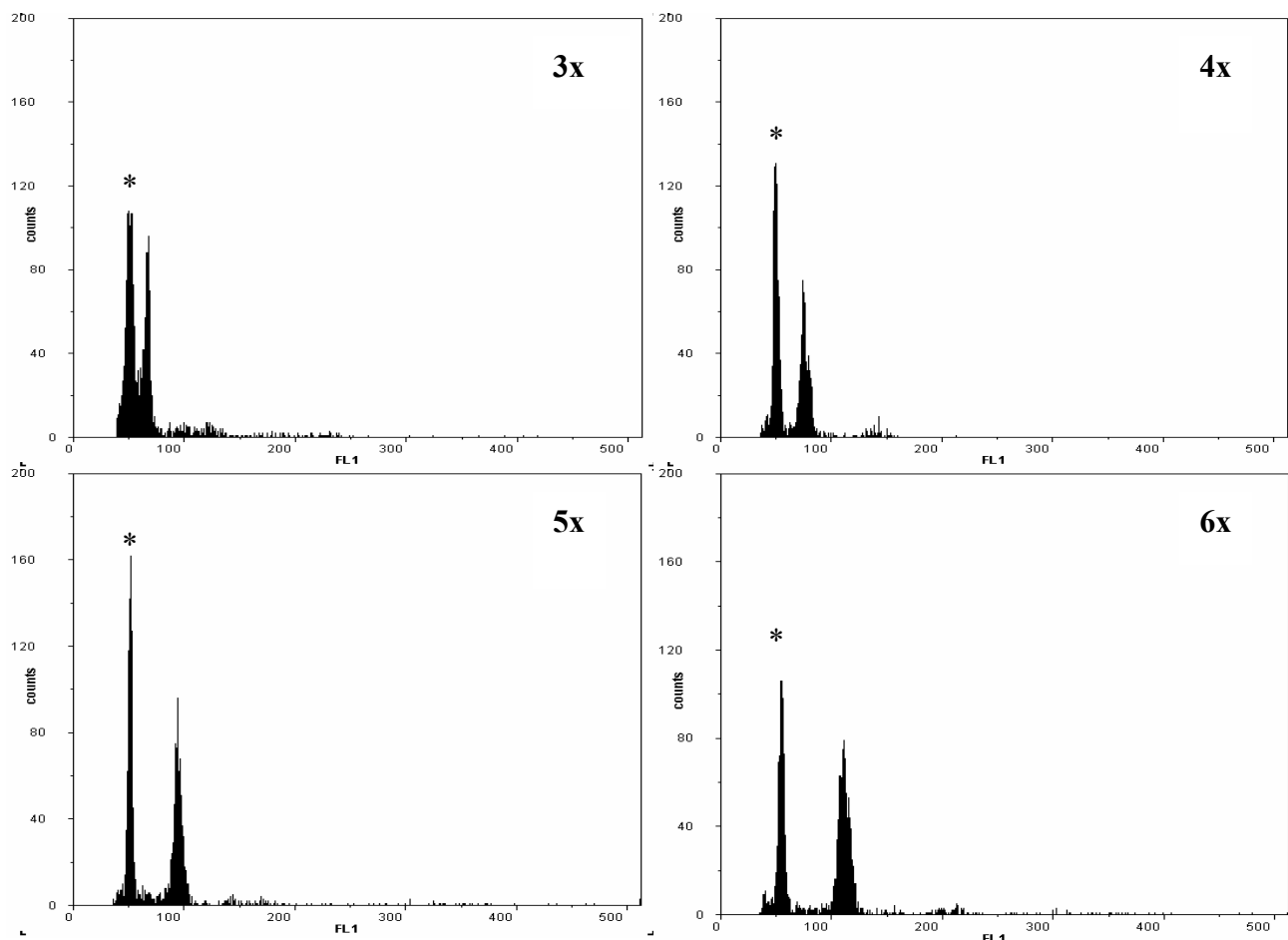
Přibližně 1 cm standardu a stejné množství vzorku bylo společně na Petriho misce nasekáno žiletkou v 1 ml LBO1 pufru o pH 7,5 (Doležel et al. 1994) a přefiltrováno přes nylonový filtr do kyvety. K homogenátu se ihned napipetovalo 50 μl fluorescenčního barviva PI (propidium jodid), které interkalární vazbou na řetězec DNA obarvilo chromosomy.

Na lineární stupnici grafického výstupu (512-kanálová škála) byla hladina ploidie stanovena na základě poměru vzdáleností mezi G1 vrcholy (píky) standardu a vzorku (index). Pík *Triticum* byl nastaven na 50. kanál a pík *Allium*, dle obsahu jaderné DNA, od tohoto bodu na ose vpravo (obr. 4). U každého vzorku bylo změřeno 1 500 – 2 000 jader s CV v rozsahu 3 – 6 %. Pokud rostliny dosahovaly hraničních hodnot pro danou ploidiu, byly znovu přeměřeny o několik dní později a v případě obdobného výsledku připraveny pro karyologii. Pro hodnocení cytotypu studovaných vzorků byla přijata klasifikace dle Šafářové (Šafářová & Duchoslav, in prep.), kdy na základě analýzy hodnot indexů pro rostliny se spočítanými počty chromozómů byly stanoveny následující rozsahy indexů pro jednotlivé ploidní stupně: triploidi se pohybovaly v rozsahu indexů od 1,1 – 1,3; tetraploidi 1,4 – 1,6; pentaploidi 1,8 – 1,9; hexaploidi 2,1 – 2,3. Pro vyšší ploidní úrovně byl odhadován rozsah indexů na základě proběhlých měření (heptaploidi 2,5 – 2,8; oktoploidi od 2,9). Avšak pro tyto vzorky je nutné stanovit počty chromosomů klasickou metodou roztakových preparátů kořenových špiček. To zatím nebylo možné, neboť jedinci s vysokými indexy špatně přežívají.

4.6 Průtoková cytometrie semen

Semena připravená pro analýzu pomocí průtokového cytometru nebyla předem ošetřena a do vzorku byla zpracována celá. Pro stanovení ploidní úrovně embrya a endospermu byly vzorky připravovány stejným způsobem a se stejnými parametry, jaké jsou uvedeny v předchozím odstavci. V případě analýzy reprodukčního modu nebyl do vzorku přidán standard. Poměr mezi polohou píku pro embryo a endosperm posloužil jako indikátor způsobu rozmnožování (Matzk et al. 2000). V roce 2008 byly do jednoho homogenátu rozsekány vždy 2 až 4 semena dle doporučení Krahulcová & Suda (2006). V roce 2009 byla pro větší přesnost odhadu ploidní úrovně měřena semena po jednom. Celkový počet změřených semen na ploidii byl v roce 2008 229 semen pocházejících z 11 cytotypově homogenních i smíšených populací a v roce 2009 313 semen pocházejících z 8 cytotypově homogenních i smíšených populací. Počet změřených rostlin pro analýzu způsobu rozmnožování byl 158 semen pocházejících ze 14 cytotypově smíšených i homogenních populací.

Obr. 4. Grafický výstup z měření průtokového cytometru Partec PAS (Germany). Na ose y je počet analyzovaných částic. Na ose x je 512-kanálová škála, dle které jsou hodnoceny polohy píků. Na 50 kanále je umístěn vnitřní standard (*), na 65 kanále je 3x cytotyp, na 80 kanále je 4x cytotyp, na 95 kanále je 5x cytotyp a na 115 kanále je 6x cytotyp.



4.7 Karyologie – mitosa kořenových špiček

U rostlin, pro něž nebylo možné na základě průtokové cytometrie odhadnout jejich ploidní stupeň, bylo nutné stanovit konkrétní počty chromosomů klasickou metodou roztlačových preparátů (Pazourková & Pazourek 1960). Roztlaky byly připraveny jako trvalé preparáty. Vybraným jedincům byly zastříženy kořeny na délku cca 2 cm. Poté byly rostliny zasazeny do perlitu, kde byly kultivovány po dobu nejméně dvou týdnů.

Odběr kořenových špiček probíhal jednorázově odstřížením kořenů o délce přibližně 2 cm s jejich následným předpůsobením v 0,5 % roztoku kolchicinu po dobu 3 hodin při pokojové teplotě. Po uplynutí stanovené doby byly kořenové špičky propláchnuty v destilované vodě po dobu 5 minut. Poté byly na 24 hodin přeneseny do alkohol-octové fixáže (96 % etanol : ledová kyselina octová v poměru 3 : 1). Fixované kořenové špičky byly

proprány v 96 % etanolu po dobu 5 minut a poté přeneseny do 70 % etanolu, který sloužil jako konzervační činidlo do doby jejich zpracování (Duchoslav et al. 2010).

Kořenové špičky byly opláchnuty v destilované vodě a poté hydrolyzovány 25 minut v 5 N HCl při pokojové teplotě. Po hydrolyze následovalo propláchnutí v destilované vodě a přenesení špiček do Schiffova reagens, kde proběhlo jejich barvení po dobu 30 až 60 minut. Obarvené kořenové špičky byly přeneseny přes vodu do maceračního činidla 45 % kyseliny octové. Samotná macerace probíhala 3 až 5 minut. Přebytná část kořenu byla odstraněna tak, aby na odmaštěném podložním skle zůstala pouze intenzivně zbarvená špička. Roztlak byl proveden v kapce 45 % kyseliny octové a preparát zamrazen na kostce suchého ledu. Poté bylo skalpelem odstraněno krycí sklo a preparát dehydratován 10 minut v 96 % etanolu. Po vysušení byly roztlaky uzavřeny do uzavíracího media značky Euparal. Preparát byl ponechán ve vodorovné poloze do doby zaschnutí uzavíracího média (cca 24 hodin). Takto připravená skla byla mikroskopována a focena na mikrofotografickém systému Olympus DP70.

4.8 Statistické zpracování dat

Veškeré číselné informace získané v průběhu celého experimentu byly zpracovány a převedeny do programu Microsoft Excel. S takto připravenými daty byly provedeny tyto statistické operace v programech Statistica 9.0 (Statsoft Inc.) a NCSS 2000:

Analýza cytotypové kompozice populací s ohledem na zastoupení jednotlivých ploidních úrovní mezi jedinci ve vegetativním stádiu a dospělými fertilními jedinci:

Informace o ploidii získané z průtokového cytometru byly použity pro výpočet frekvence výskytu jednotlivých cytotypů v populacích s ohledem na vegetativní a fertilní stádium. V případě smíšených populací byl vztah mezi zastoupením ploidních hladin v obou ontogenetických stádiích pro jednotlivé populace otestován pomocí Fisherova exaktního testu (pro smíšené populace dvou ploidních úrovní) nebo pomocí kontingenčních tabulek (pro smíšené populace třech ploidních úrovní). Wilcoxonova párového testu bylo využito k otestování, zdali se shodují proporce jednotlivých cytotypů v obou ontogenetických stádiích mezi populacemi pro danou kombinaci cytotypů.

Analýza generativního rozmnožování:

Z údajů o počtech neabortovaných květů, vyprodukovaných semenech a cytotypové kompozice populací bylo možné vyhodnotit závislost mezi množstvím vyprodukovaného generativního potomstva a ploidní kompozicí jednotlivých populací. Za tímto účelem byla data podrobena hierarchické ANOVě s pevným faktorem ploidie a podřazeným náhodným

faktorem populace. Zároveň byla data podrobena i jednocestné ANOVě a to bez ohledu na cytotypovou kompozici populací. Pro hierarchickou ANOVu byly ze souboru odstraněny populace, které měly méně než 4 rostliny na populaci. Naopak v případě jednocestné ANOVy byly použity všechny populace bez ohledu na počty rostlin. Úspěšnost květů byla získána jako podíl mezi počtem neabortovaných semen a neabortovaných květů. Cílem bylo detekovat možné rozdíly ve sledovaných charakteristikách mezi ploidními úrovněmi mateřských rostlin.

Hodnocení životaschopnosti semen:

Data získaná z germinačního experimentu byla zpracována a graficky vyhodnocena v programu Microsoft Excel. Údaje o klíčivosti a dormanci semen pocházejících od mateřských rostlin daného cytotypu byly hodnoceny jednocestnou ANOVou s ohledem na cytotypovou kompozici populací. Před samotnou analýzou byly z dat odstraněny rostliny, které měly méně než 8 vysetých semen. Informace o proporcii klíčivosti a dormanci semen ve smíšených a homogenních populacích byla podrobena dvoucestné ANOVě.

Údaje z průtokové cytometrie semen a semenáčků nebyly statisticky vyhodnoceny, protože frekvence některých produkovaných cytotypů byly nulové či velmi nízké a dále se výrazně lišily velikosti souborů jak mezi populacemi, tak mezi analyzovanými semeny a semenáčky uvnitř populací.

4.9 Seznam použitých zkratk

AS	abortovaná semena
BED	semena u kterých nebyl zaznamenán endosperm průtokovou cytometrií
DS	dormantní semena
F	fertilní rostliny
Fischer	Fisherův exaktní test
FK	fertilní květy
FRP	frekvence rostlin v populaci
FCSS	Flow cytometry seed screen
HP	homogenní populace
K	květy
MR	mateřská rostlina
MS	mrtvá semena

MED	nedostatek endospermu
NAS	neabortovaná semena
NK	neabortované květy
NS	naklíčená semena
P č.	číslo populace
PMR	ploidie mateřské rostliny
PP	ploidie populace
PS	ploidie semenáčků
SE	standardní chyba
SP	smíšená populace
TTC	tetrazoliový test
V	vegetativní rostliny

5. VÝSLEDKY

5.1 Cytotypová kompozice populací

Cílem analýzy bylo zjistit možné rozdíly v cytotypové kompozici populací mezi dvěmi ontogenetickými vývojovými stádii. Sledována byla ploidní úroveň rostlin ve vegetativním stavu a později u dospělých jedinců, kteří vyprodukovali alespoň jedno semeno. Generativní potomstvo těchto rostlin bylo použito v dalších níže popsaných experimentech. Do této analýzy nebyly zahrnuty všechny sledované populace, neboť pro některé chybějí data. Ta budou doplněna v následující sezóně.

V tab. 2 a 3 jsou uvedeny souhrnné hodnoty pro populace stejného ploidního složení a v příloze 4 a 5 jsou pak uvedeny výsledky pro jednotlivé populace. V obrázku 5 jsou zobrazeny výsledky pro cytotypově smíšené populace. Z hodnot jasně vyplývá, že cytotyp, který v dané populaci převažuje na vegetativní úrovni později dominuje i mezi fertilními jedinci. Toto zjištění bylo potvrzeno i pomocí Wilcoxonova párového testu (tab. 3), který pro všechny typy smíšených populací vyšel jako nesignifikantní stejně jako testy jednotlivých populací (příloha 5). Vyjímkou byla populace 15, kde byl výsledek pravděpodobně ovlivněn nízkým počtem vzorků, a populace 24.

V tab. 2 je dále prezentována průměrná frekvence cytotypů na úrovni vyprodukovaných květů pro každý cytotyp v populacích daného typu. V obrázku 6 jsou zobrazeny výsledky pro cytotypově smíšené populace. Uvedené hodnoty představují

zastoupení jednotlivých cytotypů v populaci na reprodukční úrovni, neboť to, co může ovlivňovat cytotypové složení populací, je právě množství vyprodukovaných gamet a následně i generativních potomků. Z výsledků je patrné, že ve smíšených populacích s účastí hexaploidů dojde k vychýlení poměru ve prospěch jiného než 6x, většinou dominantního (-ních) cytotypu (-ů). V případě populací 14, 23, 26 a 27 nebyly zaznamenány výraznější rozdíly mezi frekvencí cytotypů na úrovni fertálních rostlin a květů (obr. 6; příloha 5).

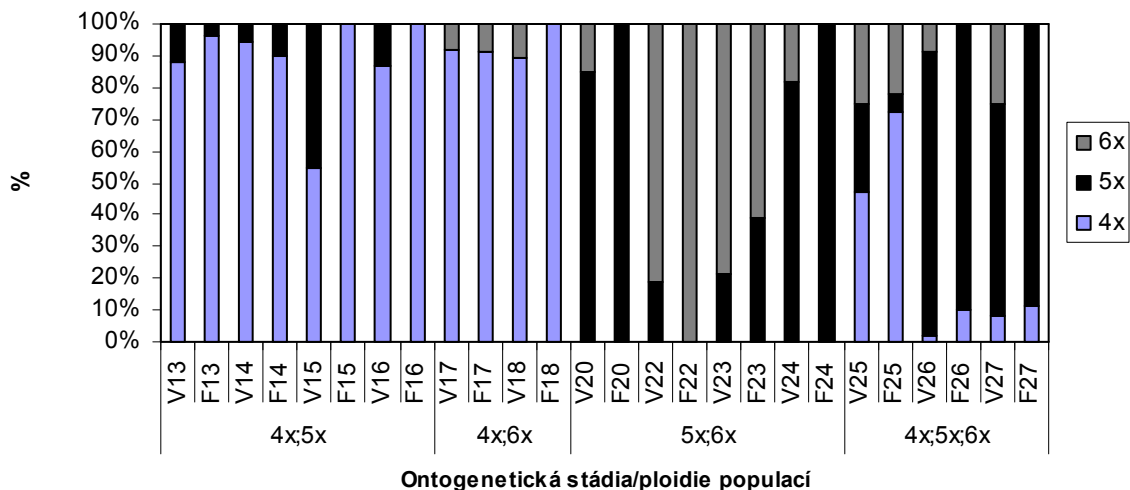
Tab. 2. Souhrnná tabulka cytotypové kompozice populací na třech úrovních (sterilní rostliny, kvetoucí rostliny, neabortované květy) (PP ploidy populací; P č. číslo populace; Σn celkový počet rostlin v dané kategorii; jako fertální jsou označeny rostliny, jejichž květy vyprodukovaly alespoň jedno neabortované semeno).

P č.	PP	Σn	Průměrná frekvence cytotypů vegetativních rostlin (%)			Σn	Průměrná frekvence cytotypů fertálních rostlin (%)			Σn	Průměrná frekvence cytotypů na úrovni květů (%)		
			4x	5x	6x		4x	5x	6x		4x	5x	6x
1;2	4x	150	100,0			35	100,0			268	100,0		
6;8	5x	144		100,0		64		100,0		1059		100,0	
11;12	6x	118			100,0	13			100,0	63			100,0
13;14;15;16	4x;5x	228	81,0	19,0		63	96,5	3,5		670	96,2	3,8	
17;18	4x;6x	107	90,5		9,5	55	95,7		4,3	873	99,8		0,2
20;22;23;24	5x;6x	169		51,8	48,2	56		59,7	40,3	377		66,1	33,9
25;26;27	4x;5x;6x	131	19,1	61,2	19,7	89	31,2	61,6	7,2	893	34,8	64,2	1,0

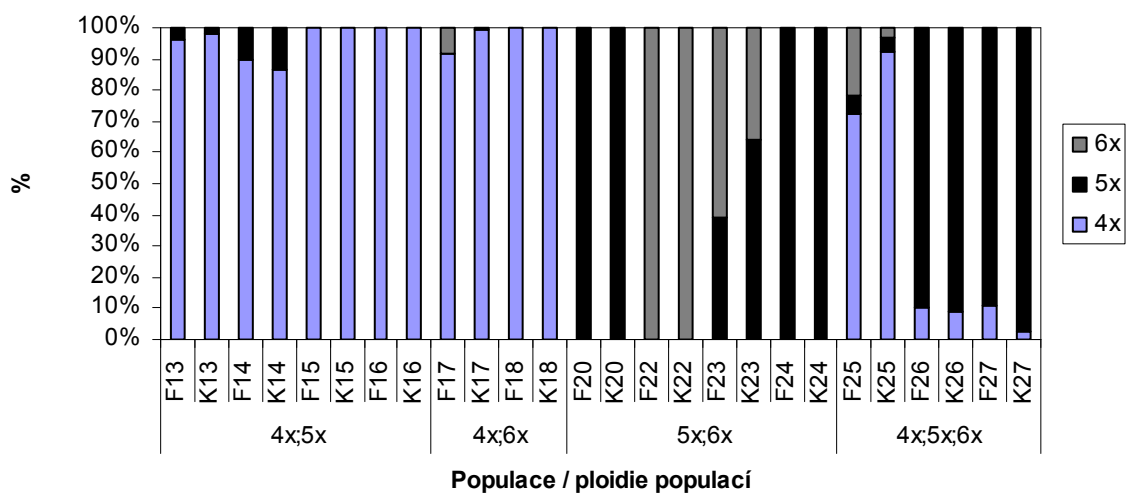
Tab. 3. Wilcoxonův párový test; testování H_0 : proporce cytotypu je stejná ve sterilním a fertálním stavu v různých populacích téže cytotypové kombinace. V případě smíšených populací tří cytotypů byly testovány pouze 2 dominantní cytotypy (PP ...ploidy populací; n ...počet porovnávaných populací; z ...hodnota testového kritéria; P ...hladina významnosti).

PP	n populací	z	P
4x;5x	4	1,4606	0,1441
4x;6x	2	0,4472	0,6547
5x;6x	4	0,3651	0,7150
4x;5x;6x	3	1,6036	0,1088

Obr. 5. Cytotypová kompozice smíšených populací. Porovnání zastoupení jednotlivých ploidních úrovní u rostlin ve vegetativním a ve fertiálním stavu (V... označení pro kompozici cytotypů u rostlin ve vegetativním stádiu; F ... označení pro kompozici cytotypů u rostlin ve fertiálním stádiu; uvedený číselný kód označuje číslo populace).



Obr. 6. Cytotypová kompozice smíšených populací. Porovnání zastoupení jednotlivých ploidních úrovní u rostlin ve fertiálním stavu a u neabortovaných květů (F je označení pro kompozici cytotypů u rostlin ve fertiálním stavu; K je označení pro kompozici cytotypů pro neabortované květy; uvedený číselný kód označuje číslo populace).



5.2 Produkce generativního potomstva

Jednocestná ANOVA (bez zohlednění vlivu populace) prokázala jednoznačně signifikantní vliv ploidie mateřských rostlin na všechny sledované reprodukční charakteristiky ($P < 0,01$ ve všech případech). Navíc Bonferroniho test mnohonásobného porovnání ukázal, že:

1. v počtu neabortovaných květů (dále jen květů) na rostlinu se od sebe neliší 4x a 5x cytotypy, ale 6x cytotyp se významně liší od obou dvou nižších ploidních úrovní (obr. 7A – zde fertlní květy). To znamená, že hexaploidi produkují méně květů na jedince než zbylé dva cytotypy, které se v tomto parametru téměř shodují. Průměrný počet květů na jednu rostlinu u 6x je 3 ± 3 , u 5x 11 ± 11 a u 4x 13 ± 9 (\pm směrodatná odchylka).

2. v celkovém počtu semen na rostlinu tvoří homogenní skupinu 5x a 6x cytotyp a 4x se od nich významně odlišuje (obr. 7B). Tetraploidi produkují celkově více semen na jednu rostlinu než zbylé dva cytotypy. Průměrný počet vyprodukovaných semen na rostlinu u 4x je 11 ± 12 , u 5x je 7 ± 8 a u 6x je 6 ± 6 (\pm směrodatná odchylka)..

3. v počtu neabortovaných semen představují cytotypy 5x a 6x opět homogenní skupinu, zatímco 4x se od nich významně odlišuje (obr. 7C). Tetraploidi produkují celkově více neabortovaných semen než pentaploidi a hexaploidi. Průměrný počet vyprodukovaných neabortovaných semen na rostlinu je u 4x 7 ± 8 , u 5x je 5 ± 6 a u 6x 4 ± 5 (\pm směrodatná odchylka).

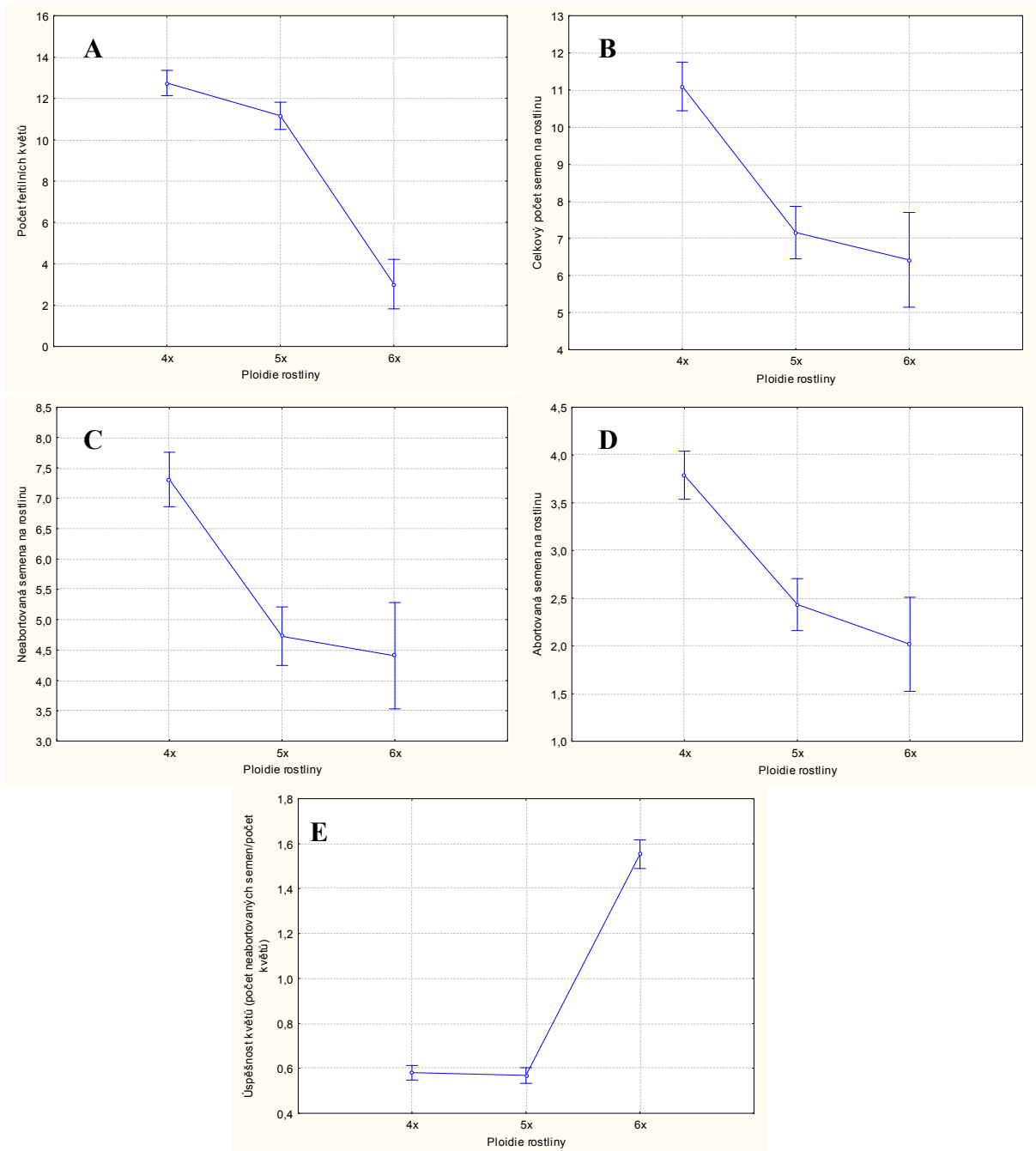
4. v počtu abortovaných semen na rostlinu jsou 5x a 6x cytotyp hodnoceny jako homogenní skupina a 4x ploidní úroveň se od nich významně odlišuje (obr. 7D). Tetraploidi ačkoliv mají velké množství neabortovaných semen produkují zároveň i více abortovaných propagulí. Průměrný počet abortovaných semen na rostlinu u 4x je 4 ± 5 , u 5x je 2 ± 3 a u 6x je 2 ± 2 (\pm směrodatná odchylka).

5. v úspěšnosti květů se od sebe neodlišují 4x a 5x cytotypy, zatímco 6x se od nich významně odlišuje (obr. 7E). Hexaploidi jsou celkově výrazně úspěšnější v produkci neabortovaných semen na jednu rostlinu v porovnání s zbylými dvěma ploidiemi.

Celkově se tedy zdá, že ačkoliv 4x cytotyp produkuje větší množství květů i semen, je jeho úspěšnost v počtech neabortovaných generativních propagulí na jeden květ nízká. V případě 5x sice dochází k intenzivní tvorbě květů, která je srovnatelná s 4x, ale počet vyprodukovaných semen je znatelně menší. V úspěšnosti květů však dosahují hodnot srovnatelných s tetraploidy. Zajímavá je i situace u 6x cytotypu, který i přesto, že produkuje celkově nízké počty květů i semen, má významně vyšší míru úspěšnosti květů než zbylé dva cytotypy.

Hierarchická ANOVA testující vliv cytotypové kompozice populace (pevný faktor s hladinami odpovídajícími buď kompozici populace, např. 4x, 4x5x, 4x6x, 4x5x6x, nebo sloučeně do dvou hladin, mj. čistá vs. smíšená populace) na sledované reprodukční charakteristiky (počet květů, semen, úspěšnost, viz výše) jednotlivých cytotypů nebyla v případě 4x a 5x cytotypů mateřských rostlin signifikantní ($P > 0,05$). Znamená to, že produkce květů a semen příslušného cytotypu není závislá na cytotypové kompozici populace. Avšak analýza ukázala vysokou míru variability mezi jednotlivými populacemi, kde byly zaznamenány vždy výrazné signifikantní rozdíly pro produkci květů a semen u 4x a 5x mateřských rostlin ($P < 0,05$). U 6x mateřských rostlin nebyl zaznamenán vliv cytotypové kompozice populace na vybrané reprodukční charakteristiky (počet květů, neabortovaných semen, úspěšnost, $P > 0,05$), a nebyla detekována ani variabilita mezi populacemi ($P > 0,05$). Jediný signifikantní výsledek byl zaznamenán pouze pro vztah mezi cytotypovým složením populací a produkcí abortovaných semen ($P = 0,02$), kdy rostliny z čistých populací produkovaly více abortovaných semen než rostliny ze smíšených populací.

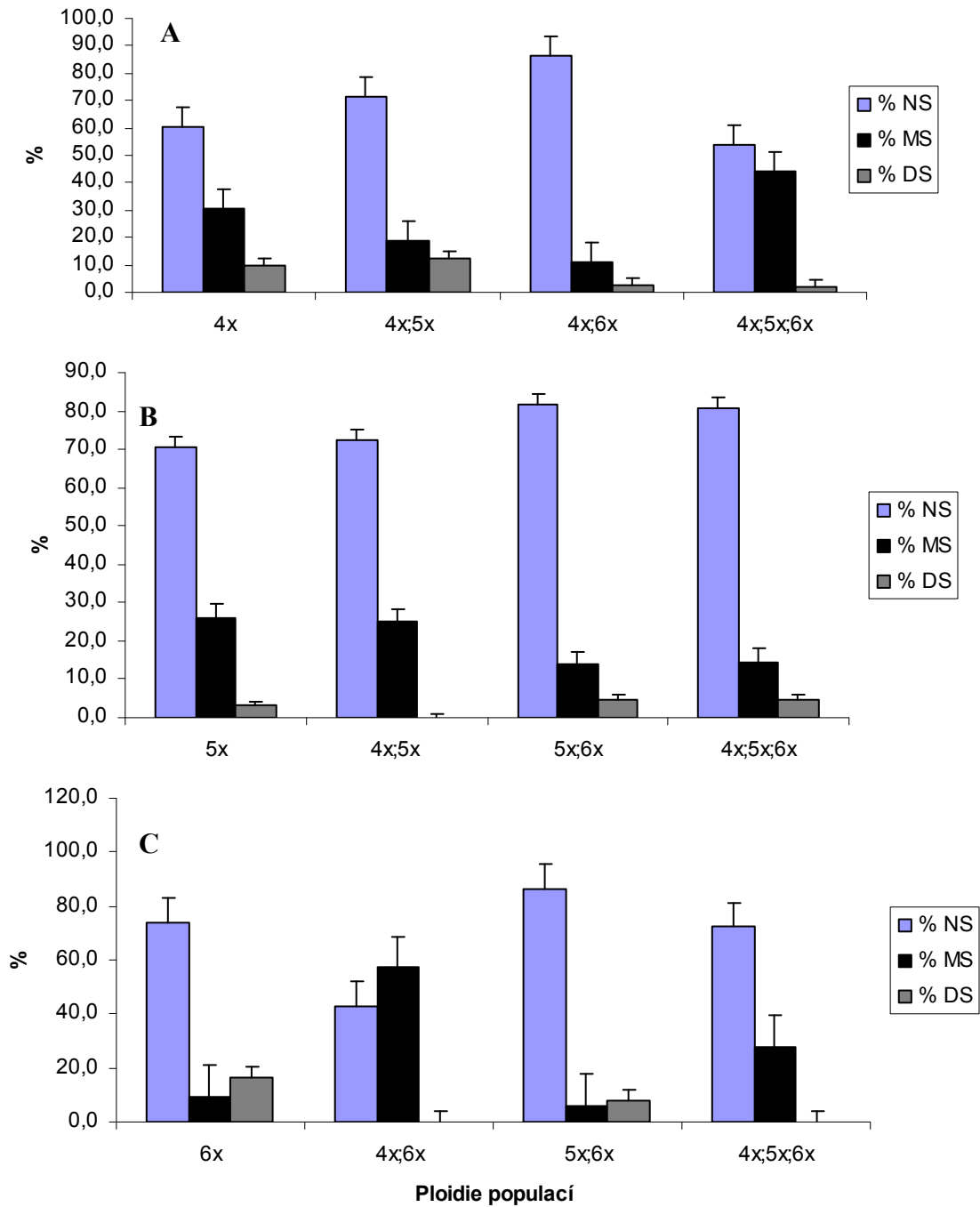
Obr. 7. Vztah mezi ploidií mateřských rostlin a reprodukčními parametry bez ohledu na charakter populací (tj. smíšené x homogenní). Jednocestná ANOVA, $P < 0,001$ pro všechny sledované charakteristiky (průměr \pm 95 % konfidenční interval). **A** ...celkový počet neabortovaných květů ve vztahu k ploidií mateřských rostlin; **B** ...celkový počet semen na mateřskou rostlinu daného cytotypu; **C** ...celkový počet neabortovaných semen na mateřskou rostlinu daného cytotypu; **D** ...celkový počet abortovaných semen na mateřskou rostlinu daného cytotypu; **E** ...úspěšnost květů mateřských rostlin dané ploidií úrovně (tj. celkový počet neabortovaných semen / celkový počet květů mateřské rostliny dané ploidií úrovně); průměr \pm SE.



5.3 Germinační experiment

V průběhu germinačního experimentu byla sledována klíčivost a podíl dormantních semen. Údaje pro populace z jednotlivých let experimentu byly sloučeny a převedeny do grafické podoby (obr. 8). Souhrnné hodnoty pro jednotlivé populace jsou uvedeny v příloze 6. Průměrné procento vyklíčených/mrtvých/dormantních semen pro jednotlivé cytotypy bylo v případě 4x 65,2/30,2/4,6 %, 5x 75,7/20,8/3,5 % a 6x 74,5/17,5/8,0 %. Po sečtení počtu vyklíčených a dormantních semen byly získány průměrné hodnoty fertálních semen pro každý cytotyp. Pro tetraploidy byla získána průměrná hodnota 69,8 %, pro pentaploidy 79,2 % a pro hexaploidy 82,5 %. Do uvedených hodnot pro tetraploidy není započítávána populace číslo 2, protože se v daných parametrech výrazně odlišuje od ostatních homogenních 4x populací. Data jsou spočítána pouze za roky 2007 až 2009 neboť pro rok 2006 nebyly získány údaje o počtech dormantních a mrtvých semen.

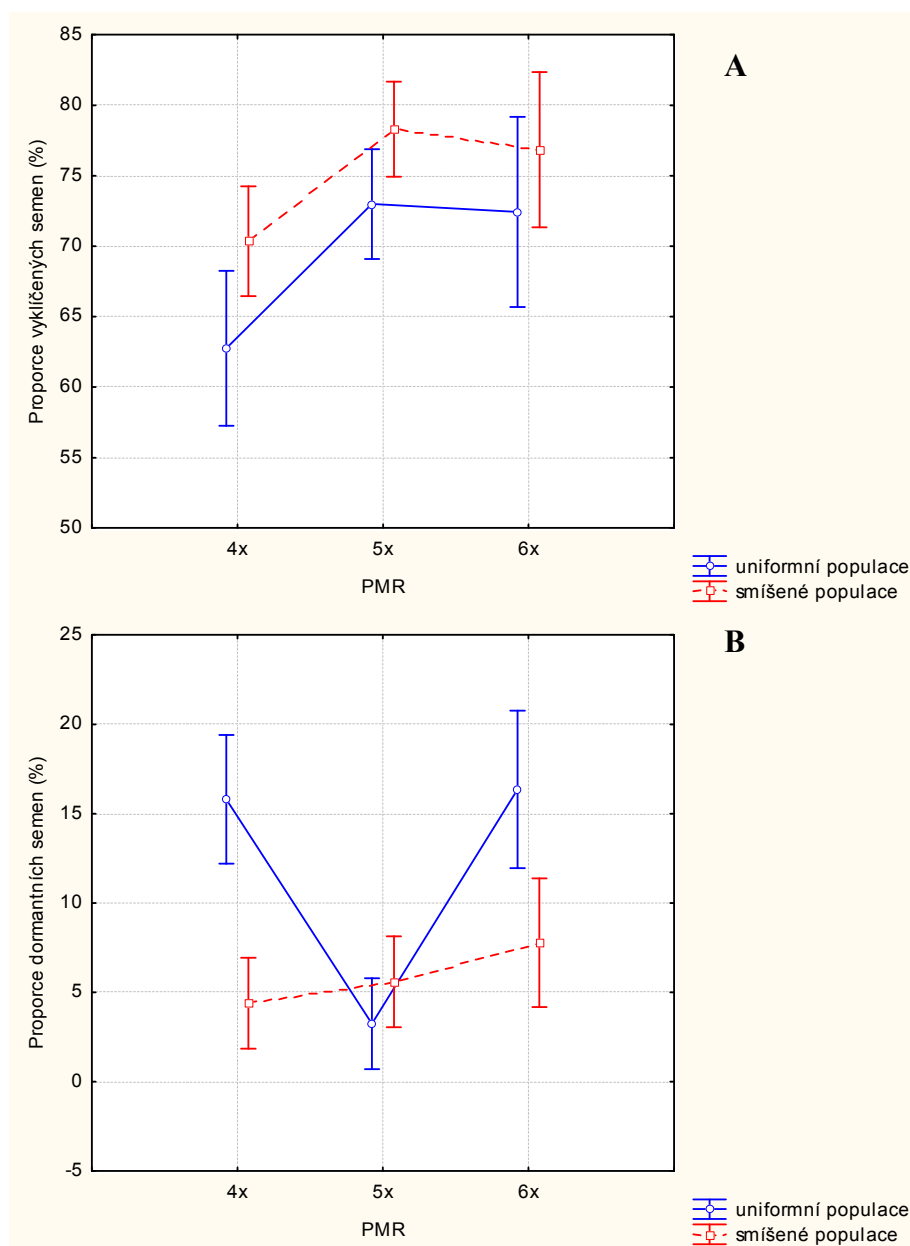
Obr. 8. Procenta naklíčených (% NS), dormantních (% DS) a mrtvých (% MS) semen vyprodukovaných 4x, 5x a 6x cytotypy v populacích homogenního i smíšeného charakteru (chybové úsečky = SE). A ... semena pocházející od 4x mateřských rostlin v daných typech populací; B ... to samé jako A pro 5x mateřské rostliny; C ... to samé jako A pro 6x mateřské rostliny; procenta počítána jako průměr z procent pro jednotlivé populace, viz příloha 2; do grafu A není zahrnuta populace č. 2, neboť se velmi odchyluje od ostatních homogenních 4x populací.



Jednocestná ANOVA testující vliv cytotypového složení populace na procento vyklíčených a dormantních semen pocházejících od mateřských rostlin dané ploidní úrovně nebyla signifikantní ($P > 0,05$). Znamená to, že kompozice cytotypů v populacích neovlivňuje klíčivost ani dormanci semen. V případě dvoucestné ANOVy (pevnými faktory byly ploidní charakter mateřské rostliny a typ populace, tj. smíšená/čistá; závislá proměnná bylo % vyklíčených/dormantních semen), která testovala vliv cytotypově smíšeného a homogenního charakteru populací na proporcí vyklíčených a dormantních semen (obr. 9), byl zaznamenán pouze slabý vliv typu populace na procento dormantních semen ($P = 0,04$). V případě proporce vyklíčených semen byl vliv typu populace nesignifikantní ($P > 0,05$). Do analýzy nebyla zahrnuta populace číslo 2 neboť se výrazně odchyluje od ostatních tetraploidních populací.

Celkově se dá říci, že ploidie mateřské rostliny ani cytotypový charakter populace nemá vliv na klíčivost a dormanci semen. Všechny cytotypy se v tomto směru chovají téměř homogenně.

Obr. 9. Grafický výstup dvoucestné ANOVy testující vliv typu populace (čistá/smíšená) na proporce vyklíčených a dormantních semen (A ...proporce vyklíčených semen; B ...proporce dormantních semen; PMR ...ploidy mateřské rostliny; průměr ± SE).



5.4 Cytotypová kompozice generativního potomstva

Analýza semen a semenáčků za pomoci průtokové cytometrie umožnila odhalit variabilitu v zastoupení cytotypů ve sledovaných ontogenetických vývojových stádiích, tj. u semen a juvenilních rostlin. Zároveň poskytla informaci o intenzitě působení selekčních mechanismů na této úrovni. Celkově byla v případě generativního potomstva všech sledovaných ploidních úrovní zaznamenána o něco větší variabilita v cytotypové kompozici semen než u semenáčků.

Výsledky, které se odchyľují od tohoto trendu, jsou způsobeny rozdílnou velikostí analyzovaných vzorků semen a semenáčků, což je zapříčiněno velmi variabilní produkcí generativního potomstva u všech cytotypů. V případě semenáčků jsou nízké počty změřených rostlin ovlivněny i množstvím vzorků, které nebylo doposud možné změřit, neboť tyto rostliny nevyprodukovaly dostatečné množství biomasy pro průtokovou cytometrii (tj. rostliny byly příliš malé nebo danou sezónu přečkávaly v dormantním stavu). Chybějící údaje o ploidní úrovni těchto rostlin by mohly celkově pozměnit výsledky prezentované pro semenáčky v tab. 4 A - C. V tabulkách jsou uvedeny údaje o ploidii semen a semenáčků pouze pro populace, u kterých byly získány oba typy dat.

Jak je patrné z tab. 4A, produkují tetraploidní rostliny cytotypově variabilní potomstvo ve smíšených i homogenních populacích. Avšak nebyl pozorován žádný výrazný trend odlišující oba typy populací. V rámci semen jsou produkovány různé ploidní úrovně v rozsahu $2n = 3x$ až $7x$. Zajímavá je zejména homogenní populace číslo 2, kde jsou zastoupeny všechny uvedené cytotypy. U semenáčků byly zaznamenány ploidní úrovně v rozsahu $2n = 4x$ až $7x$, a to ve znatelně menším procentickém zastoupení v porovnání se semeny. V tomto případě se jednalo pouze o smíšenou populaci č. 17, kde byly abnormální cytotypy zachyceny až po změření velkého množství vzorků (tj. 204 semenáčků). Tetraploidie tedy průměrně vyprodukovali 1 % $3x$, 88,9 % $4x$, 6,5 % $5x$, 1,4 % $6x$ a 2,2 % $7x$ na úrovni semen a 99,7 % $4x$, 0,1 % $5x$, 0,1 % $6x$ a 0,1 % $7x$ na úrovni semenáčků. Z výsledků je zřejmé, že v generativním potomstvu dominuje vždy cytotyp mateřské rostliny, a to v obou ontogenetických stádiích. Nepřítomnost nebo velmi vzácný výskyt $3x$, $5x$, $6x$ a $7x$ ploidních úrovní mezi semenáčky by mohla svědčit o silné selekci působící proti těmto cytotypům. Avšak tento výsledek je ovlivněn nízkým počtem změřených rostlin (nebereme-li v úvahu počet změřených semenáčků v populaci 17).

Tab. 4. Zastoupení cytotypů v generativním potomstvu tetraploidních (tab.x), pentaploidních (tab. x) a hexaploidních (tab. x) mateřských rostlin v jednotlivých populacích na úrovni semen a semenáčků. V tabulkách jsou uvedeny údaje o ploidním stupni semen a semenáčků pouze u populací, pro které byly získány oba typy dat (P č. číslo populace; PP ploidie populace; FRP 4x frekvence tetraploidních rostlin v populaci, platí i pro 5x a 6x; n 4x MR počet 4x mateřských rostlin, platí i pro 5x a 6x).

Tab. 4A

P č.	PP	FRP 4x	n 4x MR semen	n semen	Semena										n 4x MR semenáčků	n semenáčků	Semenáčky							
					3x	%	4x	%	5x	%	6x	%	7x	%			4x	%	5x	%	6x	%	7x	%
2	4x	100,0	7	56	1	1,8	48	85,7	3	5,4	2	3,6	2	3,6	3	7	7	100,0	-	-	-	-	-	-
4	4x	100,0	5	22	-	-	20	90,9	-	-	1	4,5	1	4,5	5	7	7	100,0	-	-	-	-	-	-
13	4x; 5x	87,9	5	23	1	4,3	19	82,6	3	13,0	-	-	-	-	13	28	28	100,0	-	-	-	-	-	-
15	4x; 5x	54,5	4	10	-	-	10	100,0	-	-	-	-	-	-	1	1	1	100,0	-	-	-	-	-	-
17	4x; 6x	92,0	5	34	-	-	33	97,1	-	-	-	-	1	2,9	28	204	201	98,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5
25	4x; 5x; 6x	47,0	18	48	-	-	37	77,1	10	20,8	-	-	1	2,1	13	23	23	100,0	-	-	-	-	-	-
Celkem			44	193	2	1,0	167	88,9	16	6,5	3	1,4	5	2,2	63	270	267	99,7	1	0,1	1	0,1	1	0,1

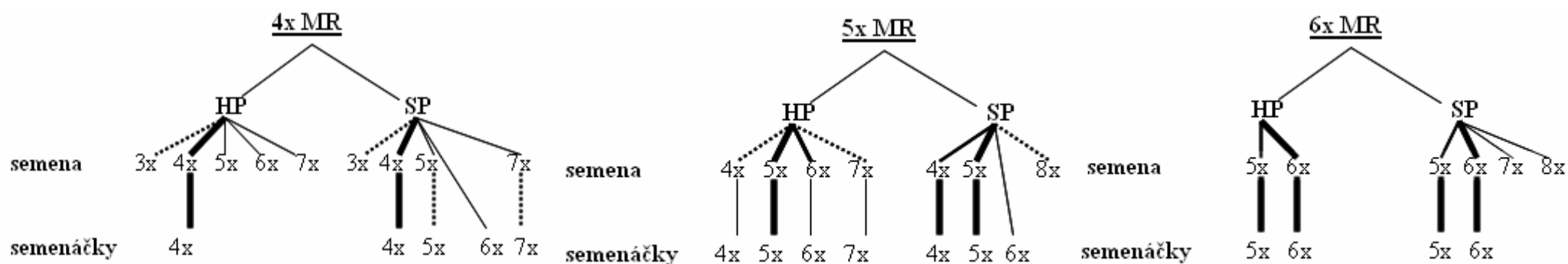
Tab. 4B

P č.	PP	FRP 5x	n 5x MR semen	n semen	Semena										n 5x MR semenáčků	n semenáčků	Semenáčky							
					4x	%	5x	%	6x	%	7x	%	8x	%			4x	%	5x	%	6x	%	7x	%
5	5x	100,0	6	8	-	-	6	75,0	2	25,0	-	-	-	-	19	36	3	8,3	30	83,3	2	5,6	1	2,8
6	5x	100,0	15	66	1	1,5	44	66,7	21	31,8	-	-	-	-	14	28	-	-	27	96,4	1	3,6	-	-
7	5x	100,0	3	10	-	-	7	70,0	3	30,0	-	-	-	-	1	1	-	-	1	100,0	-	-	-	-
9	5x	100,0	4	34	-	-	28	82,4	6	17,6	-	-	-	-	5	19	4	21,1	14	73,7	-	-	1	5,3
10	5x	100,0	6	17	-	-	14	82,4	2	11,8	1	5,9	-	-	1	2	1	50,0	1	50,0	-	-	-	-
19	5x;6x	93,3	2	8	-	-	5	62,5	2	25,0	-	-	1,0	12,5	5	8	-	-	8	100,0	-	-	-	-
23	5x;6x	21,4	1	2	-	-	1	50,0	1	50,0	-	-	-	-	4	12	-	-	10	83,3	2	16,7	-	-
24	5x;6x	82,0	3	19	11	57,9	8	42,1	-	-	-	-	-	9	39	14	35,9	25	64,1	-	-	-	-	-
Celkem			40	164	12	7,4	113	66,4	37	23,9	1	0,7	1	1,6	58	145	22	14,4	116	81,4	5	3,2	2	1,0

Tab. 4C

P. č.	PP	FRP 6x	n 6x MR semen	n semen	Semena								n 6x MR semenáčků	n semenáčků	Semenáčky			
					5x	%	6x	%	7x	%	8x	%			5x	%	6x	%
11	6x	100	4	22	3	13,6	19	86,4	-	-	-	-	3	10	7	70,0	3	30,0
12	6x	100	2	11	2	18,2	9	81,8	-	-	-	-	2	7	1	14,3	6	85,7
22	5x;6x	81,3	5	32	1	3,1	30	93,8	-	-	1	3,1	3	7	-	-	7	100,0
23	5x;6x	78,6	5	21	1	4,8	19	90,5	1	4,8	-	-	4	5	1	20,0	4	80,0
25	4x;5x;6x	25,0	5	20	-	-	16	80,0	3	15,0	1	5,0	3	5	2	40,0	3	60,0
Celkem			21	106	7	7,9	93	86,5	4	4,0	2	1,6	15	34	11	28,9	23	71,1

Obr. 10. Schématické znázornění zastoupení jednotlivých cytotypů v generativním potomstvu 4x, 5x a 6x mateřských rostlin s ohledem na cytotypově smíšený (SP) či homogenní (HP) charakter populace (A ... 4x mateřské rostliny; B ... 5x mateřské rostliny; C ... 6x mateřské rostliny; MR ... mateřská rostlina; nejtlustší čára označuje cytotyp s největší frekvencí; tloušťka čáry označuje frekvenci s jakou je daný cytotyp zastoupen; přerušovaná čára označuje cytotyp zastoupený pouze jedním semenem/semenáčkem).



S výše uvedenými výsledky jsou konzistentní data uvedená v tab. 5. v následující kapitole 5.5, kde jsou uvedeny informace i o ploidních úrovních semenáčků u populací pro které nebyly změřeny semena. Z těchto dat je zřejmé, že při větším počtu analyzovaných semenáčků jsou mezi generativními potomky tetraploidních rostlin zachyceny všechny ploidní stupně zaznamenané na úrovni semen. Výjimku tvoří pouze 3x cytotyp, který mezi semenáčky nebyl detekován. Tento výsledek opět podporuje domněnku o možné selekci působící proti těmto ploidním úrovním.

V případě pentaploidů (tab. 4B) jsou na úrovni semen produkovány ploidní stupně v rozsahu $2n = 4x$ až $8x$ a na úrovni semenáčků v rozsahu $2n = 4x$ až $7x$. V populaci číslo 5 je nepřítomnost některých cytotypů mezi semeny způsobena jejich nízkým počtem v porovnání se semenáčky. Naopak v populaci 7 je hodnota 100 % pro 5x semenáčky značně zavádějící, neboť údaj je založen pouze na jedné změřené rostlině. Celkově jsou oba soubory dosti variabilní, což je způsobeno značně nevyváženým počtem změřených vzorků, takže i průměrné hodnoty pro jednotlivé cytotypy mohou být nepřesné. Ani v rámci smíšených a homogenních populací nebyl pozorován žádný trend odlišující obě kategorie. Nicméně i přes uvedený problém je patrné, že v generativním potomstvu dominuje cytotyp mateřské rostliny a to na úrovni semen (průměrně 66,4 %) i semenáčků (průměrně 81,4 %).

Zastoupení ploidních úrovní semenáčků v datech prezentovaných v této kapitole odpovídá výsledkům v tab. 5. kapitoly 5.5, neboť se na výsledcích podílejí téměř stejná data, tj obě tabulky hodnotí téměř ty stejné typy populací. V tab. x jsou navíc uvedeny výsledky pro pentaploidní mateřské rostliny v 4x;5x smíšených populacích, kde byly zaznamenány pouze 4x semenáčky, a v 4x;5x;6x smíšených populacích, kde byly naopak zaznamenány pouze 5x semenáčky.

V tab. 4C jsou shrnuty výsledky z průtokové cytometrie generativního potomstva hexaploidních mateřských rostlin. Na první pohled je patrné, že mezi semeny je generována větší variabilita než mezi semenáčky. V rámci změřeného souboru jsou produkovány ploidní úrovně v rozsahu $2n = 5x$ až $8x$ pro semena a $2n = 5x$ a $6x$ pro semenáčky. Cytotypově variabilní potomstvo je generováno ve smíšených i homogenních populacích. Nicméně vyšší cytotypy jsou zaznamenány pouze u semen ve smíšených populacích. Hexaploidi průměrně vyprodukovali 7,9 % 5x, 86,5 % 6x, 4,0 % 7x a 1,6 % 8x na úrovni semen a 28,9 % 5x a 71,1 % 6x na úrovni semenáčků. Rovněž i v případě hexaploidů dominuje v generativním potomstvu cytotyp mateřské rostliny. Nepřítomnost 7x a 8x mezi semenáčky svědčí o možné selekci působící proti těmto cytotypům.

V případě hexaploidů není možné porovnat výše uvedené výsledky s daty v následující kapitole neboť tam potřebné informace chybějí.

Na obrázku 10 jsou schématicky znázorněny jednotlivé ploidní úrovně a cytotypy generativních potomků. Na těchto výstupech je vidět dominantní zastoupení mateřského cytotypu v generativním potomstvu. Zároveň je možné pozorovat přítomnost/nepřítomnost jednotlivých ploidních stupňů na úrovni semen a semenáčků.

5.5 Přežívání

U semenáčků, které byly pěstovány na experimentálním pozemku, bylo sledováno jejich přežívání v I. sezóně (tj. rok jejich vyklíčení a vysázení na pozemek) a II. sezóně (tj. následující rok). Prezentované výsledky pocházejí pouze z pozorování semenáčků pocházejících ze sběrů let 2006 až 2008. Pozorování navazují na výsledky předcházející kapitoly a jsou shrnuta v tabulce 5. Z údajů pro první sezónu je zřejmé, že semenáčky v prvním roce nekvetou a tudíž neprodukují vlastní potomstvo. Celkově mezi semenáčky přežívají dobře 4x, 5x a 6x cytotypy, které jsou zastoupeny i mezi dospělými rostlinami v populacích. Většina těchto rostlin je schopna v následující vegetační sezóně (tab. 5. sezóna II.) vyprodukovat své vlastní potomstvo ať už vegetativní nebo generativní cestou. Extrémní cytotypy, zde reprezentované pouze 7x, jsou schopny přežít i do druhé sezóny, avšak pouze ve vegetativním stavu. Tyto rostliny dosahují nevelkých rozměrů, rostou pomalu, na začátku léta obvykle zasychají a toto období přečkávají v dormantním stavu.

Tab. 5. Přehled přežívajících semenáčků s ohledem na jejich ploidní úroveň a cytotyp mateřské rostliny (bez semenáčků ze sběrů roku 2009; P č. ...populace číslo; PP ...ploidie populace; PMR ...ploidie mateřské rostliny; PS ...ploidie semenáčků; * rostliny v sezóně I. nekvetly; ** vytvořeny nadzemní orgány; Sezóna I. rok sadby měsíc červen; Sezóna II. následující rok měsíc červen).

P č.	PP	PMR	n semenáčků	Sezóna I.*		PS	Sezóna II.			
				Přežívá	%		Přežívá**	Přežívá %	Kvete	% z přežívajících
1;3;4	4x	4x	66	39	59,1	4x	29	43,9	18	62,1
						5x	1	1,5	1	100,0
5;7;10	5x	5x	85	50	58,8	4x	4	4,7	1	25,0
						5x	26	30,6	14	53,8
						6x	2	2,4	1	50,0
						7x	1	1,2	–	–
11;12	6x	6x	26	17	65,4	5x	6	23,1	1	16,7
						6x	9	34,6	5	55,6
13;14;15;16	4x; 5x	4x	192	121	63,0	4x	96	50,0	46	47,9
						5x	1	0,5	1	100,0
		5x	9	11,1	1	100,0				
17;18	4x; 6x	4x	336	243	72,3	4x	194	57,7	142	73,2
						5x	2	0,6	2	100,0
						6x	5	1,5	3	60,0
						7x	1	0,3	–	–
		6x	1	100,0	–	–				
19;20;21;24	5x; 6x	5x	102	67	65,7	4x	16	15,7	12	75,0
						5x	31	30,4	19	61,3
						6x	1	1,0	1	100,0
		6x	2	100,0	6x	1	50,0	–	–	
25;26;27	4x; 5x; 6x	4x	44	18	40,9	4x	17	38,6	7	41,2
		5x	31	12	38,7	5x	7	22,6	4	57,1

5.6 Variabilita generativního potomstva

V průběhu experimentu byly zaznamenány generativně vzniklé rostliny, které se v charakteru květenství a barvě květů významně odlišovaly od typických rostlin *Allium oleraceum*. U těchto rostlin lichookolík neobsahoval pacibulky (obr. 11). Nicméně se tyto rostliny v přežívání neodchylovaly od ostatních, typických rostlin s pacibulkami. Uvedený znak (absence pacibulek v květenství) byl pozorován u těchto rostlin i v dalších vegetačních obdobích. Takových rostlin bylo vypěstováno 6, všechny jsou tetraploidní a pocházejí od šesti tetraploidních mateřských rostlin z populace č. 16 a 17.

Dále byla pozorována výrazná variabilita v počtu a barvě květů u generativních potomků vyprodukovaných jednou mateřskou rostlinou (obr. 12). Stejná variabilita byla pozorována i mezi rostlinami vypěstovanými ze semen mateřských rostlin stejného cytotypu pocházejících ze stejné populace.

Obr. 11. Přehled rostlin, které ve svém květenství neobsahují vegetativní rozmnožovací propagule, tzv. pacibulky. Všichni jedinci byly vypěstováni ze semen. A - D tetraploidní rostliny z populace č. 17; E a F tetraploidní rostliny z populace č. 16.



Obr. 12. Variabilita v barvě květů, množství produkovaných pacibulek a květů u generativního potomstva: A a B tetraploidní rostliny pocházející od jedné 4x mateřské rostliny z populace č. 17; C a D tetraploidní rostliny pocházející od dvou mateřských 4x rostlin z populace č. 17; E a F tetraploidní jedinci pocházející od jedné 4x rostliny z populace č. 13; G a H pentaploidní jedinci pocházející od dvou 5x mateřských rostlin populace č. 5.



5.7 Karyologie

Semenáčky, jejichž výsledky z analýzy průtokovým cytometrem neposkytovaly dostatečnou informaci o jejich ploidním stupni, byly hodnoceny pomocí klasické metody roztlakových preparátů. Počet chromosomů v somatické metafázi buněk kořenových špiček byl hodnocen u celkem 5 rostlin (4 semenáčky z 5x;6x populace č. 24 a 1 semenáček z 5x;6x populace č. 20). Počty chromosomů byly odečítány z nejméně tří roztlaků (tj. tří kořenových špiček). Na každém z těchto roztlaků byly hodnoceny nejméně tři buňky ve stádiu metafáze. Chromosomální počty pro rostliny z populace č. 24 byly $2n = 36$ (u tří jedinců) a 37 (u jednoho jedince, obr. 13) a pro rostlinu z populace č. 20 $2n = 36$.

Obr. 13. Příklad somatické metafáze kořenových špiček u semenáčku pentaploidní mateřské rostliny z populace č. 24 ($2n = 37$)



5.8 Způsob rozmnožování - metoda FCSS

Analýza způsobu rozmnožování proběhla metodou FCSS (Matzk et al. 2000) na průtokovém cytometru. Vzorky pro analýzu byly vybrány z celkem 5 cytotypově homogenních a 4 cytotypově smíšených populací. Počet změřených semen na jednu populaci se pohyboval v rozsahu 7-92 v závislosti na jejich nasbíraném množství v každé populaci. Na základě výsledků měření průtokového cytometru je možné říci, že generativní potomstvo je produkováno převážně sexuální cestou (obr. 14A). Počet semen, která vznikla touto cestou

klesá se stoupající ploidní úrovni (tab. 6). Semena vzniklá sexuálně tvoří průměrně 80,8 % analyzovaných semen u 4x, 64,5 % u 5x a 45,1 % u 6x cytotypu (tab. 6). Dále byl u každé ploidní úrovně zanalyzován určitý počet semen, u kterých nebyl na grafickém výstupu z průtokového cytometru viditelně zaznamenán pík pro endosperm (obr. 14B). Avšak není vyloučena jeho přítomnost ve vzorku. Tento jev byl zaznamenán u různých rostlin téže populace, které kromě těchto semen produkovaly i semena u kterých byl endosperm průtokovou cytometrií detekován. V této kategorii panuje opačný trend než u semen vzniklých sexuální cestou. Počet generativních propagulí u kterých nebyl viditelně zaznamenán endosperm stoupá společně se stoupající ploidní úrovni mateřských rostlin.

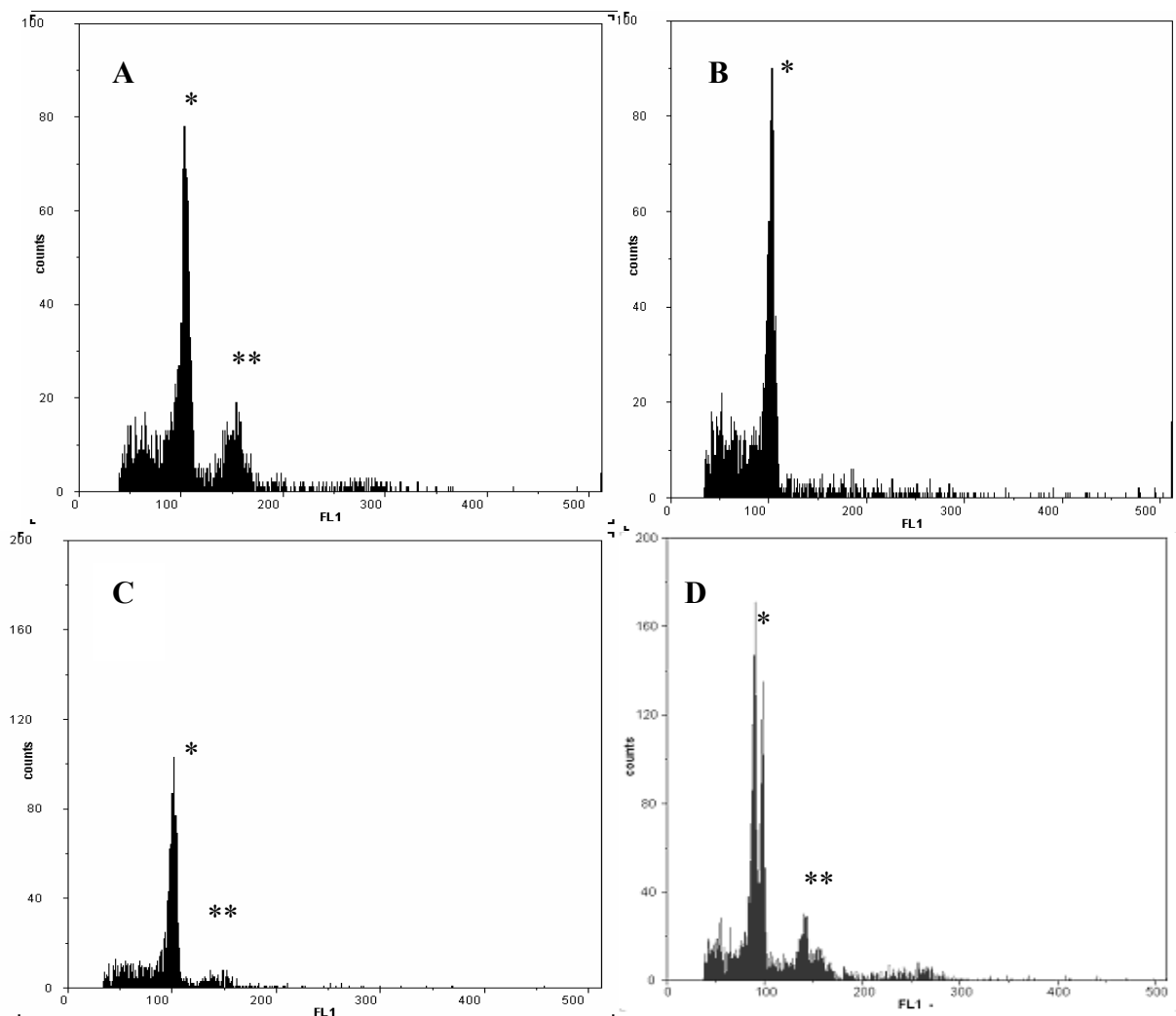
S ohledem na cytotypovou kompozici populací bylo v homogenních populacích zaznamenáno průměrně 33,3 % semen bez viditelného píku pro endosperm, 54,1 % semen vzniklých jako produkt sexuálního rozmnožování a 12,6 % semen s malým množstvím endospermu (tab. 6; obr. 14C). Ve smíšených populacích bylo průměrně zaznamenáno 9,2 % semen bez viditelného endospermu, 80,3 % semen vzniklých sexuálně a 10,5 % semen s malým množstvím endospermu (tab. 6). Celkem bylo analyzováno 41 semen v homogenních populacích a 111 semen ve smíšených populacích.

Kromě způsobu rozmnožování byla detekována i variabilita v obsahu jaderné DNA embrya i endospermu u semen vyprodukovaných jednou mateřskou rostlinou (obr. 14D). Tato variabilita byla pozorována u generativního potomstva všech tří sledovaných mateřských cytotypů (viz též kap. 5.7).

Tab. 6. Přehled změřených semen metodou FCSS (? ENDOSPERM ...v grafickém výstupu z průtokového cytometru nebyl viditelně zaznamenán pík pro endosperm; 2 : 3 ...sexuální reprodukce, poměr embryo : endosperm 2C : 3C; MED ... malé množství endospermu; uvedená procenta představují průměrnou hodnotu na ploidii mateřských rostlin)

PMR	n změřených semen	? ENDOSPERM		2 : 3		MED	
		n	průměr (%)	n	průměr (%)	n	průměr (%)
4x	87	17	7,2	64	80,8	6	12,0
5x	27	6	25,3	20	64,5	1	10,2
6x	38	11	39,1	18	45,1	9	15,8

Obr. 14. Příklad grafické výstupu z průtokového cytometru pro metodu FCSS (* embryo; ** endosperm; A ... sexuálně vzniklé semeno; B ...nebyl viditelně zaznamenán pík pro endosperm; C ...semeno s malým množstvím endospermu; D ...variabilita v obsahu jaderné DNA u embrya i endospermu, tři semena jedné 5x mateřské rostliny z populace č. 26)



6. DISKUSE

6.1 Způsob rozmnožování – metoda FCSS

Způsob rozmnožování je rozhodující pro pochopení vzniku a udržování cytotypové variability v rámci polyploidního komplexu *Allium oleraceum*. Na otázku vzniku generativního potomstva poskytla možnou odpověď jedna z metod průtokové cytometrie – FCSS (Matzk et al. 2000; kap. 5.8), která prokázala proporcí mezi obsahem jaderné DNA embrya a endospermu v poměru 2C : 3C, tedy typickém pro sexuální způsob rozmnožování. Tento poměr byl společný pro velkou část analyzovaných semen bez ohledu na cytotyp mateřské rostliny. Nicméně bylo zjištěno i nemalé procento semen, pro které nebyl pík endospermu na grafickém výstupu z průtokového cytometru zachycen. Vzhledem k celkově nízkému počtu buněk endospermu v porovnání s embryem je možné usuzovat na možnost, že v daných případech nemuselo být přítomno dostatečné množství buněk endospermu, které by mohly být zachyceny průtokovou cytometrií. K této domněnce přispívá i fakt, že v několika případech byl zaznamenán signál pro endosperm, který polohou odpovídal na sexuální reprodukci, avšak byl nedostačující pro analýzu. Existují taxony, u kterých je endosperm silně redukován nebo úplně chybí; např. čeleď *Orchidaceae* (Baroux et al. 2002), ale také taxony, jejichž endosperm je brzy po dozrání semene spotřebován zárodkem; např. rod *Hieracium* (Krahulcová & Suda 2006). Pokud jsou taková semena analyzována průtokovou cytometrií, chybí na grafickém výstupu signál pro endosperm.

V případě *A. oleraceum* může být nepřítomnost endospermu podmíněna geneticky, neboť byla zaznamenána napříč všemi analyzovanými populacemi bez ohledu na ploidii mateřské rostliny či cytotypovou kompozici populací. Dokonce i velké procento abortovaných semen v jednotlivých populacích může podporovat tuto domněnku. V závislosti na polyploidii druhu a zjištěné produkci geneticky nevyrovnaných pylových zrn (Fialová 1996) je možné usuzovat na možnost abortu endospermu v důsledku disproporce mezi mateřskou a otcovskou dávkou genů. Tuto hypotézu by mohl podporovat i stoupající počet tohoto typu semen společně se stoupající ploidií mateřských rostlin. Zde se mohou uplatnit dva obecné předpoklady. Za prvé, vyšší cytotypy mohou v průběhu meiosis tvořit daleko více anomálních gamet než nižší ploidní úrovně, zvláště v případě, kdy se jedná o liché ploidní stupně. Za druhé, vysoké procento geneticky nevyrovnaných gamet může vypovídat o homologním charakteru chromosomů v jádrech buněk polyploidů (Levin 2002). Pro správnou tvorbu endospermu je zapotřebí, aby oba rodičovské genomy byly ve správném poměru v závislosti

na typu zárodečného vaku. Změna tohoto poměru vede k aborci endospermu (Kermicle & Alleman 1990). Avšak byly zaznamenány případy, kdy je tolerováno nevyrovnané zastoupení otcovského a mateřského genomu v endospermu (Spielman et al. 2003), což umožňuje vývoj semene s neobvyklým ploidním stupněm endospermu.

Jednou z možností je i přítomnost endospermu a poměr mezi DNA embrya endospermu $2C : 2C$, a to vývojem z redukovaného zárodečného vaku s oplodněním vaječné buňky redukovanou otcovskou gametou a autonomním vývojem centrální buňky do endospermu (Qu et al. 2010). Podstatnou otázkou je, zda by taková semena byla vůbec schopna vyklíčit. Pro nalezení odpovědi je zapotřebí provést další studie.

Další možností, jak vysvětlit nepřítomnost endospermu v semenech, je disproporce v rozdělování asimilátů při vývoji semen. Květy tohoto druhu obsahují trojpouzdrý semeník s dvěma vyvinutými vajíčky v každém pouzdře (Duchoslav 2000). Nároky na dostatek asimilátů mohou být na této úrovni velké, a to jak v rámci jednoho květu, tak i celého květenství (Bazzaz & Carlson 1979).

Překvapující je i vysoká produkce vitálních pentaploidních semen, která přiměla autory Åström & Hægström (2004) uvažovat o jejich možném apomiktickém původu. Apomixie je známa u několika málo druhů rodu *Allium*. V těchto případech se jednalo vždy o diplosporii a partenogenetický vývoj embrya (Kojima et al. 1994). Avšak dle výsledků průtokové cytometrie vznikla většina semen pentaploidů pravděpodobně sexuální cestou. Toto zjištění je velmi zajímavé neboť jako lichý ploidní stupeň by měli mít velmi nepravidelný průběh meiotického dělení, na jehož konci vznikají různé typy gamet s euploidním i aneuploidním počtem chromosomů (Kováčik 1983)

6.2 Cytotypová kompozice populací a produkce generativního potomstva

U celkem 13 populací byla prověřena jejich cytotypová kompozice. Díky tomuto podrobnějšímu skríningu se podařilo odhalit výskyt dalších cytotypů v nových i v dříve již analyzovaných populacích, které byly původně považovány za homogenní, nebo u nichž byl znám výskyt pouze dvou cytotypů (Šafářová 2004). Podstatným zjištěním je většinou výrazná dominance jedné z ploidních úrovní u smíšených populací. Mezi těmito populacemi však na druhou stranu panuje značná heterogenita v tom, který z cytotypů převažuje. Tento jev popisuje i Šafářová & Duchoslav (2010) v práci zabývající se distribucí cytotypů *Allium oleraceum* v rámci smíšených populací. Autoři zde dále uvádějí, že zjištěné kompozice

smíšených populací mohou být výsledkem působení různých mechanismů, jako je například převažující vegetativní rozmnožování, prostorově lokální šíření nebo stanovištní heterogenita.

Zjištěná dominance vždy jednoho z cytotypů se projevuje i na úrovni fertálních rostlin, a ještě více, pokud je zohledněn počet květů produkovaných jedinci daného cytotypu. Podstatnou výjimku představují populace s dominantním zastoupením hexaploidních rostlin. V tomto případě vlivem nízkého počtu květů hexaploidních rostlin dochází často k převrácení poměru mezi cytotypy ve prospěch toho minoritního, pokud je vyjádřen jako proporce na úrovni jedinců. Prezentovaný výsledek tak může podstatně ovlivňovat cytotypové složení generativního potomstva, neboť počet vyprodukovaných květů je úzce spjat s produkcí pylu a semen.

Je možné zvažovat hned několik hypotéz pokoušejících se vysvětlit jejich podíl minoritního cytotypu na genetické konstituci generativního potomstva. V první řadě cytotyp, který je v menšině, nemusí vůbec přispívat do sexuální reprodukce, a nebo se na ní podílí jen ve velmi malém procentu případů. Stejně tak může být pouze donorem pylu, což by pak mohlo významně ovlivňovat genomovou výbavu nově vznikajícího potomstva jiného cytotypu. A v neposlední řadě může produkovat své vlastní potomstvo, které umožňuje jeho udržení v populaci. Navíc je zřejmé, že udržení cytotypového složení populace je možné i bez účasti generativního rozmnožování, a to vegetativně produkcí pacibulek a dceřiných cibulí, což je typická vlastnost všech cytotypů *A. oleraceum* (Duchoslav 2000; Fialová 2005). Asexuální způsob rozmnožování bývá důležitým faktorem přispívající k udržení populace druhu na dané lokalitě (Ceplitis 2001).

Další fenoménem je přežívání a udržování druhu na lokalitě u velmi malých populací. I v této práci jsou zahrnuty populace čítající průměrně 10 až 50 jedinců. Jsou jimi například populace číslo 3 a 7. Otázkou je, jak toto složení populace může ovlivňovat produkci generativního potomstva. Zde může mít vegetativní propagace spolu s existující možností prolomení autoinkompatibility velký význam pro udržení se na daném stanovišti. Podle obecných poznatků jsou malé populace silně ohroženy působením genetického driftu a inbridingu (Ellstrand & Elam 1993). Avšak v případě polyploidů je toto nebezpečí daleko menší. Pouze velmi malé procento potomků tetraploidů, kteří jsou produkty samoopylení, je homozygotních (Briggs & Walters 2001). Jak ale ukázala práce Jírové (Jírová 2007), samoopylení není vlastností typickou pro tento druh česneku. Tato schopnost byla prokázána experimentálně pouze u hexaploidního cytotypu. Přesto nelze vyloučit, že zde existuje možnost fungování tzv. mentor efektu, který ale Jírová (2007) díky úplné kastraci květů v jejím experimentu nemohla prokázat.

Podstatnou otázkou je i jaký vliv má samotné cytotypové složení populací na reprodukční charakteristiky (tj. proporce abortovaných/neabortovaných květů/semenných), které stojí za úspěšnou produkcí životaschopného generativního potomstva. Výše popsané výsledky ukázaly, že ploidní kompozice populace není rozhodující faktor pro úspěšnost v produkci generativního potomstva, avšak ploidie mateřské rostliny ano. Nicméně byla detekována velká variabilita v rámci jednotlivých populací, což může významně ovlivňovat prezentované výsledky, a proto je nutné k nim přistupovat obezřetně. Celkově se data pro počty abortovaných a neabortovaných květů/semenných a úspěšnost květů víceméně shodují s výsledky Ohryzka (2007). To znamená, že tetraploidi tvoří více neabortovaných semen než zbylé dva cytotypy a tento trend byl zaznamenán i pro semena abortovaná. Nutno však podotknout, že Ohryzek (2007) pracoval s rostlinami pěstovanými na experimentálním pozemku s možností volného sprášení všemi možnými cytotypy.

Celkově se dá říci, že i přestože mají tetraploidi vyšší produkci semen na květ než penta- a hexaploidi, produkují i vyšší procento abortovaných semen. Mezi pentaploidy a tetraploidy byla zjištěna shoda v produkci neabortovaných květů, avšak pentaploidi mají celkově méně vyprodukovaných semen na květ. To může souviset právě s lichým počtem chromosomových sad v jádrech somatických buněk a nevyrovnaným průběhem mikrosporogeneze (Fialová 1996). Zajímavá je i situace u hexaploidů, kde byla sice zaznamenána (velmi) nízká produkce květů i semen, ale pokud bychom měřili úspěšnost na úrovni květů, pak jsou hexaploidi úspěšnější než ostatní studované cytotypy. Nicméně skutečný úspěch je v tomto směru závislý spíše na počtu vyklíčených semen a přežívajících semenáčků, neboť míra pylové a semenné fertility je rámci jednotlivých polyploidních druhů velmi variabilní a pohybuje se v rozsahu od 0 % do 100 % (Ramsey & Schemske 2002).

6.3 Klíčení semen a dormance

Klíčení semen bylo založeno na poznatcích, které v tomto směru přinesly práce Åström & Hægström (2004) a Ohryzek (2007). Semena tak byla klíčena za stejných podmínek, jaké popisují uvedení autoři, tj. při 7 °C za stálé tmy. Dá se říci, že tyto podmínky dobře simulují situaci v přírodním prostředí, která nastává v průběhu podzimu a časného jara.

Vlivem působení nízké teploty v průběhu germinace došlo k prolomení dormance semen, což umožnilo jejich vyklíčení (Phillips 2010). Avšak i přes tuto iniciaci zůstalo ve vzorcích menší procento nevyklíčených semen. Thompson et al. (1997) uvádějí, že *A. oleraceum* má transientní banku semen, tj. semena přetrvávají v půdě méně než jeden rok.

Data v této práci ukazují, že jistá část vyšetých semen nebyla na konci experimentu mrtvá, ale živá, patrně v dormantním stavu. Pro jednotlivé cytotypy byly zaznamenány tyto průměrné hodnoty proporcí dormantních semen: pro 4x 4,6 %, pro 5x 3,5 % a pro 6x 8,0 %. I přesto, že hexaploidi mají celkově větší podíl dormantních semen, statistické analýzy ukázaly pouze slabě signifikantní výsledek. Podstatnou otázkou je, jak dlouhou dobu by tato semena mohla přetrvávat v dormantním stavu a zdali by vůbec byla schopná vyklíčit? Podobnou problematikou se zabývala i Ronsheim (1994) u morfologicky podobného druhu *A. vineale*. Ta porovnávala klíčivost semen v laboratoři a v přírodních podmínkách. Došla k závěru, že semena uchovaná v laboratorních podmínkách jsou schopna vyklíčit i po třech letech, zatímco v přirozených podmínkách si zachovávají klíčivost pouze po dobu jednoho roku. Je známo, že se zvyšující se dobou dormance, resp. setrváním v semenné bance, dochází ke hromadění chromosomálních aberací v buňkách zárodku. U dané kohorty semen v semenné bance tak s věkem dochází ke hromadění chromosomálních mutací, které mají za následek pokles životaschopnosti propagulí až o 50 % (Levin 2002). Je pravděpodobné, že toto je jednou z možných příčin nízkého počtu dormantních semen u *A. oleraceum*. Bylo by vhodné v budoucnosti jev otestovat otestovat neboť mohl poskytnout zajímavé informace o době, po kterou jsou semena schopna přetrvávat v dormantním stavu.

Na sledované charakteristiky (tj. počet vyklíčených, mrtvých a dormantních semen) nemělo zásadní vliv cytotypové složení populace, avšak variabilita mezi jednotlivými populacemi byla velká. Příkladem toho může být populace číslo 2, která se v procentu vyklíčených semen významně odchylovala od všech ostatních homogenních tetraploidních populací, čímž výrazně ovlivňovala výsledek statistických analýz. Zajímavé je, že semena z této populace na první pohled nejevila známky aborce nebo nedostatečně vyvinutého endospermu. Avšak při vyhodnocení proporce mrtvých a dormantních semen dosahovaly oba parametry vysokých hodnot. Nutno podotknout, že v tomto případě nebyl výsledek ovlivněn nízkým počtem testovaných semen, jako například u populace číslo 10. Není jisté, co bylo příčinou tak nízkých hodnot klíčivosti. Avšak v tomto případě byly sběry propagulí provedeny pouze v jednom roce a tak je možné, že v průběhu sezóny mohlo dojít k působení nějakého faktoru, který zapříčinil tak vysokou letalitu semen. Takové faktory mohou mít fyzikální, ale i chemickou podstatu (Jain 2010). Další možností je, že rostliny s dozrávajícími semeny byly sbírány příliš brzy a semena tak nemohla řádně dokončit svůj vývoj.

Bez ohledu na anomální chování populace číslo 2 se proporce vyklíčených semen pro jednotlivé ploidy významně nelišily. Průměrný počet vyklíčených semen se pro 5x a 6x cytotyp pohyboval okolo 75 %, zatímco u 4x byla tato hodnota nižší - 65,2 % vyklíčených

semen. Tento výsledek je ve shodě se zjištěním Åströma & Hæggröma (2004). Ti uvádějí významně nižší průměrné procento vyklíčených semen v případě tetraploidů (51,8 %) než pro pentaploidy (68,1 %). Nízké procento vyklíčených tetraploidů je ve shodě i se zjištěním Ohryzka (2007), který však uvádí o něco vyšší průměrné hodnoty pro jednotlivé cytotypy: pro tetraploidy 70 %, pro pentaploidy 79 % a pro hexaploidy 80 %. Avšak když byl spočítán celkový počet fertálních semen (tj. vyklíčená + dormantní), došlo k výraznému vzestupu průměrných hodnot. Tetraploidní rostliny tak průměrně vyprodukovaly 70 %, pentaploidní 79 % a hexaploidní rostliny 83 % fertálních semen. Rozdíly v prezentovaných výsledcích mohou být zapříčiněny charakterem studovaných populací, neboť byla v průběhu celého experimentu zaznamenána velká variabilita mezi jednotlivými populacemi. Navíc rostlinný materiál použitý v případě práce Ohryzka (2007) pocházel z experimentálního pozemku, kde mohlo docházet k volnému sprášení mezi cytotypy. Přesto se ale všechny práce shodují v nižším procentu vyklíčených semen tetraploidů oproti vyšším cytotypům. Tento výsledek spolu s nízkým procentem dormantních semen je velmi zvláštní a bude zapotřebí jej ještě prověřit.

6.4 Cytotypová kompozice generativního potomstva a původ smíšených populací

Jak ukázaly výsledky průtokové cytometrie, je schopen druh *Allium oleraceum* produkovat cytotypově variabilní generativní potomstvo. Tato variabilita byla zjištěna mezi semeny i semenáčky, které byly vyprodukovány 4x; 5x i 6x mateřskými rostlinami.

V případě tetraploidních mateřských rostlin byly s největší frekvencí produkovány 4x (86,5 %) semena a již v daleko méně případech byly zaznamenány i jiné cytotypy, jako jsou 3x (1,0 %), 5x (8,3 %), 6x (1,6 %) a 7x (2,6 %). Nepřítomnost 8x cytotypu, který by mohl vzniknout následkem splynutí dvou neredukovaných gamet tetraploidních rostlin ($4x + 4x$) je patrně zapříčiněna extrémně nízkou pravděpodobností splynutí a následnou neaborcí dvou neredukovaných gamet. Ramsey & Shemske (1998) uvádějí, že frekvence vzniku tetraploidů splynutím dvou $2n$ gamet je velmi nízká, a to pouze v 0,0025 % případů. Obdobná situace byla například zaznamenána i při umělém křížení mezi tetraploidními jedinci u *Hieracium echinoides* (Peckert & Chrtek 2006). V tomto experimentu byly mezi potomky přítomny pouze tetraploidní a v menší míře i hexaploidní rostliny, které vznikly následkem splynutí redukovaných a neredukovaných gamet. Výskyt oktaploidů nebyl zaznamenán (Peckert & Chrtek 2006). Velmi překvapující je i přítomnost triploidních a heptaploidních potomků, zvláště pak v homogenních populacích. Nicméně variabilita popsaná mezi semeny již není zaznamenána mezi napěstovanými semenáčky. Výjimku tvoří pouze smíšená (4x;6x)

populace 17, kde bylo kromě tetraploidů změřeno i po jedné rostlině 5x, 6x a 7x. Avšak tento výsledek je založen na větším počtu vzorků, než se kterými bylo pracováno v ostatních případech, a tak může vypovídat o nízké pravděpodobnosti, s jakou se tyto cytotypy v potomstvu vyskytují. Zjištěný ploidní charakter semen nasvědčuje, že neredukované gamety mohou být produkovány v průběhu meiotického dělení.

Uvedené cytotypy byly s různou frekvencí zaznamenány ve smíšených i homogenních populacích. To je zajímavé neboť přítomnost takto variabilního potomstva v homogenních populacích může svědčit o velmi nepravidelném průběhu meiotického dělení tak, jak jej popsala Fialová (1996) a Levan (1933). Zároveň naprostá absence těchto cytotypů mezi semenáčky ukazuje na silnou selekci působící proti takovým chromosomovým počtům, díky čemuž by mohl být zachován homogenní charakter populace. Avšak tento výsledek je založen na velmi nízkém počtu změřených semenáčků a není vyloučeno, že v dalších měřeních budou odhaleny i jiné cytotypy. V případě smíšených populací by se sledovaná variabilita již dala vysvětlit přítomností druhého (druhých) cytotypu a jeho příspěvkem (pylem) do generativního rozmnožování. Zajímavá je úplná absence 6x a 7x cytotypu mezi semeny tetraploidů ve smíšených populacích 4x;5x, kde by tyto cytotypy mohly vznikat v důsledku opylení pentaploidy. Nicméně mezi fetilními rostlinami těchto populací byla 5x rostlina zaznamenána pouze v jednom případě, a bylo by tedy možné uvažovat i o možnosti, že se tento cytotyp na generativním rozmnožování podílí pouze vzácně.

Ani v případě smíšených populací (tj. 4x;5x, 4x;6x, 4x;5x;6x) nebyly mezi semenáčky zaznamenány jiné cytotypy než tetraploidní. Výjimku tvoří pouze již výše popsáný případ v populaci 17 (4x;6x), na jehož základě by se dalo usuzovat, že vznik smíšené populace touto cestou by byl velmi vzácnou událostí.

Pro generativní potomstvo pentaploidních mateřských rostlin byla zjištěna podobná situace. Mezi semeny byla s největší frekvencí produkována 5x semena (68,9 %). Dále pak významné procento potomků mělo 6x charakter (22,6 %). Ve zbylých případech byla produkována 4x (7,3 %); 7x (0,6 %) a dokonce i 8x semena (0,6 %). Situace mezi semenáčky byla poněkud odlišná. Na této úrovni došlo ke vzestupu ve frekvenci výskytu 5x (80 %) cytotypu. Ale v případě 6x (3,4 %) cytotypů byl zaznamenán výrazný pokles jeho početnosti v potomstvu. Naopak zastoupení 4x (15,2 %) významně vzrostlo. Kromě těchto cytotypů se mezi semenáčky udržovalo i malé procento 7x (1,4 %) rostlin. Je nutné podotknout, že soubor byl v počtu změřených semen a semenáčků značně nevyvážený. Nicméně v rámci homogenních populací je produkováno potomstvo různé ploidní úrovně od 4x až po 7x. Tento výsledek opět odpovídá pozorování Fialové (1996), které hovoří o vysoce nepravidelném

průběhu meiotického dělení pentaploidů, na jehož konci je produkován pyl s variabilním eu- a aneuploidními chromosomovými počty v rozmezí $n = 15$ až 23 . Zajímavý je výskyt hexaploidů mezi semeny i semenáčky. Ty pravděpodobně reprezentují produkty splynutí dvou $3x$ gamet, jedné $4x$ a $2x$ gamety nebo různé kombinace aneuploidních a euploidních chromosomových sad. To by mohlo vysvětlovat jejich výrazný pokles mezi semenáčky vlivem chromosomální nerovnováhy způsobené aneuploidii. Ve smíšených populacích (zde $5x;6x$) nastává podobná situace. Zde by se na produkci generativního potomstva mohli podílet i hexaploidi, o čemž nasvědčuje přítomnost jednoho $8x$ mezi semeny. Stejně jako v homogenních populacích zde dochází k výraznému poklesu hexaploidů mezi semenáčky. O možném vlivu anomálních chromosomových počtů na cytotypové složení semenáčků vypovídá i nalezení pěti aneuploidních jedinců vyprodukovaných pentaploidními mateřskými rostlinami. Navíc tito jedinci byli průtokovým cytometrem přiřazeni ve čtyřech případech k tetraploidnímu cytotypu a v jednom k pentaploidnímu cytotypu. Není tedy vyloučeno, že se takových aneuploidních rostlin mezi semenáčky nachází více. Přítomnost aneuploidního jedince mezi semenáčky pentaploidních rostlin zaznamenala i Fialová (1996). Bohužel je málo známo o frekvenci výskytu aneuploidů mezi adultními jedinci v přírodních populacích, protože počty analyzovaných rostlin pomocí klasických karyologických technik nejsou vysoké, ale dosavadní údaje nasvědčují, že bude patrně nízká, protože žádná z dosud publikovaných studií (viz Duchoslav et al. 2010) aneuploidní dospělé jedince nezjistila. Překvapující je i dominantní zastoupení pentaploidního cytotypu mezi semeny i semenáčky. To by mohlo poukazovat na některý ze způsobů apomixie (Åström & Hægström 2004). Avšak výsledky z průtokové cytometrie (FCSS kap. 5.8) poukazují spíše na sexuální reprodukci. Spíše lze tedy říci, že pentaploidní smena jsou produkty splynutí $3x$ a $2x$ gamet, což pravděpodobně poukazuje na jejich intenzivní tvorbu v průběhu meiotického dělení.

V generativním potomstvu hexaploidních rostlin převažoval opět cytotyp mateřské rostliny, $87,7 \%$ v případě semen a $67,6 \%$ v případě semenáčků. Druhým nejfrekventovanějším cytotypem byli pentaploidi, kteří mezi semeny byli zaznamenáni v $6,6 \%$ případů a mezi semenáčky v $32,4 \%$ případů. Mezi semeny byli ještě navíc nalezeni i hepta- ($3,8 \%$) a oktoploidi ($1,9 \%$), a to pouze v rámci smíšených populací ($5x;6x$ a $4x;5x;6x$), kde k jejich vzniku mohl přispět i další cytotyp. Výrazné zastoupení $5x$ a $6x$ mezi semeny i semenáčky umožňuje předpokládat, že hexaploidi pravděpodobně produkují převážně tetraploidní, triploidní a diploidní gamety.

Otázkou je, jak tyto zjištěné konstituce cytotypů v generativním potomstvu mohou přispívat do ploidního složení jednotlivých populací. V experimentálních podmínkách

většinou dobře přežívali tetraploidní, pentaploidní i hexaploidní semenáčky bez ohledu na ploidní úroveň mateřské rostliny. Naopak jen výjimečně přežívali i heptaploidní jedinci, avšak jejich růst byl velmi pomalý. Jiné cytotypy nebyly mezi semenáčky detekovány.

Homogenní populace vznikly pravděpodobně jako výsledek migrace propagulí na nové stanoviště nebo v místě výskytu smíšené populace po vymizení jednoho z cytotypů.

Původ smíšených populací je možné vysvětlit dvojím způsobem. Buď mohly vzniknout jako důsledek sekundárních kontaktů mezi dříve allopatricky se vyskytujícími cytotypy (Petit et al. 1999) nebo primárně přímo uvnitř populace některé z ploidních úrovní (Ramsey & Schemske 1998).

Nad původem cytypově smíšených populací *A. oleraceum* uvažují ve své práci Šafářová & Duchoslav (2010). Autoři zvažují možný polytopický vznik smíšených populací 4x;6x a 4x;5x;6x zapříčiněný fúzí redukovaných a nerdukovaných gamet. Tento fakt podporuje i celkem omezená distribuce hexaploidů v rámci Evropy (Duchoslav et al. 2010) a jejich přítomnost mezi generativními potomky tetra- i pentaploidů prezentovaná v této práci. Vznik smíšených populací touto cestou připouští i Marhold et al. (2009): v rámci polyploidního komplexu rodu *Cardamine* se objevují tetraploidní populace se sporadickým výskytem hexaploidů, což může nasvědčovat vzniku *in situ*. Z výsledků prezentovaných v této práci je patrné, že rostliny homogenních tetraploidních populací jsou schopni produkovat cytypově variabilní potomstvo. Nicméně tato variabilita již nebyla zachycena mezi semenáčky. Bohužel je toto pozorování založeno na extrémně nízkém počtu změřených semenáčků a tak není možné vyloučit, že při větším počtu opakování by byl výsledek odlišný. Jak je vidět na populaci číslo 17, která se dá z důvodu velmi nízkého počtu fertálních hexaploidních rostlin považovat téměř za homogenní, zůstává generativní potomstvo převážně tetraploidní. Pouze ve třech případech byl zaznamenán jiný cytotyp než mateřský. Není jisté, zdali je tato extrémně vzácná frekvence výskytu hexaploidů a případně i pentaploidů postačující pro zformování smíšených populací 4x;6x a 4x;5x;6x. Avšak sporadický výskyt hexaploidů v rámci 4x;6x populací je ve shodě se zjištěním Marholda et al. (2009) a Qu et al. (2010), kteří primární vznik populací této cytypové kombinace připouštějí.

Vzhledem k tomu, že mezicytypová hybridizace není v přírodě vzácnou událostí (Ramsey & Schemske 1998), je možné uvažovat o vzniku dalších typů smíšených populací. V případě populací 4x;5x;6x mohlo dojít k jejich formaci třemi možnými způsoby: 1. V rámci 4x;6x populace došlo ke zpětné hybridizaci hexaploidů s tetraploidy. 2. Pentaploidní rostliny byly produkovány pouze tetraploidy bez přispění hexaploidů ve smíšené populaci 4x;6x.

3. Tetraploidní rostliny mohly být produkovány pentaploidy ve smíšené populaci 5x;6x. V prvních dvou případech by se dle výše uvedených výsledků jednalo o velmi vzácnou událost. Hexaploidy produkují celkově malé množství květů, což zvyšuje význam vegetativního rozmnožování pro tuto ploidní úroveň. Tuto hypotézu podporují i výsledky Staňkové (2005), která zjistila malou genetickou variabilitu 6x ve smíšených populacích s dominancí 4x rostlin. Naopak tetraploidy a pentaploidy byly z tohoto hlediska značně variabilní, což může souviset s větší produkcí květů a o něco větším počtem neabortovaných semen. Nejpravděpodobnější je proto možnost 3. A to i vzhledem k: (i) frekvenci, s jakou se vyskytují pentaploidy a tetraploidy ve smíšených 4x;5x;6x populacích; (ii) ploidnímu charakteru generativního potomstva, které produkují pentaploidy; (iii) všeobecnému rozšíření pentaploidů.

Šafářová & Duchoslav (2010) uvádějí, že v případě 4x;5x a 5x;6x populací je jejich primární vznik již obtížněji vysvětlitelný kvůli nepřítomnosti třetího cytotypu, značné cytotypové variabilitě uvnitř i mezi populacemi a častému sympatrickému výskytu s homogenními populacemi chybějícího cytotypu. Vzhledem k ploidnímu charakteru generativního potomstva pentaploidů je možné uvažovat o primárním vzniku těchto populací. V případě hexaploidů by mohlo docházet k jejich formaci přes fúzi 3x a 3x; 4x a 2x gamet a možná i 5x a 1x gamet za předpokladu, že jsou tvořeny neredukované a haploidní gamety. Navíc tvorba haploidních gamet (1 Cx) v průběhu meiosis nebyla zaznamenána (Fialová 1996). Poněkud komplikovanější může být vznik tetraploidních jedinců. Ty jsou pravděpodobně formovány jako produkty splynutí 2x a 2x gamet. Dalo by se uvažovat i o fúzi 3x a 1x gamet nebo o možném partenogenetickém vývoji 4x vaječné buňky. Avšak tato možnost je vysoce spekulativní. Široká distribuce pentaploidů (Šafářová 2004) a jejich nízká frekvence v některých 4x;5x populacích dává příležitost uvažovat o možném sekundárním kontaktu mezi těmito cytotypy. Obdobně i v případě některých 5x;6x populací lze tuto možnost připustit stejně jako jejich primární vznik skrz potomstvo hexaploidů, u kterých byla zaznamenána produkce pentaploidních potomků i v homogenních populacích.

Nicméně toto jsou výsledky pro experimentální pozemek a je velmi málo známo o možném přežívání semenáčků v přirozených podmínkách, kde se musejí navíc vyrovnat s konkurenčním tlakem vegetativně vzniklých jedinců. Podobným problémem se zabýval Ceplitis (2001), který zkoumal význam sexuální a asexuální reprodukce pro evoluci druhu *Allium vineale*. Jeho výsledky poukazují na převahu vegetativního rozmnožování stejně jako tomu je v případě *A. oleraceum* (Fialová 2005). Avšak podle molekulární analýzy chloroplastové DNA neodpovídá složení populací klonální struktuře, která by byla typická

pro čistě asexuální reprodukci druhu. Autor to vysvětluje tím, že vlivem silné fluktuace ve vitalitě semen a pacibulek může docházet během evoluce k formaci a udržení vyrovnaného reprodukčního systému zahrnujícího sexuální i asexuální reprodukci (Bengtsson & Ceplitis 2000). Navíc udržení generativní reprodukce může být rozhodující pro lokální adaptaci při šíření na nová stanoviště (Ceplitis 2001). Podobnou studii by bylo vhodné provést i pro *A. oleraceum*, neboť je zajímavé, že ačkoliv je generativní potomstvo cytotypově variabilní, zdá se, že se tato variabilita neprojevuje v přírodních populacích. Dokazuje to i pozorování napěstovaných experimentálních rostlin, jehož výsledky jsou uvedené v kap. 5.6. Mezi generativními potomky panuje značná variabilita v počtu a barvě květů. Tato variabilita byla zaznamenána jak mezi potomky jedné rostliny, tak i v rámci potomstva jedné populace. Například u tetraploidních mateřských rostlin populace 17 byla produkována celá škála potomků od rostliny nemající v květenství žádné pacibulky až po rostliny nemající v květenství žádné květy. Navíc všichni tito jedinci měli tetraploidní charakter. Podobná variabilita je běžně popisována i v rámci druhu *Allium vineale* (Ronsheim & Bever 2000). Zajímavé je zejména vypěstování rostliny pouze s květy a bez pacibulek, která zatím v přírodních populacích nebyla nikdy zaznamenána. Přitom přítomnost pacibulek je rozhodující znak oddělující *A. oleraceum* od příbuzného druhu *A. paniculatum* (Levan 1933). Asker & Jerling (1992) uvádějí, že tvorba pacibulek je patrně kontrolována jedním dominantním genem. Je tedy pravděpodobné, že může jít o recesivní homozygotní stav tohoto znaku. Nicméně mohlo dojít i k umlčení nebo vyřazení tohoto genu vlivem působení některých z genetických či epigenetických událostí.

6.5 Selektce

Z uvedených výsledků je zřejmé, že selektce má pravděpodobně velký vliv na cytotypové složení přírodních populací *Allium oleraceum*. V celém experimentu byla zaznamenána na všech studovaných ontogenetických úrovních, tj. fertilní rostliny, semena, klíčení semen a semenáčky. Z výše uvedených výsledků (kap. 5.1 až 5.5) je možné usuzovat na trend, kdy pravděpodobně dochází k poklesu počtu neobvyklých a nevyrovnaných cytotypů v jednotlivých ontogenetických vývojových stádiích. Poukazují na to zejména procenta abortovaných semen, mrtvých semen zaznamenaných v průběhu germinace, rozdíl v zastoupení cytotypů mezi semeny/semenáčky a množství přežívajících dospělých rostlin vypěstovaných ze semenáčků.

Produkce semen je často limitována velikostí populace, živinami, množstvím a kvalitou pylu (tj. vyrovnané chromosomové počty; klíčivost pylu), které jsou v daném čase k dispozici (Haig & Westoby 1988; Campbell & Halama 1993; Hensen et al. 2004). Je vysoce pravděpodobné, že i v případě populací prezentovaných v této práci působí na produkci generativního potomstva stejné mechanismy. Cytotypová kompozice semen je tak výsledkem působení těchto a patrně dalších, méně známých faktorů (viz populace 2).

Výrazné rozdíly v zastoupení ploidních úrovní mezi semeny a semenáčky (např. nepřítomnost 7x a 8x mezi semenáčky hexaploidů nebo výrazný cytotypově homogenní charakter semenáčků tetraploidů) svědčí o silné selekci působící proti některým genetickým a genomovým kombinacím v průběhu klíčení a časných vývojových stádiích semenáčků. Podobný výsledek byl zaznamenán i v práci Krahulec et al. (2006). O něco mírnější selekce již probíhá mezi semenáčky, jak je vidět z počtu přežívajících a kvetoucích jedinců v kap. 5.5.

V přírodních populacích se k výše uvedeným faktorům přidává ještě vliv rodičovského cytotypu, který je hlavním činitelem v procesu minoritní cytotypové nevýhody (Levin 1975). Je možné, že i díky působení silné rodičovské konkurence může dojít k vyloučení nových cytotypových kombinací. To by mohlo částečně vysvětlovat nepřítomnost některých ploidních úrovní v přírodních populacích *A. oleraceum*. Avšak jak ukazují recentnější práce je koexistence cytotypů ve smíšených populacích výsledkem působení daleko složitějších genetických, ekologických a fyziologických procesů (Baack & Stanton 2005). V tomto směru je tedy třeba ještě dalšího výzkumu.

7. ZÁVĚR

Výsledky prezentovaného experimentu jsou ovlivněny velkou variabilitou generovanou v rámci jednotlivých populací a nevyrovnanými počty analyzovaných rostlin, semen i semenáčků. Bohužel tyto skutečnosti nebylo možné předvídat ani ovlivnit. I přes tyto nedostatky je možno uvést, že v průběhu experimentu bylo zjištěno:

1. Převažujícím způsobem rozmnožování (mimo vegetativní propagace) *Allium oleraceum* je pravděpodobně sexuální reprodukce. Pro nepřítomnost endospermu na některých grafických výstupech z průtokového cytometru nebylo zatím stanoveno jasné vysvětlení.
2. Mateřské rostliny všech cytotypů produkují cytotypově variabilní potomstvo a to ve smíšených i homogenních populacích.

3. Na výsledné cytotypové kompozici přežívajícího potomstva se podílejí selekční mechanismy působící proti nevyváženým genetickým a chromosomovým kombinacím na všech ontogenetických vývojových fázích (tj. oplození a tvorba semen, klíčení semen, přežívání semenáčků a dospělých rostlin).
4. Mezi přežívajícími generativními potomky byly zjištěny aneuploidní chromosomové počty. Ve výjimečných případech přežívaly i rostliny neobvyklé ploidní úrovně (tj. 7x).
5. Cytotypová kompozice populací je výsledkem působení kombinace primárních a sekundárních kontaktů. Homogenní populace pravděpodobně vznikly uchycením distribuovaných propagulí dané ploidní úrovně na novém stanovišti nebo vymizením druhého (druhých) cytotypů z populace. 4x;6x populace vznikly pravděpodobně *in situ* fúzí redukovaných a nerdukovaných gamet podobně jako některé 5x;6x nebo 4x;5x. U 5x;6x a 4x;5x populací se na jejich vzniku mohly podílet i sekundární kontakty mezi homogenními populacemi. Smíšené populace 4x;5x;6x vznikly pravděpodobně v důsledku produkce 4x cytotypu v rámci 5x;6x smíšených populací.

V budoucí práci bude nutné se zaměřit na:

1. Prověření způsobu rozmnožování a vysvětlení možné „zdánlivé“ nepřítomnosti endospermu v některých semenech.
2. Experimentální zjištění podílu minoritních cytotypů na produkci a generování cytotypové variability generativního potomstva.
3. Přežívání semenáčků v přírodních populacích.
4. Zjištění skutečného vlivu generativního potomstva na genetickou variabilitu jednotlivých populací.

LITERATURA

- Ahuja M. R. (2005): Polyploidy in Gymnosperm: Revisited. – *Silvae Genetica* 54: 59-69.
- Ainouche M. L., Baumel A., Salmon A. (2004): *Spartina anglica* C. E. Hubbard: a natural model system for analysing early evolutionary changes that affect allopolyploid genomes. – *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 475-484.
- Anonym (1910): Hybrids raised at Kew. – *Bulletin of Miscellaneous Information* 1910: 321–328.
- Ao C. (2008): Chromosome numbers and karyotypes of *Allium przewalskianum* populations. – *Acta Biologica Cracoviensia* 50: 43–49.
- Asker S. E., Jerling L.J. (1992): Apomixis in plants. – CRC Press Florida.
- Åström H., C.A. Hæggeström (2004): Generative reproduction in *Allium oleraceum* (Alliaceae). – *Annales Botanici Fennici* 41: 1-14.
- APG (1998): An ordinal classification for the families of flowering plants. – *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 531–553.
- APG III. (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* 161: 105–121.
- Baack E. J., Stanton M. L. (2005): Ecological factors influencing tetraploid speciation in snow buttercups (*Ranunculus adoneus*): Niche differentiation and tetraploid establishment. – *Evolution* 59: 1936-1944.
- Baroux C., Spillane Ch., Grossniklaus U. (2002): Evolutionary origins of the endosperm in flowering plants. – *Genome Biology* 3: 1-5.
- Bazzaz F. A., Carlson R. W. (1979): Photosynthetic contribution of flowers and seeds to reproductive effort of an annual colonizer. – *New Phytologist* 82: 223-232.
- Beaulieu J. M., Moles A. T., Leitch I. J., Bennett M. D., Dickie J. B., Knight C. A. (2006): Correlated evolution of genome size and seed mass. – *New Phytologist* 173: 422-437.
- Beaulieu J. M., Leitch I. J., Patel S., Pendharkar A., Knight Ch. A.(2008): Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperm. – *New Phytologist* 179: 975-986.99
- Bengtsson B. O., Ceplitis A. (2000): The balance between sexual and asexual reproduction in plants living in variable environments. – *Journal of Evolutionary Biology* 13: 415–422.
- Bennett M. D. (2004): Perspectives on polyploidy in plants – ancient and neo. – *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 411-423.

- Brat S. V. (1965): Genetic systems in *Allium*; I. chromosome variation. – *Chromosoma* 16: 486–499.
- Briggs D., Walters S. M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. – Univerzita Palackého Olomouc.
- Brochmann C., Bristing A.K., Alsos I. G., Borgen L., Grundt H. H., Scheen A. C., Elven R. (2004): Polyploidy in arctic plants. – *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 521–536.
- Brownlie G. (1957): Chromosome numbers in New Zealand Ferns. – *Transactions of the Royal Society of New Zealand* 85: 213–216.
- Campbell D. R., Halama K. J. (1993): Resource and pollen limitations to lifetime seed production in a natural plant population. – *Ecology* 74: 1043–1051.
- Ceplitis A. (2001): The importance of sexual and asexual reproduction in the recent evolution of *Allium vineale*. – *Evolution* 55: 1581–1591.
- Clausen R. E., Goodspeed T. H. (1925): Intraspecific hybridization in *Nicotiana*. II. A tetraploid *glutinosa-tabacum* hybrid, an experimental verification of Winge's hypothesis. – *Genetics* 10: 278–284.
- Coates D. J., Byrne M. (2005): Genetic variation in plant populations: assessing cause and pattern. In: Henry R. J. [eds.]: *Plant diversity and evolution: Genotypic and phenotypic variation in higher plants*. Southern Cross University, Lismore, Australia, p. 139–164.
- Dafni A., Cohen D., Noy-Meir I. (1981): Life-cycle variation in geophytes. – *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68: 652–660.
- De Sarker D.; Johnson M. A. T., Reynolds A., Brandham P.E. (1997): Cytology of the highly polyploid disjunct species, *Allium dregeanum* (Alliaceae) and of some Eurasian relatives. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 124: 361–373.
- De Vries H. (1914): The probable origin of *Oenothera Lamarckiana* ser. – *Botanical Gazette* 57: 345–361.
- 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.
- Doležel J., Lucretti S., Macas J. (1997): Analýza a třídění chromozomů rostlin pomocí průtokové cytometrie. – *Biologické listy* 62: 131–160.
- Dostál J. (1989): Nová květena ČSSR 2. – *Academia, Praha*, p. 1214–1224.

- Duchoslav M. (2000): Srovnávací ekologie *Allium oleraceum* a *Allium vineale*. [PhD thesis, depon. in: Knihovna katedry botaniky, PřF UP Olomouc].
- Duchoslav M. (2001): *Allium oleraceum* and *A. vineale* in the Czech Republic: distribution and habitat differentiation. – *Preslia* 73: 173–184.
- 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: 719–735.
- Dynesius M., Jansson R. (2000): Evolutionary consequences of changes in species' geographical distributions driven by Milankovitch climate oscillations. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 9115-9120.
- Ellis R. H., Hong T. D., Roberts E. H. (1985): Handbook of seed technology for genebanks. – Rome.
- Ellstrand N. C., Elam D. R. (1993): Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- Fialová M. (2005): Variabilita reprodukčních parametrů sexuálně a asexuálně vzniklého potomstva *Allium oleraceum* [Master thesis, depon. in: Knihovna katedry botaniky, PřF UP Olomouc].
- Fialová R. (1996): Polyploidní komplexy u rodu *Allium* [PhD thesis, depon. in: Knihovna katedry botaniky, PřF UP Olomouc].
- Fowler N. L., Levin D. A. (1984): Ecological constraints on the establishment of a novel polyploid in competition with its diploid progenitor. – *The American Naturalist* 124: 703–711.
- Francis D., Davies M. S., Barlow P. W. (2008): A strong nucleotypic effect on the cell cycle regardless of ploidy level. – *Annals of Botany* 101: 747-757.
- Friesen N., Borisjuk N., Mes T. H. M., Klaas M., Hanelt P. (1997): Allotetraploid origin of *Allium altynolicum* (Alliaceae, *Allium* sect. *Schoenoprasum*) as investigated by karyological and molecular markers. – *Plant Systematics and Evolution* 206: 317–335.
- Gates R.R. (1908): Study of reduction in *Oenothera rubrinervis*. – *Botanical Gazette* 46: 1-34.
- Gerilhuber J., Doležel J., Lysák M. A., Bennett M. D. (2005): The origin, evolution and proposed stabilization of the 'Genome Size' and 'C-Value' to describe nuclear DNA contents. – *Annals of Botany* 95: 255–260.

- Grant V. (1982): Periodicities in the chromosome numbers of the Angiosperms. – *Botanical Gazette* 143: 379–389.
- Guo M., Davis D., Birchler J. A. (1996): Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. – *Genetics* 142: 1349–1355.
- Haig D., Westoby M. (1988): On limits to seed production. – *The American Naturalist* 131: 757-759.
- Hensen I., Oberprieler Ch., Wesche K. (2004): Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla vulgaris* Mill. (Ranunculaceae) in Central Germany. – *Flora* 200: 3-14.
- Hilu K. W. (1993): Polyploidy and the evolution of domesticated plants. - *American Journal of Botany* 80: 1492–1499.
- Hull-Sanders H.M., Johnson R. H., Owen H. A., Meyer G. A. (2009): Effect of polyploidy on secondary chemistry, physiology, and performance of native and invasive genotypes of *Solidago gigantea* (Asteraceae). – *American Journal of Botany* 96: 762–770.
- Husband B. C. (2004): The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. – *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 537–546.
- Husband B. C.; Schemske D. W. (1998): Cytotype distribution at a diploid-tetraploid contact zone in *Chamerion (Epilobium) angustifolium* (Onagraceae). – *American Journal of Botany* 85: 1688-1694.
- Jandová M. (2008): Neopolyploidie u rostlin: mechanismy vzniku a její důsledky. [Bachelor thesis, depon. in: Knihovna katedry zoologie, PřF UP Olomouc].
- Jalas J.(1965): Suuri Kasvikirja I. – Kustannusosakeyhtiö Otava, Helsingissä.
- Jain S. M. (2010): Mutagenesis in crop improvement under the climate change. – *Romanian Biotechnological Letters* 15: 88-106.
- Jírová A. (2007): Reprodukční biologie a fenologie polyploidního komplexu *Allium oleraceum* [Master thesis, depon. in: Knihovna katedry botaniky, PřF UP Olomouc].
- Kao R. H. (2007): Asexuality and coexistence of cytotypes. – *New Phytologist* 175: 764-772.
- Kapraun D. F. (2005): Nuclear DNA content estimates in multicellular green, red and brown algae: phylogenetic considerations. – *Annals of Botany* 95: 7-44.
- Kermicle J. L., Alleman M. (1990): Gametic imprinting in maize in relation to the angiosperm life cycle. – *Development (Supplement)* 4: 9-14.
- Khoshoo T. N. (1959): Polyploidy in Gymnosperms. – *Evolution* 13: 24–39.

- Kim B. J., Kwon Y. C., Kwack Y. H., Lim M. S., Park E. H. (1999): The mode of seed formation in *Allium senescens* and two Korean *Allium* species. – *Plant Breeding* 118: 435-438.
- Knight Ch. A., Molinari N. A., Petrov D. A. (2005): The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. – *Annals of Botany* 95: 177-190.
- Kojima A., Kozono T., Nagato Y., Hinata K. (1994): Non-parthenogenetic plants detected in Chinese chive, a facultative apomict. – *Breeding Science* 44: 143-149.
- Kojima A., Nagato Y. (1997): Discovery of highly apomictic and highly amphimictic dihaploids in *Allium tuberosum*. – *Sexual Plant Reproduction* 10: 8-12.
- Konvička O. (1998): Česnek (*Allium sativum* L.). – Vlastním nákladem, Olomouc.
- Kováčik A. (1983): Genetika rostlin. – Státní zemědělské nakladatelství Praha, Praha.
- Köhler C., Scheid O. M., Erilova A. (2010): The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. – *Trends in Genetics* 26: 142–148.
- Krahulec F., Krahulcová A., Papoušková S. (2006): Ploidy level selection during germination and early stages of seedling growth in the progeny of allohexaploid facultative apomict, *Hieracium rubrum* (Asteraceae). – *Folia Geobotanica* 41: 407-416.
- Krahulec F., Duchoslav M. (*in press*): 180. Alliaceae J. AGARDH – česnekovité. In: Štěpánková J. (ed), Květena České republiky, Vol. 8, Academia, Praha.
- Krahulcová A. (2003): Chromosome numbers in selected monocotyledons (Czech Republic, Hungary, and Slovakia). – *Preslia* 75: 97–113.
- Krahulcová A., Suda J. (2006): A modified method of flow cytometric seed screen simplifies the quantification of progeny classes with different ploidy levels. – *Biologia Plantarum* 50: 457–460.
- Kubešová M., Moravcová L., Suda J., Jarošík V., Pyšek P. (2010): Naturalized plants have smaller genomes than their non-invading relatives: a flow cytometric analysis of the Czech alien flora. – *Preslia* 82: 81-96.
- Leitch I. J., Bennett M. D. (1997): Polyploidy in angiosperms. – *Trends in Plant Science* 2: 470–476.
- Leitch I. J., Soltis D. E., Soltis P. S., Bennet M. D. (2005): Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). – *Annals of Botany* 95: 207-217.
- 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. (1975): Minority cytotype exclusion in local plant populations. – *Taxon* 24: 35–43.
- Levin D. A. (2002): The role of chromosomal change in plant evolution. – Oxford University Press, New York, p. 98–184.
- Lid J. (1987): Norsk, svensk, finsk flora. – Det Norske Samlaget, Oslo.
- Lin B.Y. (1984): Polyploidy barrier to endosperm development in Maize. – *Genetics* 107: 103–115.
- Lumaret R., Barrientos E. (1990): Phylogenetic relationships and gene flow between sympatric diploid and tetraploid plants of *Dactylis glomerata* (Graminae). – *Plant Systematics and Evolution* 169: 81–96.
- Mable B. K. (2004): Polyploidy and self-compatibility: Is there an association?. – *New Phytologist* 162: 803–811.
- Malmgren U. (1982): Västmanlands flora. – Botaniska Centralredaktionen, Lund.
- Marks G. E. (1966): The origin and significance of intraspecific polyploidy: experimental evidence from *Solanum chacoense*. – *Evolution* 20: 552–557.
- Marhold K., Kudoh H., Pak J. H., Watanabes K., Španiel S., Lihová J. (2009): Cytotype diversity and genome size variation in eastern Asian polyploid *Cardamine* (Brassicaceae) species. – *Annals of Botany* 105: 249–264.
- Martelotto L. G., Ortiz J. P. A., Stein J., Epinoza F., Quarin C. L., Pessino S. C. (2007): Genome rearrangements derived from autopolyploidization in *Paspalum* sp. – *Plant Science* 172: 970–977.
- 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.
- Matzk F. (2007): Reproduction mode screening. In: Doležel J., Greilhuber J., Suda J. [eds.]: *Cytometry with Plant Cells - Analysis of genes, chromosomes and genomes*. – WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. p. 131–152.
- Meusel H., Jäger E., Weinert E. (1965): Vergleichende chorologie der zentraleuropäische Flora. – Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Navashin M. (1925): Polyploid mutations in *Crepis*. Triploid and pentaploid mutants of *Crepis capillaris*. – *Genetics* 10: 583–592.
- Ohryzek J. (2007): Srovnávací biologie cytotypů česneku planého. [Master thesis, depon. in: Knihovna katedry botaniky, PřF UP Olomouc].
- Otto S. P. (2007): The evolutionary consequences of polyploidy. – *Cell* 131: 452–462.

- Otto S. P., Whitton J. (2000): Polyploid incidence and evolution. – *Annual Review of Genetics* 34: 401–437.
- Parisod C., Holderegger R., Brochmann C. (2009): Evolutionary consequences of autopolyploidy. – *New Phytologist* 186: 5–17.
- Parrott W. A., Smith R. R. (1984): Production of 2n pollen in red clover. – *Crop Science* 24: 469–472.
- Pazourková Z., Pazourek J. (1960): Rychlé metody botanické mikrotechniky. – Praha.
- Peckert T., Chrtek J. (2006): Mating interactions between coexisting diploid, triploid and tetraploid cytotypes of *Hieracium echioides* (Asteraceae). – *Folia Geobotanica* 41: 323–334.
- Petit J. R., Jouzel J., Raynaud D., Barkov N. I., Barnola J. M., Basile I., Bender M., Chappellaz J., Davisk M., Delaygue G., Delmotte M, Kotlyakov V. M., Legrand M., Lipenkov V. Y., Lorius C., Pe' pin L., Ritz C., Saltzmark E., Stievenard M. (1999): Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. – *Nature* 399: 429–413.
- Phillips N. (2010): Seed and bulb dormancy characteristics in New World *Allium* L. (Amaryllidaceae): A review. – *International Journal of Botany* 6: 1–7.
- Pogan E., Wcisło H. (1981): Studies in *Ranunculus ficaria* L. IV. Cyto-embryological studies. – *Acta Biologica Cracoviensia* 23: 37–57.
- Qu L., Widerlechner M. P., Rigby S. M. (2010): Analysis of breeding systems, ploidy, and the role of hexaploids in three *Hypericum perforatum* L. populations. – *Industrial Crops and Products* 32: 1–6.
- Ramsey J., Schemske D. W. (1998): Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. – *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 29: 467–501.
- Ramsey J., Schemske D. W. (2002): Neopolyploidy in flowering plants. – *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 33: 589–639.
- Rausch J. H., Morgan M. T. (2005): The effect of self-fertilization, inbreeding depression, and population size on autopolyploid establishment. – *Evolution* 59: 1867–1875.
- Rieseberg L. H. (1997): Hybrid origin of plant species. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 359–389.
- Ronsheim M. L. (1994): Dispersal distances and predation rates of sexual and asexual probagules of *Allium vineale* L. – *American Midland Naturalist* 131: 55–64.

- Ronsheim M. L., Bever J. D. (2000): Genetic variation and evolutionary trade-offs for sexual and asexual reproductive modes in *Allium vineale* (Liliaceae). – American Journal of Botany 87: 1769–1777.
- Segraves K. A., Thomson J. N. (1999): Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visit to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. – Evolution 53: 1114–1127.
- Shapiro H. M. (2007): Cytometry and cytometers: development and growth. In: Doležel J., Greilhuber J., Suda J. [eds.]: Cytometry with Plant Cells - Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes. – WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. p. 1–17.
- Soltis D. E., Soltis P. S. (1986): Polyploidy and breeding systems in homosporous pteridophyta: a reevaluation. – The American Naturalist 130: 219–232.
- Spielman M., Vinkenoog R., Scot R. J. (2003): Genetic mechanisms of apomixis. – Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 358: 1095–1103.
- Staňková H. (2005): Populační genetika polyploidního komplexu česneku planého (*Allium oleraceum* L.) na území České republiky. [Master thesis, depon. in: Knihovna katedry botaniky, PřF UP Olomouc].
- Stebbins G. L. (1940): The significance of polyploidy in plant evolution. – The American Naturalist 74: 54–66.
- Stebbins G. L. (1947): Types of polyploids: their classification and significance. – Advances in Genetics 1: 403 – 429.
- Stebbins G. L. (1985): Polyploidy, hybridization and the invasion of new habitats. – Annals of the Missouri Botanical Garden 72: 824–832.
- Stewart A., Pearman D. A., Preston C. D. (1994): Scarce plants in Britain. – JNCC, Peterborough.
- Suda J. (2004): An employment of flow cytometry into plant biosystematics [PhD thesis, depon. in: Knihovna PřF Karlovy Univerzity, Praha].
- Suda J., Krahulcová A., Trávníček P., Krahulec F. (2006) Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. – Taxon 55: 447-450.

- Šafářová L. (2004): Cytogeografie a cytoekologie polyploidního komplexu *Allium oleraceum* na území České republiky. [Master thesis, depon. in: Knihovna katedry botaniky, PřF UP Olomouc].
- Šafářová L., Duchoslav M. (2010): Cytotype distribution in mixed populations of polyploid *Allium oleraceum* measured at a microgeographic scale. – *Preslia* 82: 107–126.
- Tal M. (1977): Physiology of polyploid plants: DNA, RNA, protein and abscisic acid in autotetraploid and diploid tomato under low and high salinity. – *Botanical Gazette* 138: 119-122.
- Thompson K., Bakker J.P., Bekker R.M. (1997): The soil seed banks of North West Europe: methodology, density and longevity. - Cambridge University Press.
- Vosa C. G. (1976): Heterochromatic banding patterns in *Allium*. – *Chromosoma* 57: 119–133.
- Warner D.A., Edwards G. E. (1989): Effects of Polyploidy on Photosynthetic Rates, Photosynthetic Enzymes, Contents of DNA, Chlorophyll, and sizes and numbers of photosynthetic cells in the C₄ dicot *Atriplex confertifolia*. – *Plant Physiology* 91: 1143–1151.
- Warner D. A., Ku M. S. B., Edwards G. E. (1987): Photosynthesis, leaf anatomy, and cellular constituents in the polyploid C₄ grass *Panicum virgatum*. – *Plant Physiology* 84: 461–466.
- Wendel J. F. (2000): Genome evolution in polyploids. – *Plant Molecular Biology* 42: 225–249.
- Wendel J. F., Schnabel A., Seelanan T. (1995): Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). – *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 92: 280–284.
- Wood R. E., Takebayashi N., Barker M. S., Mayrose I., Greenspoon P. B., Rieseberg L. H. (2009): The frequency of polyploid speciation in vascular plants. – *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 106: 13875–13879.

PŘÍLOHA

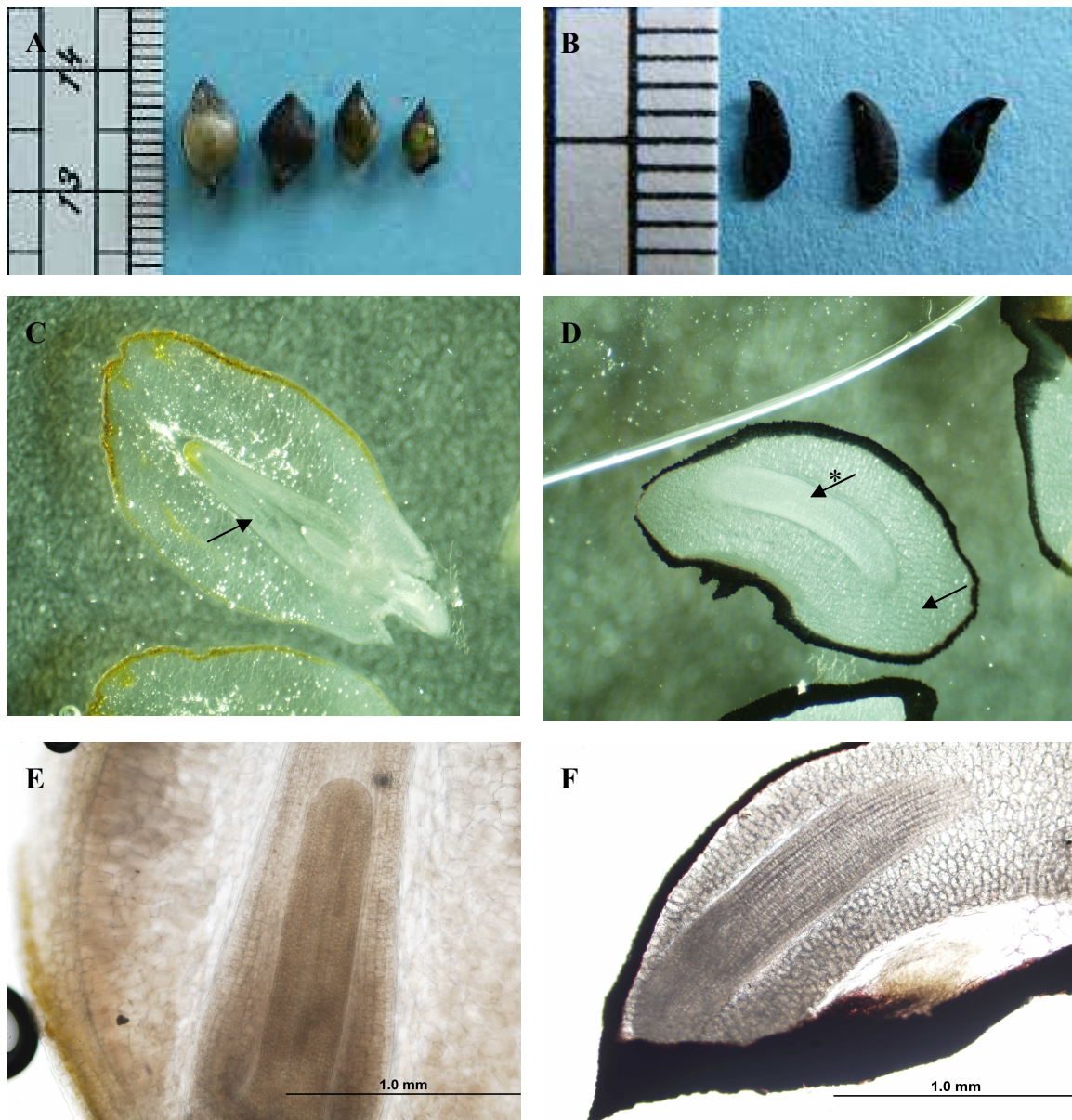
Příloha 1. Krabička s netkanou textílií a pučícími pacibulkami (velikost 2,5 cm x 10 cm)



Příloha 2. Květináčky se semenáčky byly přeneseny na experimentální pozemek a vsazeny do: A čtverců o velikosti 1 m x 1 m a hloubce 11 cm; sadba ze sběrů roku 2006; B brázdy dlouhé 15 m a vyložené pletivem; sadba ze sběrů roků 2007 a 2008.



Příloha 3. Fotodokumentace semen a pacibulek: A vitální pacibulky; B vitální semena; C řez pacibulkou, šipka označuje meristém vhodný pro analýzu průtokovým cytometrem; D řez semenem, šipka s hvězdičkou označuje embryo a samotná šipka označuje endosperm; E detail řezu pacibulkou; F detail řezu semenem.



Příloha 4. Frekvence cytotypů v jednotlivých populacích na začátku vegetační sezóny, v období kvetení a na úrovni neabortovaných květů (Fisher = Fisherův exaktní test; * výsledky převzaté z Šafařová & Duchoslav 2010; ** vlastní sběry + výsledky převzaté z Šafařová & Duchoslav 2010; *** výsledky převzaté z Duchoslav et al. 2010; bez označení jsou vlastní sběry; jako fertillní jsou označeny rostliny, které vyprodukovaly nejméně jedno neabortované semeno)

P. č.	Frekvence cytotypů vegetativních rostlin (%)				Frekvence cytotypů fertillních rostlin (%)				Frekvence cytotypů na úrovni květů (%)			
	n	4x	5x	6x	n	4x	5x	6x	n	4x	5x	6x
1	64	100,0			10	100,0			84	100,0		
2	86	100,0			24	100,0			184	100,0		
6	100		100,0		47		100,0		918		100,0	
8	44		100,0		20		100,0		141		100,0	
11	71			100,0	9			100,0	45			100,0
12	47			100,0	6			100,0	18			100,0
13	58	87,9	12,1		26	96,2	3,8		215	98,1	1,9	
14	36	94,4	5,6		10	90,0	10,0		127	86,6	13,4	
15	11***	54,5	45,5		13	100,0			120	100,0		
16	123**	87,0	13,0		14	100,0			208	100,0		
17	80*	92,0		8,0	47	91,5		8,5	811	99,5		0,5
18	27*	89,0		11,0	8	100,0			62	100,0		
20	47		85,1	14,9	8		100,0		52		100,0	
22	32		18,8	81,3	8			100,0	48			100,0
23	28		21,4	78,6	18		38,9	61,1	56		64,3	35,7
24	62*		82,0	18,0	22		100,0	0,0	221		100,0	
25	36*	47,0	28,0	25,0	70	72,5	5,8	21,7	753	92,4	4,6	3,0
26	83*	2,0	89,0	9,0	10	10,0	90,0		65	9,2	90,8	
27	12	8,3	66,7	25,0	9	11,1	88,9		75	2,7	97,3	

Příloha 5. Vztah mezi frekvencí cytotypů u neabortovaných květů, vegetativních a fertálních rostlin analyzovaný za pomoci Fisherova exaktního testu a Chí-kvadrátu na úrovni jednotlivých cytotypově smíšených populací. Testování H_0 : proporce cytotypů je stejná ve sterilním i fertálním stavu (P č. ... populace číslo; PP ...ploidie populace; V – F ...výsledky analýzy pro frekvenci cytotypů vegetativních a fertálních rostlin; F – K ...výsledky analýzy pro frekvenci cytotypů fertálních rostlin a neabortovaných květů).

P č.	PP	Analýza	V - F	F - K
13	4x;5x	Fischer	p= 0,2626	p= 0,4378
14	4x;5x	Fischer	p= 0,5296	p= 1,0000
15	4x;5x	Fischer	p= 0,0109	–
16	4x;5x	Fischer	p= 0,3717	–
17	4x;6x	Fischer	p= 1,0000	p= 0,0005
18	4x;6x	Fischer	p= 1,0000	–
20	5x;6x	Fischer	p= 0,5767	–
22	5x;6x	Fischer	p= 0,3180	–
23	5x;6x	Fischer	p= 0,3146	p= 0,0978
24	5x;6x	Fischer	p= 0,0592	–
25	4x;5x;6x	Chi-kvadrát	11,0447 p = 0,0040	51,6502 p = 0,0000
26	4x;5x;6x	Chi-kvadrát	2,4381 p = 0,2955	0,0061 p = 0,9380
27	4x;5x;6x	Chi-kvadrát	2,9010 p = 0,2345	1,6639 p = 0,1971