

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



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

Ludmila Hattanová

Bakalářská práce
předložená
na Katedře ekologie a ochrany životního prostředí
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
jako součást požadavků
na získání titulu Bc. v oboru
Ekologie a ochrana životního prostředí

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

Olomouc 2015

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

Abstrakt

Allium oleraceum L. představuje běžně v Evropě se vyskytující polyploidní komplex se základním chromozomovým číslem $x = 8$. Doposud je známo šest cytotypů ($2n = 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x$), v České republice se vyskytují tři z nich ($2n = 4x, 5x, 6x$). Všechny cytotypy jsou schopny produkovat vegetativní a sexuální potomstvo. Tato práce obsahuje rešeršní část, ve které se zaměřuje obecně na polyploidii, reprodukční systémy krytosemenných rostlin a reprodukční biologií polyploidů včetně *A. oleraceum*.

Pro studium fertility mikrospor jednotlivých ploidních stupňů bylo vybráno 33 zapěstovaných kvetoucích jedinců z mezinárodní databáze rodu *Allium*, rostoucích na pozemku Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Signifikantní vztah mezi ploidí a fertilitou mikrospor nebyl prokázán, avšak nepatrně vyšší fertilita byla pozorována u hexaploidů a tetraploidů, nejnižší pak u triploidů. Měřila se také délka mikrospor studovaných jedinců. Nejdelší mikrospory byly naměřeny u hexaploidních jedinců, nejnižší hodnoty pak u triploidních a pentaploidních.

Klíčová slova: duplikace genomu, reprodukční systémy, polyploidie, fertilita pylu

Abstract

Allium oleraceum L. is represented a common European polyploid complex with base chromosome number $x = 8$. It has known six cytotypes ($2n = 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x$) so far. Occurrence of three cytotypes ($2n = 4x, 5x, 6x$) is in the Czech Republic. All of these cytotypes are able to produce vegetative and sexual offspring. The thesis includes a research part, which generally focuses on polyploidy, systems of reproduction angiosperms and the reproductive biology of polyploid, including *A. oleraceum*.

For pollen fertility of individual ploidy levels study were collected samples 33 flowering individuals of populations from international database of *Allium* genus from experimental garden of Faculty of Science Palacký University in Olomouc. Significant

relation between ploidy and microspores fertility has not been demonstrated, but slightly higher fertility was observed in hexaploids and tetraploids, the lowest in triploids. It was also measured length of microspores at the individuals. The longest microspores were found in hexaploid individuals, the lowest values in triploids and pentaploids.

Key words: whole genome duplication, systems of reproduction, polyploidy, pollen fertility

Čestné prohlášení

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

V Olomouci dne:

podpis

Obsah

Seznam tabulek.....	viii
Seznam obrázků.....	ix
Seznam zkratek.....	x
Poděkování	xi
1. Úvod.....	1
2. Cíle práce	2
3. Polyploidie	3
3.1. Vznik polyploidů	3
3.2. Vlastnosti polyploidů	5
4. Reprodukční systémy krytosemenných rostlin.....	7
4.1. Alogamie	8
4.2. Autogamie	9
4.3. Apomixie.....	9
5. Porovnání reprodukčních systémů krytosemenných rostlin	11
6. Reprodukční biologie polyploidů	12
6.1. Reprodukční biologie <i>Allium oleraceum</i> L.	15
Popis druhu	15
Reprodukce	16
7. Materiál a metody	18
7.1. Stanovení fertility mikrospor.....	18
7.2. Měření velikosti mikrospor	18
7.3. Stanovení životnosti (klíčivosti) mikrospor	19
7.3. Statistické zpracování	19
8. Výsledky	20
8.1. Velikost pylových zrn	20

8.2. Fertilita pylových zrn.....	22
9. Diskuse.....	27
10. Závěr	29
Literatura.....	31
Přílohy.....	36

Seznam tabulek

Tabulka 1. Průměr a standardní chyba GLM velikosti pylových zrn a studovaných cytotypů <i>Allium oleraceum</i>	36
Tabulka 2. Fertilita pylových zrn (průměry a standardní chyba) studovaných cytotypů <i>Allium oleraceum</i>	36
Tabulka 3. Přehled evropských populací použitých při výzkumu.....	38

Seznam obrázků

Obr. 1. Velikost pylových zrn (průměr + standardní chyba) studovaných cytotypů <i>Allium oleraceum</i>	20
Obr. 2. Histogramy velikosti pylových zrn v mikrometrech pro jednotlivé ploidie	21
Obr. 3. Fertilita pylových zrn (průměr + standardní chyba) studovaných cytotypů <i>Allium oleraceum</i>	22
Obr. 4. Krabičkový diagram fertility pylových zrn a ploidie <i>A. oleraceum</i>	23
Obr. 5. Fotografie mikrospor <i>A. oleraceum</i> při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/87B, tetraploid.....	24
Obr. 6. Fotografie mikrospor <i>A. oleraceum</i> při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/87B, fluorescenční režim, tetraploid	24
Obr. 7. Fotografie mikrospor <i>A. oleraceum</i> při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/2C, pentaploid	25
Obr. 8. Fotografie mikrospor <i>A. oleraceum</i> při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/88, tetraploid.....	25
Obr. 9. Fotografie mikrospor <i>A. oleraceum</i> při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/14C, pentaploid	26
Obr. 10. Průměry hodnoty velikosti pylových zrn u studovaných cytotypů <i>A. oleraceum</i> v mikrometrech	36
Obr. 11. Průměrné hodnoty fertility pylu studovaných cytotypů <i>A. oleraceum</i>	37
Obr. 12. Česneky z mezinárodní databáze ve skleníku, využité pro studium (ilustrační fotografie)	40

Seznam zkratk

GISH	genome <i>in situ</i> hybridization – genomová <i>in situ</i> hybridizace
RFLP	restriction fragment length polymorphism – polymorfismus délky restrikčních fragmentů
SI	Self-incompatibility, nekompatibilita vlastního pylu
WGD	whole genome duplication, duplikace celého genomu

Poděkování

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

V Olomouci dne:

1. Úvod

Polyploidie je významným mechanismem v evoluci rostlin. Tento rozšířený jev hraje důležitou roli v adaptaci a speciaci rostlin (Levin 1983; Leitch & Bennett 1997; Ramsey & Schemske 1998; Soltis & Soltis 1999; Mable 2004) a u všech ostatních eukaryot (Soltis et al. 2014). Polyploidie je značně rozšířená především v rostlinné říši. Odhaduje se, že až 70% druhů krytosemenných rostlin má polyploidní původ nebo během evoluce prošly procesem polyploidizace. U kapradin se odhaduje až 95% polyploidních druhů, přičemž zde mohou jednotlivé počty chromozomů čítat až stonásobek základní sady chromozomů (Ramsey & Schemske 1998; Soltis & Soltis 1999; Mable 2004; Suda 2009). Polyploidie byla zjištěna i u některých druhů sinic (Griese et al. 2011). Naopak méně polyploidů je mezi živočichy. Polyploidní formy jsou známy zejména u hmyzu, plazů, obojživelníků a ryb. Důkazy rozsáhlých genových duplikací dokonce naznačují, že savčí genom má polyploidní původ (Ramsey & Schemske 1998).

Většina taxonomicky uznaných polyploidních druhů krytosemenných rostlin nemá jeden společný původ. Opakující se a na sobě nezávislý původ polyploidie je spíše pravidlem, nikoliv výjimkou (Soltis & Soltis 1999). Spojením rozsáhlých cytogenetických a fylogenetických databází botanických komunit bylo zjištěno, že 15% krytosemenných rostlin a 31% speciačních událostí kapradin je doprovázeno zvýšením ploidie (Wood et al. 2009).

V průběhu poslední dekády došlo k obrovskému oživení zájmu o polyploidii, který je motivován vývojem stále více výkonných genetických a genomických nástrojů. Výsledkem jsou mnohá nová proniknutí do genomických a genetických důsledků polyploidie. Přemíra nových objevů dramaticky proměnila tradiční pohledy a současně odhalila, že polyploidie je vysoce dynamický a všudypřítomný proces (Soltis et al. 2010). Současné studie dokumentují u polyploidních rostlin rychlé a dynamické změny ve struktuře genomu a genové expresi (Jackson & Chen 2010). Předkládaná práce se zabývá literární rešerší reprodukční biologie se zaměřením na polyploidní komplex česneku planého (*Allium oleraceum* L.)

2. Cíle práce

Cílem práce je provést literární rešerši na uvedené téma, realizovat studium a testovat vztah fertility a životnosti pylových zrn u cytotypů *A. oleraceum* a rovněž testovat vztah mezi velikostí mikrospor a ploidními úrovněmi. Dopředu lze očekávat, že spolu vzrůstající ploidií se bude délka mikrospor zvětšovat pravděpodobně mimo triploidní a pentaploidní jedince. Cílem literární rešerše je předložit přehled o problematice polyploidů, jejich vzniku, vlastnostech a reprodukci, dále pak o reprodukčních systémech krytosemenných rostlin a o reprodukční biologii polyploidního komplexu *A. oleraceum*.

3. Polyploidie

Termín „polyploidie“, také WGD, se užívá k označení vyššího než diploidního počtu chromozomálních sad (Leitch & Bennett 1997). Jinými slovy polyploidní jedinec má v jádru buněk svého těla více než dvě identické sady chromozomů. Takovýto jedinec se nazývá polyploid a vzniká tzv. polyploidizací, přičemž jedinec se třemi sadami chromozomů je triploid ($2n = 3x$), se čtyřmi sadami tetraploid ($2n = 4x$), s pěti sadami pentaploid ($2n = 5x$) atd., kde písmeno „x“ označuje základní sadu chromozomů (Ramsey & Schemske 1998).

První zmínky o fenoménu polyploidie pochází z počátku 20. století (Briggs & Walters 2001). Datují se pravděpodobně k výzkumu De Vries (1914) při kultivačních pokusech s druhem *Oenothera lamarckiana*, jenž byl později objeven jako tetraploidní (Gates 1909 in Soltis & Soltis 2014). Spolu s postupným nárůstem znalostí bylo zřejmé, že polyploidi mohou vznikat více než jedním způsobem.

3.1. Vznik polyploidů

Na vzniku polyploidů se podílejí tři mechanismy. Prvním z nich je tvorba neredukovaných gamet. Ta je způsobena chybou v průběhu meiózy (Gerstein & Otto 2009). Produkce neredukovaných gamet je dědičná a je řízena několika geny. Zvyšuje se s nárůstem environmentálního stresu, například mrazu, vodního deficitu a nedostatku živin (Parisod et al. 2010). Už Belling (1925) pozoroval zvýšení produkce $2n$ (= neredukovaných) pylových zrn v polních a skleníkových kulturách *Strizolobium* sp., *Datura stramonium* a *Uvularia grandiflora* po následných chladných obdobích (Ramsey & Schemske 1998). Betagnolle a Thompson (1995) kvantifikovali produkci $2n$ pylu u několika druhů. Nejvyšší frekvenci $2n$ pylu dosahoval jedinec druhu *Dactylis glomerata* (60%) a také druh *Trifolium nigrescens* spp. (39%).

Druhým mechanismem je somatické zdvojení. V tomto případě se jedná o produkci buněk se zdvojeným chromozomovým číslem, což je způsobeno chybou v mitóze. Třetím mutačním mechanismem je polyspermie, kdy dojde k oplození vaječné buňky dvěma nebo více spermatickými buňkami (Gerstein & Otto 2009).

Polyploidi a jejich klasifikace závisí na genetické a taxonomické podobnosti genomů a odráží chování párování v jejich meiotických chromozomech. Podle vzniku se tradičně rozlišují dva typy polyploidů, autopolyploidi a allopolyploidi. Autory termínů jsou Kihara & Ono (in Bennett 2004). Autopolyploidi vznikají buď prostým zdvojením chromozomových sad v buňkách diploida nebo v rámci populací jednotlivých druhů splynutím neredukovaných gamet (AA + AA místo A + A), kde je každý chromozom reprezentován více než dvěma homologními kopiemi. Příkladem autopolyploidů jsou tolice vojtěška (*Medicago sativa*), lilek brambor (*Solanum tuberosum*), *Saccharum*. Autopolyploidní jedinci mohou vznikat buď tzv. bilaterální polyploidizací, splynutím dvou neredukovaných gamet (2n), nebo mohou vznikat unilaterální polyploidizací fúzí redukované (n) a neredukované (2n) gamety. V tomto případě vzniká triploidní potomstvo (Bretagnolle & Thompson 1995). Takto vzniklí triploidní jedinci mají zpravidla sníženou životnost, mohou být neplodní ve větší míře. Pokud jsou schopni produkce potomstva, mohou zpětným křížením s jinými diploidními nebo triploidními jedinci produkovat tetraploidní potomstvo. Tento mechanismus, při němž dochází k přechodu z diploidního do tetraploidního stavu, je označován jako „triploidní most“ (Ramsey & Schemske 1998; Otto & Whitton 2000).

Allopolyploidi jsou produktem mezidruhové hybridizace (Leitch & Bennett 1997; Ramsey & Schemske 1998; Chen 2009). Jsou tvořeni spontánně křížením příbuzných druhů a následným zdvojením chromozomů nebo z fúze neredukovaných gamet mezi druhy (Chen 2010). Jinými slovy, allopolyploidi pocházejí z mezidruhových hybridů, ve kterých jsou následně dva nebo více rodičovských genomů v duplikovaných formách. Tento typ polyploidie zahrnuje splynutí dvou plně diferencovaných genomů (Ramsey & Schemske 2002; Soltis & Soltis 2009). Mezi allopolyploidy patří například konopice polní (*Galeopsis tetrahit*) původně vzniklá z konopice zdobné (*G. speciosa*) a konopice pýřité (*G. pubescens*), z kulturních rostlin pšenice (*Triticum aestivum*). Příkladem člověkem vytvořeného allopolyploida je hybrid *Triticale* získaný z křížení hexaploidní pšenice (*T. aestivum*) nebo tetraploidní pšenice *Triticum turgidum* a žita (*Secale cereale*) (Suda 2009; Chen 2010). V přírodě se často vyskytují allopolyploidi, nedávné studie však ukazují, že autopolyploidi se vyskytují mnohem častěji, než se dosud předpokládalo (Soltis et al. 2004; Parisod et al. 2010). To naznačuje důležitou evoluční roli polyploidie v přírodních populacích (Carlos & Ramirez-Parra 2015).

Grant (1981) v rámci klasifikace polyploidů navíc rozlišuje přechodnou formu mezi auto- a allopolyploidy zvanou amfiploidie. Autopolyploidy diferencuje na striktní a mezirasové. Allopolyploidy rozlišuje na segmentální ($A_sA_sA_tA_t$), genomické (AABB) a autoallopolyploidy (AAAABB) (Soltis et al. 2004).

Z hlediska stáří polyploidů se pro mladé typy polyploidů s příbuznými taxony užívá pojem neopolyploid, zatímco pro starobylé taxony se užívá pojem paleopolyploid (Ramsey & Schemske 2002). Počty gametických chromozomů neopolyploidních druhů jsou násobky základního čísla diploidních chromozomů založených u příslušných rodů. Naopak paleopolyploidní druhy prošly procesem rediploidizace, znovu se tedy staly diploidní (Hilu 1993). Tyto dva termíny, paleoploid a neoploid, nejsou pevně definovány žádným absolutním časovým nebo geologickým základem, jsou jen relativní ke každému srovnání (Bennett 2004).

Polyploidii je možné experimentálně vyvolat například působením kolchicinu (inhibitor dělicího vřeténka), jenž působí jako zábrana při rozestupování chromozomů při mitóze, což může být výsledkem polyploidní buňky (Briggs & Walters 2001).

U diploidní rostliny může vzniknout polyploidie při krátkém vystavení vysoké teplotě. V buňce je působením tepelného šoku porušen normální průběh mitózy (Ramsey & Schemske 1998).

3.2. Vlastnosti polyploidů

Výzkum v oblasti zemědělství i přírodních systémů naznačuje, že polyploidi mají často nové fyziologické charakteristiky, které nejsou přítomny u diploidního předka. Některé z těchto nových vlastností mohou být adaptivní, a rostlina tak může vstoupit do nové ekologické niky (Ramsey & Schemske 1998). Už Stebbins (1971) navrhoval, že fyziologické změny rostlin spojené s polyploidii by mohly být klíčové pro úspěšné obsazení nového prostředí.

Polyploidizace ovlivňuje jak genetické, tak anatomické, morfologické, fyziologické a ekologické vlastnosti rostlin. Důsledkem je vliv na přežití, růst, šíření a reprodukci rostlin (Otto & Whitton 2000). Polyploidi mohou lépe než jejich diploidní předci přežít v drsných podmínkách, jako je například vysoká nadmořská výška nebo chladné podnebí (Stebbins 1971). Mnoho fyziologických a vývojových procesů je ovlivněno zvýšením ploidie, například poměr výměny plynů, aktivita genů, hladina hormonů, poměr fotosyntézy a vodní bilance. Celkově větší buňky průduchů spolu

s jejich menším počtem na jednotku plochy u polyploidů má negativní dopad na průběh transpirace (Soltis et al. 2014). Polyploidní rostliny mohou lépe snášet vodní stres (Briggs & Walters 2001). Polyploidizace často vede k nárůstu objemu a průměru buňky rostliny, a tudíž ke zvýšení celkové velikosti rostliny, v mnoha případech do určité úrovně ploidie. Znamé velikosti genomu se pohybují v rozmezí od $1C = 0,0648$ pg u *Genlisea margaretae* do $1C = 152,23$ pg u *Paris japonica* (Bennett & Leitch 2011). V souvislosti s různou úrovní ploidie se od diploidních rostlin mohou lišit ve vyšší průměrné velikosti průduchů (Stebbins 1979; Levin 1983; Chen 2010). Polyploidi mají zpravidla méně (ale větší) květy, pylová zrna i semena a nástup doby květu může být opožděn (Ramsey & Schemske 2002). Znásobení počtu genů často způsobuje chromozomovou nerovnováhu a poruchy v reprodukci (Chen 2007). Této problematice se věnuje kapitola šestá.

4. Reprodukční systémy krytosemenných rostlin

Termín „reprodukční systémy“ v širokém pojetí zahrnuje čtyři hlediska: všechny aspekty sexuální exprese u rostlin, což je ovlivněno relativním genetickým příspěvkem další generaci jedinců v rámci druhu (fitness) (1); je používán v zemědělství jako nástroj k regulaci a usměrnění složek plodivosti při záměrném výběru u hospodářských rostlin (2); a také v genetice (3). Znalost reprodukčních systémů je v rámci opylovacích výzkumů v přírodních podmínkách zásadním pozadím pro zhodnocení závislosti produkce semen na rychlosti opylení a ve vztahu porozumění mechanismům toku genů uvnitř a mezi populacemi (4) (Dafni 1992).

Během evoluce se vyvinuly rozličné způsoby rozmnožování rostlin současně s rozmanitostí všech strukturních i funkčních znaků, přičemž každý z těchto reprodukčních systémů lze přiřadit k jednomu ze dvou výchozích typů: k rozmnožování nepohlavnímu (asexuální reprodukce) nebo pohlavnímu (sexuální, generativní reprodukce). V případě pohlavního rozmnožování noví jedinci vznikají splýváním gamet (haploidních pohlavních buněk) za vzniku diploidní zygoty. Proces splnutí gamet se nazývá oplození (syngamie), při které dochází ke kombinaci genomů rodičů. Pohlavní rozmnožování tedy zajišťuje genetickou variabilitu jedinců daného druhu a rovněž i jeho adaptabilitu k měnícím se životním podmínkám a evoluční potenci.

Pro krytosemenné rostliny je typické dvojité oplození, kdy jedna spermatická buňka splyne s vaječnou buňkou a druhá spermatická buňka splyne s centrálním jádrem zárodečného vaku. Z vaječné buňky se následně vyvíjí diploidní zygota a z centrální buňky zárodečného vaku se vyvíjí triploidní endosperm (Vinter & Macháčková 2013). U krytosemenných rostlin jsou známy tři základní způsoby rozmnožování neboli reprodukční systémy – alogamie (cizosprašnost), autogamie (samosprašnost) a apomixie (Briggs & Walters 2001). V následujícím výčtu budou popsány jednotlivé reprodukční systémy s uvedením příkladů druhů rostlin.

4.1. Alogamie

Blizna cizospašného jedince k opylení a oplození potřebuje kompatibilní pyl z jiného jedince téhož druhu, přičemž se nesmí jednat o klon se stejným genomem (Novák & Skalický 2012). Mnoho druhů krytosemenných rostlin využívá tento reprodukční systém. Alogamie zajišťuje u kvetoucích rostlin minimalizaci nebo úplné znemožnění samoopylení. Zabraňuje tak škodlivým dopadům příbuzenského křížení a podporuje vznik heterozygotů, genetickou variabilitu, výměnu genetické informace. Tyto uvedené důsledky jsou výhodné pro dlouhodobé přežití a adaptaci druhu a k jeho zachování (Briggs & Walters 2001).

Charakteristický květ krytosemenné rostliny se skládá ze souboru tyčinek s pylem, které jsou obklopeny plodolisty obsahující jedno nebo několik vajíček. Prostorová blízkost tyčinek a plodolistů je příhodná pro samoopylení (autogamie). Takzvaná autosterilita u rostlin má více příčin. U většiny rostlin existuje autoinkompatibilita (SI - nesnášenlivost vlastního pylu), kdy po opylení vlastním pylem plodná rostlina nevytvoří zygoty. Brání tomu prezygotické mechanismy pylových buněk a pletiva blizny nebo čnělky (Briggs & Walters 2001). Dalším mechanismem zabráňujícím samoopylení u krytosemenných rostlin je tzv. dichogamie, kdy samičí a samčí pohlavní orgány nedozrávají současně, a proto nedochází k samoopylení. Existují dvě formy dichogamie: proterogynie (prvobliznost) a proterandrie (prvoprašnost). Vzácnější je prvobliznost, tedy dřívější dozrávání blizen, například *Aristolochia* (podražec), *Clematis* (plamének), *Malus* (jabloň). Běžnější je prvoprašnost, při které samičí pohlavní orgány dozrávají později než samčí, například šalvěj (*Salvia*), česnek (*Allium sp.*), kakost (*Geranium*) (Novák & Skalický 2012; Vinter 2008).

Příkladem polyploidní rostliny využívající alogamii je vojtěška (*Medicago sativa*). Tento převážně autotetraploidní druh ($2n = 4x = 32$) byl studován v souvislosti s konstrukcí map genetických vazeb. Genetická struktura tohoto druhu činí konstruování genetických map obtížným. Bernarderre a kolektiv (2003) použili dostupné kodominantní mikrosatelitní markery (SSRs), většina z nich byla zjištěna v modelové luštěnině *Medicago truncatula* z databáze EST (expressed sequence tag). Genetické mapy byly konstruovány s AFLP a SSR markery na základě specifických postupů mapování pro autotetraploidy (Bernardette et al. 2003).

4.2. Autogamie

Druhým reprodukčním systémem u rostlin je samosprašnost (autogamie). Úplná forma autogamie se nazývá kleistogamie, kdy k samoopylení dochází při zavřených květech. Nepřímými důkazy autogamie jsou například uniformita potomstva a SI. Autogamie je známa například u brukve řepky olejky (*Brassica napus*). Také některé violky, například *Viola kitaibeliana*, jsou samosprašné (Portál AOPK ČR). Obligátní autogamie je známa u některých druhů trav, sezónní autogamie u violek (Briggs & Walters 2001). Polyploidi mají v průměru vyšší míru samoopylení než jejich diploidní předkové (Barringer 2007).

4.3. Apomixie

Třetím způsobem reprodukce rostlin je apomixie, při které se neuskuteční oplození buď částečně, nebo úplně. Je považována za nejmladší způsob rozmnožování rostlin. U kvetoucích rostlin je definována jako nepohlavní tvorba „semen“ ze samičích pletiv vajíčka bez procesu meiózy a oplození, což vede k vývoji „embrya“ (Bicknell & Koltunow 2004). Rozlišují se dva typy: vegetativní apomixie (a) a agamospermie (b).

(a) Někteří autoři (Asker & Jerling 1992) považují vegetativní apomixii pouze za formu vegetativního rozmnožování a nikoliv za typ apomixie. Některé rostliny se rozmnožují pouze vegetativně, protože jim chybí schopnost sexuální reprodukce. Příkladem je vodní mor kanadský (*Elodea canadensis*). *E. canadensis* je dvoudomá vodní rostlina, která byla v devatenáctém století introdukována do Evropy, a to pouze samičí rostliny, jež byly schopny se hojně rozšiřovat bez přítomnosti samčích rostlin. Jiné druhy, například lomikámen nicí (*Saxifraga cernua*) tvoří specializované orgány – pacibulky (propagule), jež jsou snadno odlučitelné. Pokud pacibulky vypučí a nedojde k somatickým mutacím, jedinec má totožný genotyp jako rodičovský jedinec (Briggs & Walters 2001).

(b) Druhým typem apomixie je agamospermie, při které se vytváří normální semena, které se vyvinou bez splynutí gamet. Potomstvo má opět tentýž genotyp jako rodičovská rostlina. Agamospermie byla poprvé popsána v roce 1841 J. Smithem u australské rostliny *Alchornea ilicifolia*. Apomixie je velmi častá u vyšších rostlin – kaprad'orostů i krytosemenných rostlin, například mnohé rody v čeledích Rosaceae a Asteraceae v rámci flóry mírného pásu. Doposud nejsou známy žádné nahosemenné

apomiktické rostliny (Briggs & Walters 2001). U planě rostoucích rostlin se uplatňují kombinace jednotlivých reprodukčních systémů: alogamie kombinovaná s vegetativní reprodukcí (*Trifolium repens*, *Lysimanchia nummularia*); alogamie kombinovaná s viviparií (*Agrostis*, *Allium*, *Festuca*, *Poa*, *Saxifraga*); alogamie kombinovaná s příležitostnou autogamií (*Primula veris*); alogamie kombinovaná s pravidelnou kleistogamií (*Viola*), a další (Briggs & Walters 2001).

Apomixie je typicky spojována s polyploidíí a hybriditou, protože mnoho apomiktických taxonů je allopolyploidního původu (Bicknell & Koltunow 2004).

5. Porovnání reprodukčních systémů krytosemenných rostlin

Všechny výše zmíněné reprodukční systémy mají své výhody a nevýhody z pohledu fitness. Alogamie je ve srovnání s autogamií a apomixií výhodnější z hlediska genetické variability potomstva a umožňuje adaptaci na změny v prostředí. Zároveň však může dojít ke ztrátě výhodných genotypů adaptovaných na určitý typ prostředí a náhodné faktory prostředí ohrožují reprodukci, například výskyt opylovačů (Briggs & Walters 2001). Při alogamii je tak rostlinou vyplýváno na reprodukci mnohem více biomasy v podobě květů. Naproti tomu autogamie má výhodu v tom, že nedochází ke ztrátě adaptovaných genů (Briggs & Walters 2001; Bicknell & Koltunow 2004).

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

Výhodou třetího typu rozmnožování, apomixie, je reprodukce velkého počtu rostlin genotypově totožných s rodičovskou rostlinou dobře adaptovaných na určitý typ prostředí, aniž by docházelo k větším genetickým ztrátám. Apomixie dovoluje reprodukci rostlin s lichými počty chromozomů (Asker & Jerling 1992). Zároveň zde není žádné riziko spojené s opylením a reprodukce není v ohrožení náhodnými faktory prostředí (Briggs & Walters 2001). Tento způsob reprodukce je zárukou udržení velkého podílu heterozygotnosti (Asker & Jerling 1992).

6. Reprodukční biologie polyploidů

Zvýšené genomové a genové dávky (duplicity v jednom genomu) často způsobují genomovou nestabilitu, chromozomální nerovnováhu a poruchy v reprodukci (Chen 2007). Genomové přestavby mohou být společným atributem polyploidů na základě důkazů analýz genome *in situ* hybridization (GISH), restriction fragment length polymorphism (RFLP) a z mapování genů (Soltis & Soltis 2000).

Genomové znásobení má rovněž vliv na reprodukční systémy. Předpokládalo se, že s rostoucím ploidním stupněm roste u jedinců míra samoopylení (Mable 2004). Tento vztah potvrzuje Barringer (2007). Ve své studii testoval celkem 235 druhů kvetoucích rostlin ze 126 rodů a 58 čeledí. Jako první ve fylogenetickém kontextu analyzoval vztah mezi ploidií a samoopylením za použití kvantitativních odhadů frekvence samoopylení z přírodních populací. Důvody vedoucí k zjištěnému stavu nejsou příliš známy. Možné vysvětlení nabízí, že polyploidní jedinci mají sníženou autokompatibilitu pylu, která je příčinou omezení schopnosti samoopylení. Naopak Mable (2004) vztah mezi ploidií a schopností samoopylení zpochybnila. Její studie byla provedena na základě 4665 druhů z 1235 rodů a 184 čeledí. Ve výsledcích uvádí ne příliš silnou spojitost mezi ploidií a schopností samoopylení.

Polyploidní druhy jsou patrně často reprodukčně izolovány od svých diploidních předků silnými postzygotickými bariérami (Husband & Sabara 2004; Ramsey & Schemske 1998). Proces oplození polyploidů probíhá obdobným způsobem, (jak bylo popsáno na začátku páté kapitoly), avšak ploidie veškerých pletiv je úměrně zvětšená. Polyploidní rostliny mají vysoký stupeň přímých post-zygotických reprodukčních izolací od svých předků, zpětným křížením budou rodiče produkovat zejména neživotaschopné potomstvo (Köhler et al. 2010). Potíž se získáním životaschopných triploidních semen křížením diploida a tetraploida byla nazvána jako „triploidní blok“ (Ramsey & Schemske 1998). Je to způsobeno neslučitelností v endospermu. Zatímco zárodek pochází z fúze jedné otcovské spermatické buňky s mateřskou vaječnou buňkou, další spermatické buňky s centrální buňkou zárodečného vaku iniciují vývoj endospermu. Vzhledem k tomu, že centrální buňka zárodečného vaku je u většiny kvetoucích rostlin homodiploid (chromozomy obsahující dvě identická vlákna), výsledný endosperm je triploidní a tím geneticky odlišný od diploidního zárodka (Ramsey & Schemske 1998).

Kvůli triploidnímu bloku, zpětné křížení polyploidů se svými rodiči produkuje převážně neživotaschopné potomstvo, vzácní přešívší s nevyváženými chromozomovými čísly jsou většinou sterilní z důvodu chybného redukčního dělení lichých chromozomových sad během meiózy (Ramsey & Schemske 1998). Triploidní blok tudíž působí jako důležitá reprodukční bariéra a je hlavním základem speciace polyploidů (Köhler et al. 2010). Zvýšené příspěvky mateřských nebo otcovských genomů mají odlišné účinky. První inhibuje růst endospermu, druhý způsobuje přebytek endospermu (Scott et al. 1998). Je několik možností vysvětlující tento efekt. Jádra endospermu obsahují dvakrát tolik kopií mateřského než otcovského genomu a organely se dědí převážně mateřskou dědičností. Dalším vysvětlením tohoto jevu může být imprinting (vkopírované geny), což vede k rozdílné expresi mateřské a otcovské alely v závislosti na jejich původu (Feil & Berger 2007).

Nejčastější cesta k tvorbě polyploidních jedinců je pravděpodobně přes neredukované gamety a jedince s deviantními chromozomovými čísly (Betagnolle & Thomson 1995). To naznačuje, že triploidní blok a problémy spojené se segregací lichých chromozomů během meiózy lze překonat (Köhler et al. 2010). Apomixie je způsobem, jak se vyhnout zmíněným problémům při meióze, mnoho apomiktických druhů je zároveň polyploidních (Bicknell & Koltunow 2004). Nicméně mechanismy vedoucí k expresi apomiktických rysů v polyploidii nejsou známy (Köhler et al. 2010).

Tato bariéra mezicytotypové hybridizace (triploidní blok) byla pozorována i u vyšších ploidních stupňů. Příkladem je experiment, při kterém diploidní mateřská rostlina druhu *Ranunculus auricomus* byla opylována tetra- a hexaploidním pylem a následně byly u úspěšně vyvinutých semen vyhodnoceny reprodukční cesty za využití průtokové cytometrie. Zároveň byly porovnány počty úspěšně vyvinutých a abortovaných semen. Většina semen byla abortována. Úspěšně vyvinutá semena (1,3%) byla častěji tetraploidní, méně byli zastoupeni triploidi (Hörandl & Temch 2009).

Při tvorbě gamet u polyploidů obecně je správná segregace chromozomů náročná, neboť obsahují více než dvě sady. Jak bylo zmíněno dříve, autopolyploid vzniká zdvojením genomu v rámci druhu, kde je každý chromozom zastoupen více než dvěma homologními kopiemi. Pro autopolyploidy je typická polysomická (též multisomická) dědičnost, kde se všechny varianty téhož chromozomu mohou při meióze párovat. Rodičovské alely mohou být kombinovány do téže gamety ve všech možných kombinacích, protože zde není preferován pár mezi určitými chromozomy.

Avšak u allopolyploidů je preferován pár mezi chromozomy ze stejného rodového genomu. Jedná se o disomickou dědičnost, kde se alely pocházející ze stejného rodového druhu segregují jako diploidi, a tak potomstvo obdrží pouze jednu kopii od daného rodiče (Dufresne et al. 2014).

Přeživším triploidi mají často sníženou životaschopnost kvůli chybám v meióze (Husband & Sabara 2004). Triploidní jedinci v průběhu meiózy produkují zejména aneuploidní gamety (dojde k chybění nebo nadbytku chromozomů). Mohou také produkovat velmi malé procento haploidních, diploidních i triploidních vajíček a pylových zrn. Fertilita pylu se pohybuje okolo 31,9%, přičemž u autotriploidů je fertilita 39,2% a u allotriploidů 23,7% (Ramsey & Schemske 1998).

Úspěšná reprodukce a trvalost rostlinné populace u mnoha polyploidních druhů závisí především na specifických vegetativních propagulích, například na pacibulkách nebo dceřiných cibulích (*Allium vineale*, Ceplitis & Bengtsson, 2004, Duchoslav, 2001a a 2001b; Duchoslav, *A. oleraceum*, Duchoslav, 2001a, Duchoslav, 2001b a Fialová a Duchoslav, 2014). Avšak dobře zavedené polyploidní populace mohou mít podobné nebo dokonce zvýšené pohlavní rozmnožování v porovnání s jejich diploidními předky v důsledku dlouhodobých strukturálních změn v genomu a výběru (Levin 2002). Produkce propagulí různého původu má několik výhod i nevýhody. Vznik vegetativního potomstva, které je identické s mateřskou rostlinou, je při populačním rozšiřování na nízkou populační hustotu výhodný. Bohužel, klony v dlouhodobém horizontu následně hromadí škodlivé mutace (Ronsheim a Bever, 2000 in Fialová et al. 2014). Vegetativní rozmnožování je také důležité pro soužití, spoluexistenci cytotypů ve smíšených populacích, protože snižuje negativní vliv na reprodukční interakce mezi cytotypy. Sexuálně odvození potomci zvyšují varianci životaschopnosti, tudíž je pohlavní rozmnožování důležité pro dlouhodobé přetrvávání populace. Umožňuje tedy tvorbu nových genotypů (Kao 2007 in Fialová et al. 2014).

6.1.Reprodukční biologie *Allium oleraceum* L.

Popis druhu

Allium oleraceum je geofyt s jednoletým zásobním orgánem, téměř kulovitou cibulí o velikosti 10 až 15 mm s vnějšími hnědými až šedými blanitými šupinami. Výška stvolu se pohybuje mezi 20 až 100 cm, stvol je do své poloviny až do dvou třetin kryt listy v počtu 1 až 4 s přibližně 30 cm délkou čepele, která je čárkovitá až nitkovitá. Rostlina tvoří během roku dceřiné cibule. Toulec, tvořen dvěma rozdílně dlouhými listeny, obaluje květenství s oboupohlavními 0 až 20 květy. Okvětní lístky jsou 5 až 5,7 mm dlouhé a přibližně 2,2 až 3 mm široké. Okvětí je zvonkovité se špinavě bílými okvětními lístky s odstínem červené, růžové, zelené, s výraznou tmavou střední žilkou. Tyčinky jsou kratší nebo stejně dlouhé jako okvětí. Pestík z květu vyčnívá, semeník tvoří 6 až 7 mm velké tobolky, které obsahují nízký počet semen. Za květu jsou květní stopky ohnuté k zemi a jsou různě dlouhé (15 až 60 mm). Lichookolík je polokulovitý až kulovitý a tvoří 10 až 60 pacibulek. Kvete od června až do září. (Duchoslav 2001; Ohryzek 2007; Krahulec & Duchoslav 2010; Šafářová & Duchoslav 2010; Duchoslav et al. 2010).

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

Dosud bylo popsáno šest cytotypů, triploidní až oktoploidní ($2n = 24, 32, 40, 48, 56, 64$) (Duchoslav et al. 2010, Šafářová et al. 2011). Ve střední Evropě jsou nejčastější tři cytotypy ($2n = 4x, 5x, 6x$), které se často vyskytují ve smíšených populacích (Šafářová & Duchoslav 2010; Šafářová et al. 2011). Triploidi jsou extrémně vzácní (Šafářová et al. 2011).

Existují studie, které se zabývají možnými souvislostmi mezi různými cytotypy a změnou ekologických nároků *A. oleraceum*. Tetraploidní jedinci mohou být vázáni na přírodní stanoviště, například na stepní louky teplejších oblastí. Výskyt pentaploidních cytotypů byl pozorován v teplejších oblastech nižších až středních nadmořských výšek

na širokém rozmezí biotopů od vysoce mineralizovaných půd do půd s vyšším pH. Hexaploidní jedinci se obvykle vyskytovaly na okrajích cest, polí a ve vyšších nadmořských výškách (Duchoslav et al. 2010). Různé cytotypy *A. oleraceum* se liší také v množství květů a jejich sušině, přičemž s vyšším ploidním stupněm dochází ke snížení množství květů a sušiny (Fialová & Duchoslav 2014).

Reprodukce

A. oleraceum se rozmnožuje pohlavně (sexuálně) pomocí semen a častěji vegetativně (asexuálně) podzemními dceřinými cibulkami nebo nadzemními pacibulkami (Stearn et al. 1980; Duchoslav 2001; Astrom a Hæggström, 2004; Krahulec & Duchoslav 2010). Nicméně po dlouhou dobu byla semena tohoto druhu považována za sterilní a jeho reprodukce výhradně asexuální (Levan 1933). Asker & Jerling (1992) udávají, že tvorba pacibulek je pravděpodobně kontrolována jedním dominantním genem.

Fialová et al. (2014) studovala fenotypovou variabilitu výšky, sexuální (rostliny, semena) a asexuální (pacibulky) rozmnožování v přírodních populacích a v zahradních podmínkách u tří cytotypů ($2n = 4x, 5x, 6x$). Dále porovnávali klíčení a dormanci semen a pacibulek pro stanovení, zda se u propagulí liší jejich ekologické role. Tetraploidní a pentaploidní jedinci si byli dosti podobní, byli vzrůstem vyšší a produkovali více květů než hexaploidi, jež byli převážně bez květů. Všechny cytotypy produkovaly životaschopná semena. Počet těchto semen byl velmi nízký, obvykle méně než tři semena v jednom květenství.

Klonální reprodukce pacibulkami dominovala u všech cytotypů, přičemž tetraploidní jedinci produkovali vyšší množství lehčích pacibulek. Poměr semen a vajíček byl nízký ($<0,1$) u všech cytotypů, avšak u hexaploidů dosáhl vyšších hodnot než u ostatních cytotypů. Pacibulky vyklíčily mnohem lépe (průměr $> 80\%$) než semena všech cytotypů. Pentaploidní pacibulky výsledně dosáhly nejvyšší klíčivosti (průměr $90,5\%$). V klíčení semen se cytotypy od sebe příliš nelišily (rozmezí průměrů $73,4\%$ - $76,3\%$). Semena mohou tvořit krátkodobě půdní banku propagulí.

Fialová (2012) studovala přežívání sexuálně a asexuálně vzniklého potomstva u tetraploidů a pentaploidů za stejných podmínek (hexaploidi byli pro nízké počty rostlin vyřazeni). Vypozorovala trend, kdy se snižovaly schopnosti přežívání rostlin vypěstovaných ze semen se zvyšujícím se ploidním stupněm. Opačně tomu bylo

u rostlin vypěstovaných z pacibulek. Zde docházelo k vlivu zejména rozdílné počáteční velikosti obou propagulí (pacibulky obsahují více zásobních látek pro vývoj rostliny) (Bengtsson & Ceplitis, 2000 in Fialová 2012). Rostliny vypěstované ze semen byly menšího vzrůstu a hůře odolávaly konkurenci, fyzikálnímu stresu (Fialová 2012).

Åström and Haeggström (2004) v severní Evropě studovali klíčení semen u tetra- a pentaploidních rostlin. Semena pentaploidů klíčila daleko lépe ve srovnání se semeny tetraploidních jedinců. Nicméně situace ve střední Evropě je poněkud odlišná od střední Evropy, především díky frekventovaným smíšeným populacím, jejichž výskyt není příliš uniformní jako populace tetraploidních a pentaploidních cytotypů v severní Evropě (Šafářová & Duchoslav 2010).

Jírová (2007) studovala klíčivost pylu u cytotypů $2n = 3x, 4x, 5x, 6x$. Pylová láčka u triploidů nevykazovala téměř žádnou klíčivost (0-5%, medián = 1%), což dokazuje omezenou schopnost triploidů účastnit se sexuálního rozmnožování (Levin 1975). U běžných cytotypů ($2n = 4x, 5x, 6x$) vyklíčilo 20-60% pylových láček a nebyl mezi nimi prokázán žádný rozdíl.

Jandová (2010) studovala cytotypovou kompozici generativního potomstva. Její výsledky průtokové cytometrie ukázaly, že druh *A. oleraceum* je schopen produkovat cytotypově variabilní potomstvo u semen i semenáčků, které byly vyprodukovány $4x, 5x$ i $6x$ mateřskými rostlinami. U těchto rostlin bylo v případě tetraploidů vyprodukováno 86,5% tetraploidů, 1,0% triploidů, 8,3% pentaploidů, 1,6% hexaploidů a 2,6% heptaploidů. Pentaploidní mateřské rostliny produkovaly $5x$ semena s frekvencí 68,9%, $6x$ semena s frekvencí 22,6%. V ostatních případech byla produkována $4x$ (7,3%), $7x$ (0,6%) i $8x$ (0,6%) semena. Mezi semenáčky se vyskytli pentaploidi (80%), hexaploidi (3,4%), $4x$ (15,2%) i $7x$ (1,4%) rostlin. Výsledky tedy vypovídají o vysoce nepravidelném redukčním dělení pentaploidů. V generativním potomstvu hexaploidů dominoval $6x$ cytotyp (87,7%) u semen a u semenáčků 67,6%. Druhým cytotypem byli pentaploidi (6,6%) a u semenáčků 32,4%. U semen byli nalezeni i heptaploidi (3,8%) a oktoploidi (1,9%) pouze v rámci smíšených populací ($5x, 6x$ a $4x, 5x, 6x$), které mohly přispět další cytotyp. Autorka dle svých výsledků předpokládá, že hexaploidi produkují pravděpodobně převážně $4x, 3x$ a $2x$ gamety. Šafářová & Duchoslav (2010) ve své práci zvažují vznik smíšených populací $4x, 5x$ a $4x, 5x, 6x$ zapříčiněný fúzí redukovaných a neredukovaných gamet. Toto zvažování je podporováno přítomností hexaploidů mezi generativními potomky $4x$ i $5x$ v práci Jandové (2010).

7. Materiál a metody

Vzorky, tedy květy s pylovými zrny *A. oleraceum* jsem postupně odebírala z evropských populací rostlin zapěstovaných v plastových kontejnerech (15x15x18 cm) zapuštěných vedle sebe v liniích do země na pozemku v pokusné zahradě Katedry botaniky UP v areálu Holice. U všech studovaných populací označených štítkem s popisem populace a roku sběru byl již dříve zjištěn stupeň ploidie pomocí průtokové cytometrie (Duchoslav et al. 2015).

7.1. Stanovení fertility mikrospor

Pro studium fertility mikrospor *A. oleraceum* jsem odebírala květy 33 jedincům (Příloha, tabulka 1) čtyř cytotypů ($2n = 3x, 4x, 5x, 6x$) z již existujících populací zapěstovaných v pokusné zahradě v areálu PřF UP v Holici. Čerstvě rozkvetlý květ byl odebrán vždy v dopoledních hodinách, aby se zachovaly zralé prašníky. Pro stanovení fertility mikrospor jsem použila metodu fluorescenční mikroskopie (Jeřábková 2005). Mikrospory jsem naprášila do kapky fluoresceindiacetátu (FDA) na podložním skle odmaštěném lihem a inkubovala po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Kapku jsem přikryla krycím sklíčkem a pozorovala pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus Bx60, Olympus Optical Co. Europa GmbH), při stonásobném zvětšení. V zorném poli jsem spočítala všechny mikrospory a počet všech mikrospor, které pod fluorescenčním filtrem svítily jasně zelenou barvou (= fertilní mikrospory). Z těchto počtů jsem získala poměr vyjadřující fertilitu mikrospor v procentech.

7.2. Měření velikosti mikrospor

Následně jsem pomocí softwaru QuickPHOTO CAMERA 3 změřila délku v mikrometrech alespoň u 100 pylových zrn v každém preparátu v již zmíněném zorném poli (Příloha, Obr. 5 - 9). U každého preparátu jsem vyfotografovala pomocí kamery snímek v normálním zobrazení (bez režimu fluorescence). Jen u některých snímků bylo možné vyfotografovat živé a svítící mikrospory. Ke všem snímkům jsem (v rámci programu QuickPHOTO CAMERA 3) připojila vrstvu s měřítkem tak, aby odpovídalo aktuálnímu zvětšení objektivu mikroskopu.

7.3. Stanovení životnosti (klíčivosti) mikrospor

Pro studium životnosti jsem použila metodu klíčivosti pylu *in vitro* (Dafni 1992) optimalizovanou pro *A. sativum*, *A. longicupsis* a *A. fistulosum* (Havránek, *in litt.*) Připravila jsem 100 ml zásobního roztoku z 20 mg H_3BO_3 , 60 mg $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 17 g sacharosu a destilované vody. Roztok jsem napipetovala do 10 „ependorfek“ a zamrazila. Z 5 ml zásobního roztoku jsem připravila agarovou plenu. Do 5 ml zásobního roztoku jsem přidala 50 mg agaru a směs rozvařila ve vodní lázni. Ještě horkou směs jsem nalila na odmaštěná vodorovně položená podložní sklička tak, aby jej rovnoměrně pokryla vrstvou tenkou přibližně 1 mm. Po zchladnutí tenkého filmu jsem naprášila na jeho povrch pyl z čerstvě otevřených prašníků. Pyl jsem inkubovala po dobu 24 hodin při pokojové teplotě v uzavřených krabičkách položených na buničině nasáklé destilovanou vodou. Za 24 hodin se měly pod mikroskopem spočítat všechny klíčící pylové láčky a celkový počet mikrospor v zorném poli. Vždy mělo být spočítáno minimálně 500 pylových zrn v zorném poli u jednotlivých vzorků.

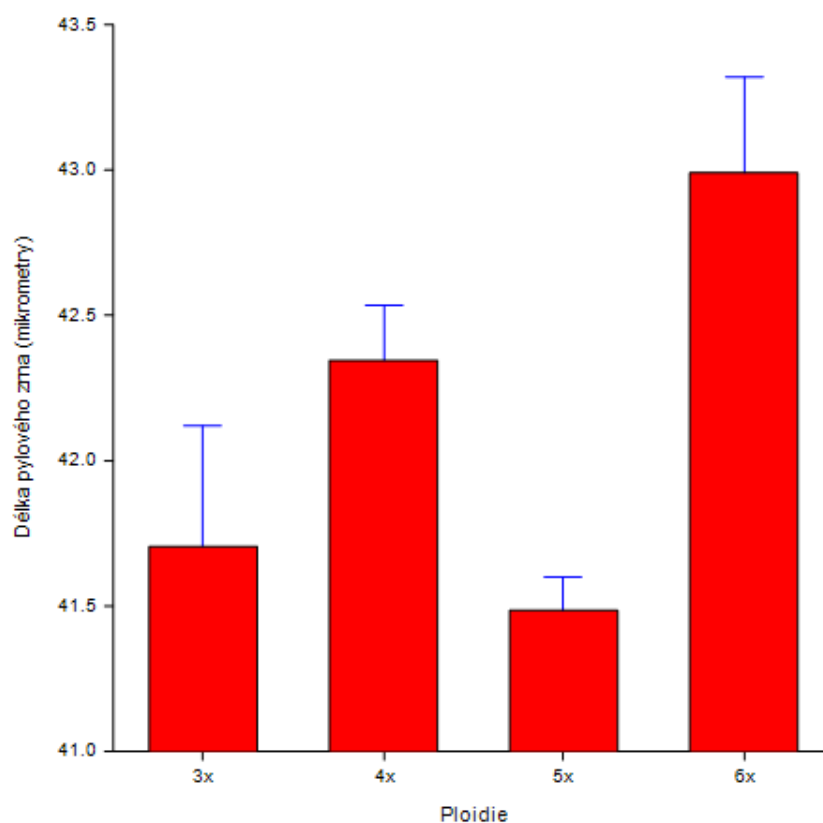
7.3. Statistické zpracování

Data byla analyzována v programu NCSS 9 (NCSS Inc., Kaysville, USA), pro testování vlivu ploidního stupně na fertilitu mikrospor byla použita jednocestná ANOVA, kde jednotlivé opakování reprezentovalo procentuelní podíl fertálních mikrospor. Vliv ploidie na délku mikrospor byl analyzován obecným lineárním modelem (GLM), kde ploidie byla faktorem s pevným efektem a jedinec byl náhodným faktorem podřazeným ploidii. Do této analýzy byly zahrnuty pouze nesmíšené populace. Velikost pylových zrn byla změřena celkem u 33 kvetoucích jedinců, z nichž 2 byli triploidní, 8 jedinců tetraploidní, 18 jedinců pentaploidní a 2 jedinci hexaploidní (Příloha, tabulka 3). Analýza stanovení životnosti mikrospor zcela chybí kvůli neklíčení pylových láček.

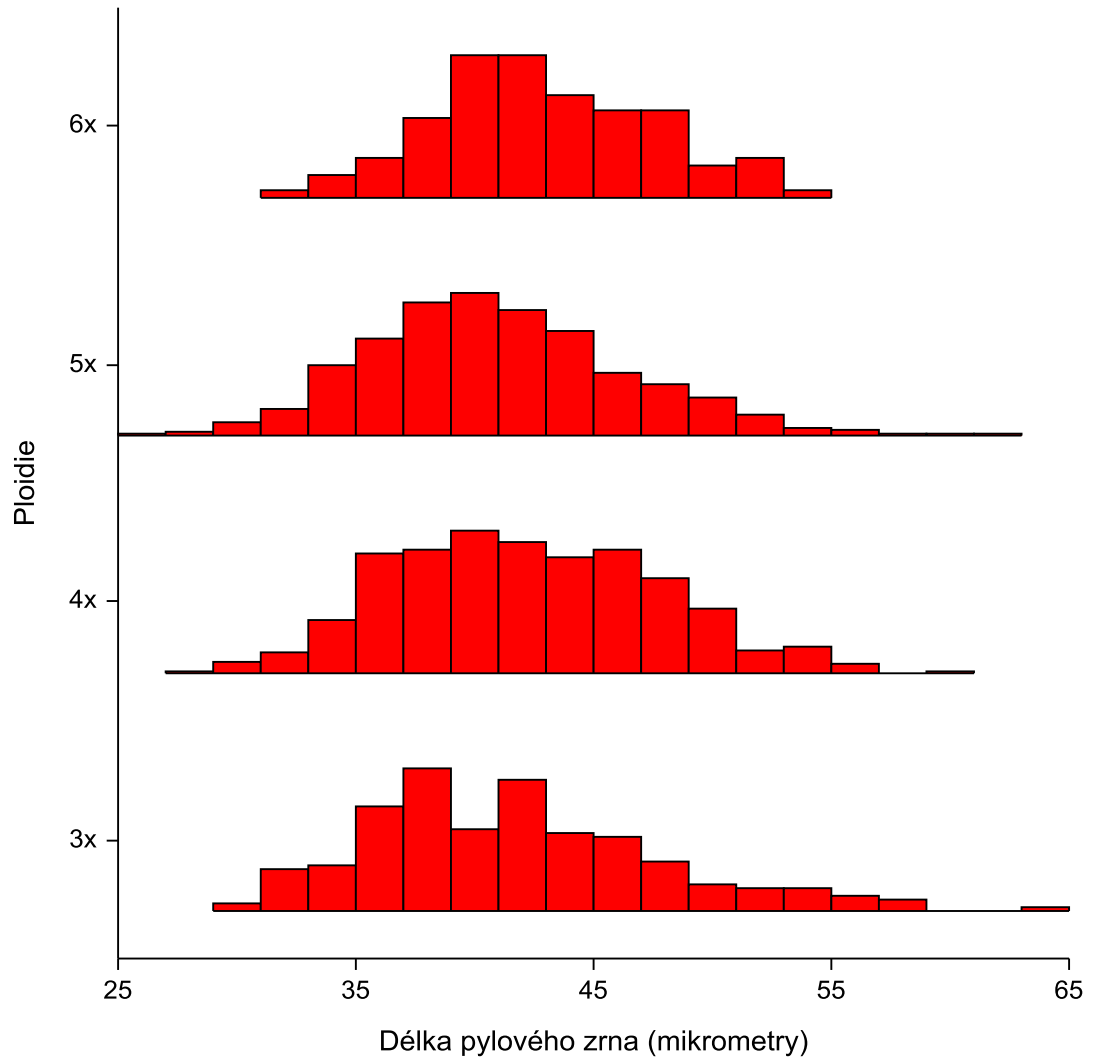
8. Výsledky

8.1. Velikost pylových zrn

Velikost pylových zrn se u jednotlivých ploidí *A. oleraceum* navzájem výrazně nelišila, mezi jedinci (populacemi) v rámci ploidí však byla odlišná (GLM ploidy: $F = 0,420$; $P = 0,738$; jedinec: 24,20, $P = 0,000$, DF ploidy = 3; DF jedinec = 29; DF total = 3519). Nepatrně delší pylová zrna vykazovaly hexaploidní (6x) a tetraploidní (4x) vzorky *A. oleraceum*, naopak nejkratší byla pylová zrna pentaploidů (Obr. 1, tabulka 1). Náznak dvouvrcholového rozdělení velikosti mikrospor u triploidů (Obr. 2) je způsoben výrazným rozdílem mezi studovanými populacemi. Největší rozsah velikostí mikrospor byl zjištěn u pentaploidů, nejmenší u hexaploidů (Obr. 1).



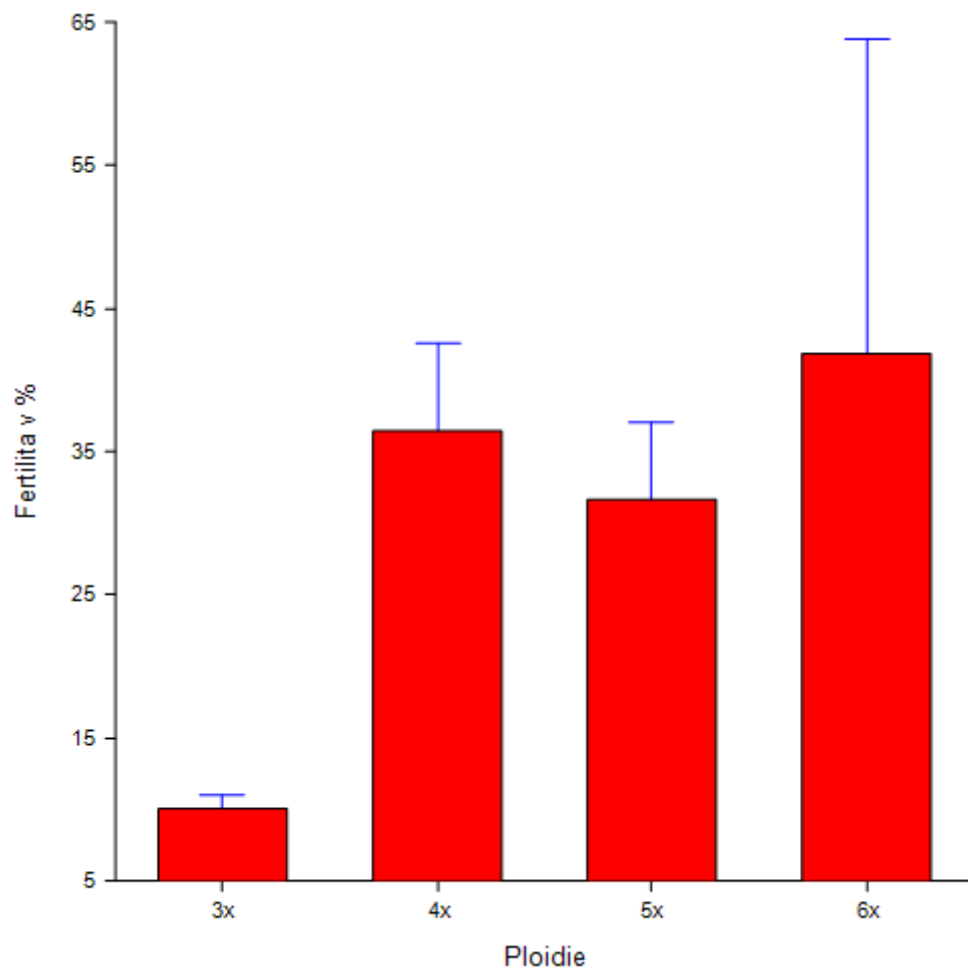
Obr. 1. Velikost pylových zrn (průměr + standardní chyba) studovaných cytotypů *Allium oleraceum*



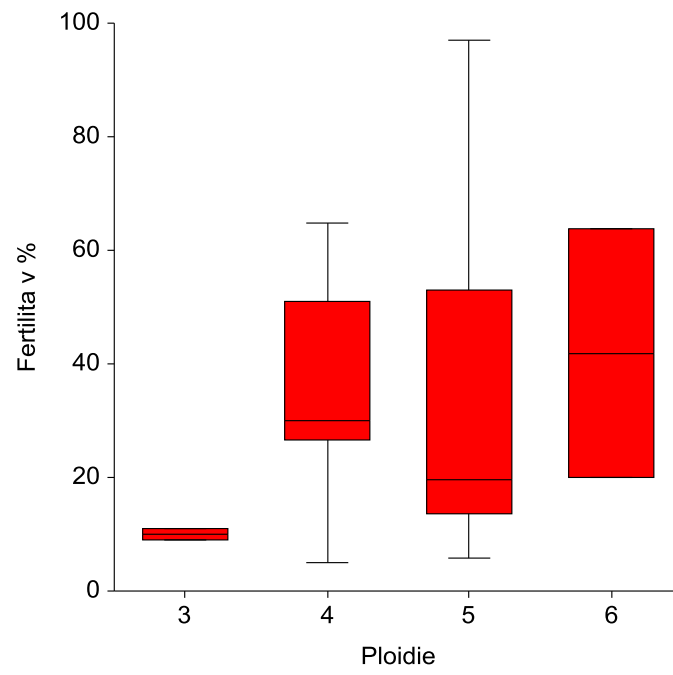
Obr. 2. Histogramy velikostí pylových zrn v mikrometrech pro jednotlivé ploidie

8.2. Fertilita pylových zrn

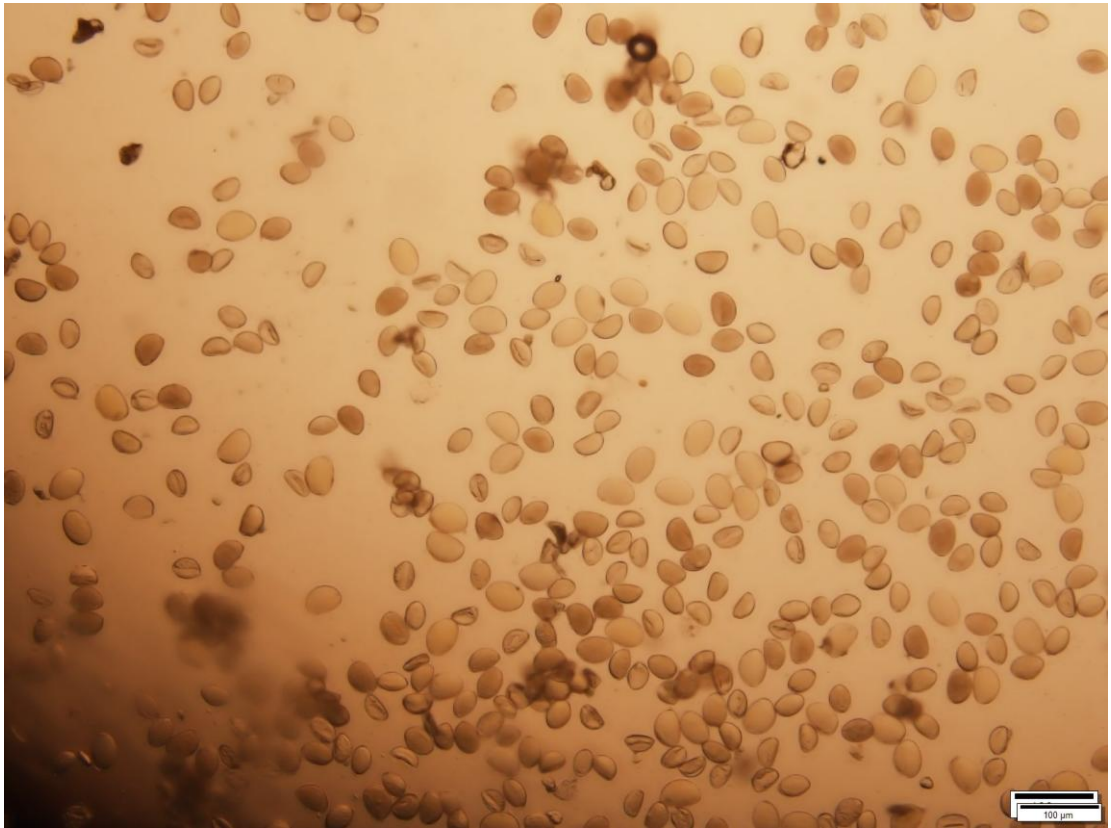
Jednocestná ANOVA neprokázala signifikantní vztah mezi fertilitou pylových zrn a ploidií (ANOVA, ploidie: $F = 1.14$, $P = 0.348$). Avšak nepatrně vyšší fertilitu pylových zrn jsem zaznamenala u hexaploidních (6x) a tetraploidních (4x) jedinců. Nejnižší fertilitu vykazovaly triploidní (3x) a pentaploidní (5x) vzorky pylových zrn *A. oleraceum*.



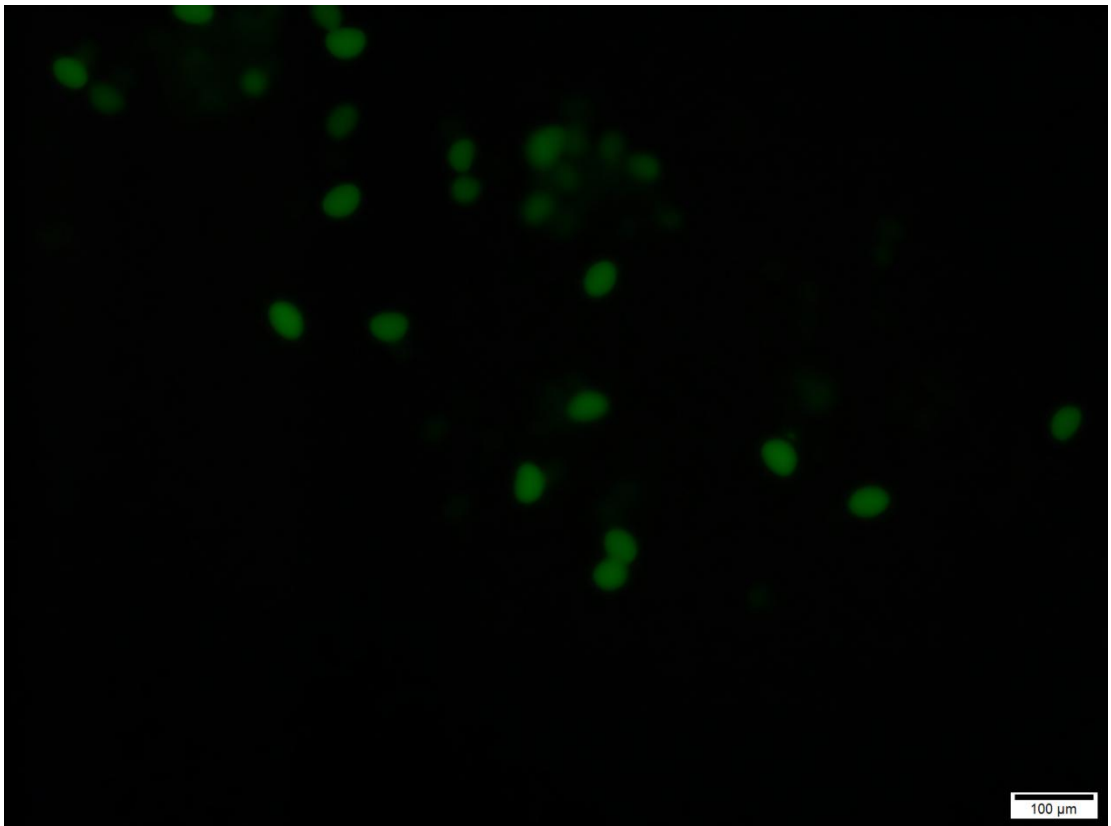
Obr. 3. Fertilita pylových zrn (průměr + standardní chyba) studovaných cytotypů *Allium oleraceum*



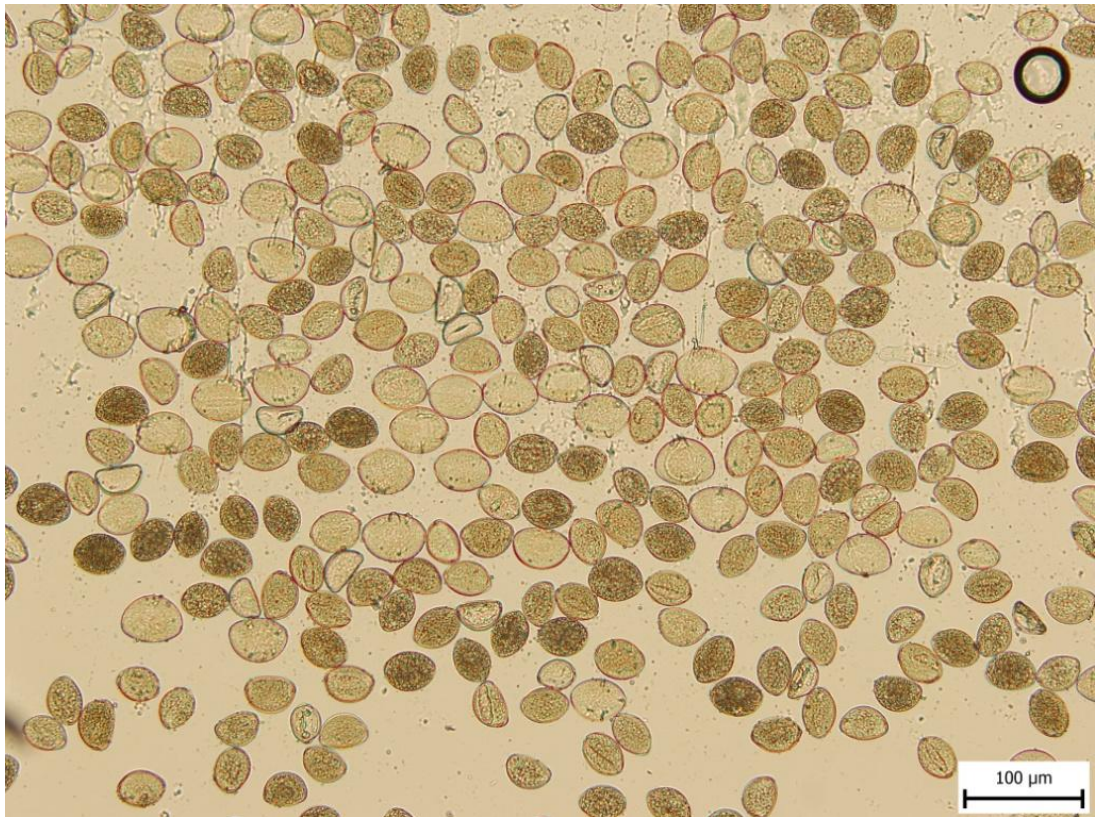
Obr. 4. Krabičkový diagram fertility pylových zrn a ploidie *A. oleraceum*



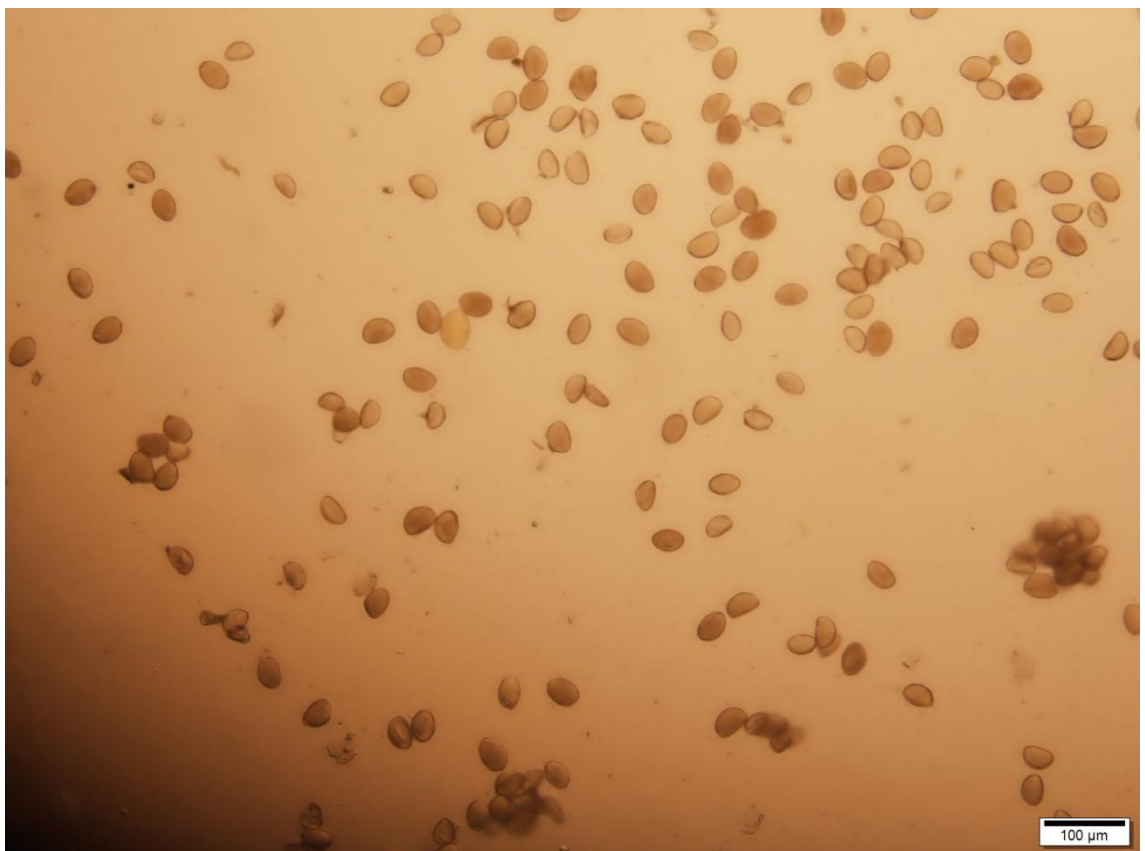
Obr. 5. Fotografie mikrospor *A. oleraceum* při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/87B, tetraploid



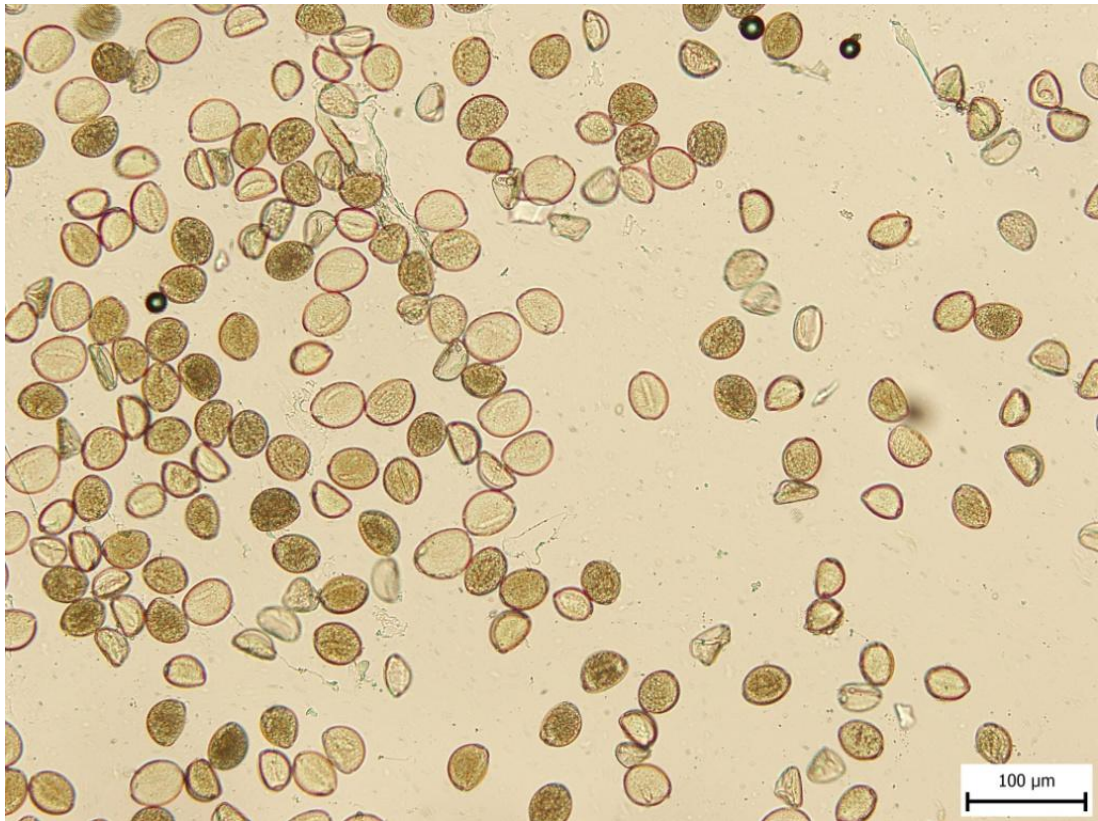
Obr. 6. Fotografie mikrospor *A. oleraceum* při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/87B, fluorescenční režim, tetraploid



Obr. 7. Fotografie mikrospor *A. oleraceum* při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/2C, pentaploid



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



Obr. 9. Fotografie mikrospor *A. oleraceum* při zvětšení 10x20 – číslo populace: 04/14C, pentaploid

9. Diskuse

V této práci bylo studováno 33 kvetoucích zástupců populací *A. oleraceum* různého ploidního stupně ($2n = 3x, 4x, 5x, 6x$). U těchto kvetoucích jedinců byla změřena délka mikrospor pod mikroskopem, kde se ukázalo, že nejdelší pylová zrna byla naměřena u hexaploidů. Levan (1933) udává, že délka pylových zrn u rodu *Allium* vzrůstá spolu se zvyšujícím se chromozomovým číslem. Ve výsledcích byla naměřena mnohem nižší délka pylových zrn u pentaploidů než u tetraploidů a triploidů.

Pro určení fertility mikrospor byla vybrána metoda fluorescencní mikroskopie (Jeřábková 2005). I přes krátký čas, po který byly vzorky pylu vystaveny záření za účelem fluorescence, se podařilo určit fertilitu mikrospor u všech 33 kvetoucích zástupců populací. Nejvyšší procento fertility bylo zjištěno u hexaploidů a tetraploidů. Nejnižší procento fertility bylo stanoveno u triploidů a pentaploidů, což poukazuje na jejich omezenou schopnost zapojit se do sexuálního rozmnožování (Levin 1975).

Absence výsledků klíčivosti pylových zrn je bohužel z neznámé příčiny. Mohu se pouze domnívat, zda hrála důležitou roli délka inkubace pylových zrn. Při určování životnosti mikrospor *in vitro* jsem narazila na problém, kdy na připraveném agaru mikrospory neklíčily, ačkoli mikrospory z totožných jedinců byly v ten samý den podrobeny určování fertility pod fluorescencním mikroskopem (byly viditelně fertilmí, a tím i živé). Proto tato metoda stanovení životnosti mikrospor byla upravena naředěním koncentrací roztoku od 10 – 90% s cílem nalezení vhodné koncentrace. To se však nepodařilo, mikrospory stále neklíčily. Zkoušela jsem také klíčit mikrospory ze zcela jiného druhu rostliny na tomto agaru, ale opět nevyklíčily, i když pod fluorescencním mikroskopem zřetelně vykazovaly fertilitu. Poté jsem zkoušela stejný postup s agarózou, na které opět nevyklíčil žádný pyl. Proto nebyla metoda stanovení životnosti mikrospor *in vitro* zahrnuta do výsledků tohoto projektu.

Jírová (2007) studovala klíčivost pylu *in vitro* téměř identickým postupem s tím rozdílem, že pylová zrna inkubovala po dobu jen 16 hodin. Stanovila klíčivost pylu u tetraploidů, pentaploidů a hexaploidů s vysokou variabilitou klíčivosti u pentaploidů (20-60%). U triploidů stanovila klíčivost přibližně 1%, což poukazuje na omezenou schopnost triploidů účastnit se sexuálního rozmnožování (Levin 1975).

Åström a Hæggröm (2004) ve své studii uvádí životaschopnost pylu u pentaploidů *A. oleraceum* mezi 20% a 76% s průměrem 55% a klíčivost pentaploidů přibližně 16%. Pro další studium by bylo velmi vhodné analyzovat vyšší počet vzorků pokud možno vyšším počtem vzácnějších cytotypů a s více než dvěma zástupci na populaci, aby bylo možné vypracovat podrobnější statistické analýzy.

10. Závěr

Předložená práce je zaměřená na reprodukční biologii polyploidního komplexu *A. oleraceum*. Rozšíření druhu je od Skandinávie po oblast Středomoří, přičemž se hojně vyskytuje ve střední, východní a západní Evropě (Krahulec & Duchoslav 2010). U tohoto druhu je známo zatím šest cytotypů, od triploidů po oktoploidy (Duchoslav et al. 2010, Šafářová et al. 2011). Ve střední Evropě jsou nejčastější čtyři cytotypy ($2n = 3x, 4x, 5x, 6x$), které se často vyskytují ve smíšených populacích (Šafářová & Duchoslav 2010; Šafářová et al. 2011). Triploidní jedinci jsou velmi vzácní (Šafářová et al. 2011). Cílem této práce bylo poskytnout literární rešerši na uvedené téma a pomocí studia pylu zjistit možný vztah mezi ploidním stupněm ($2n = 3x, 4x, 5x, 6x$) a fertilitou mikrospor. Studován byl také možný vztah mezi délkou pylových zrn a ploidními úrovněmi.

Při analýze studia pylu *A. oleraceum* jsem dospěla k těmto výsledkům:

1) Velikost pylových zrn

- velikost pylových zrn se u jednotlivých ploidií *A. oleraceum* navzájem výrazně nelišila, mezi jedinci (populacemi) v rámci ploidií však byla odlišná
- nepatrně větší velikost pylových zrn vykazovaly hexaploidní (6x) a tetraploidní (4x) vzorky *A. oleraceum*, naopak nejmenší byla pylová zrna pentaploidů
- náznak dvouvrcholového rozdělení velikosti mikrospor u triploidů
- největší rozsah velikostí mikrospor byl zjištěn u pentaploidů, nejmenší u hexaploidů

2) Fertilita pylových zrn

- signifikantní vztah mezi fertilitou pylových zrn a ploidií nebyl prokázán
- nepatrně vyšší fertilitu pylových zrn jsem zaznamenala u hexaploidních (6x) a tetraploidních (4x) jedinců.
- nejnižší fertilitu vykazovaly triploidní (3x) a pentaploidní (5x) vzorky pylových zrn *A. oleraceum*

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že velikost pylových zrn je v rámci ploidie odlišná, avšak předpokládaná (Levan 1933) vzrůstající délka pylových zrn se zvyšujícím se ploidním stupněm neodpovídá v případě pentaploidů. To může poukazovat na možnost existence aneuploidie u pentaploidů, popř. triploidů, kde se mohou tvořit pylová zrna s nižším počtem chromozomů. Z analýzy výsledků fertility pylových zrn vyplývá, že u triploidů a pentaploidů pravděpodobně existuje omezená schopnost účastnit se sexuálního rozmnožování.

Literatura

- Asker, Sven E. a Jerling, Lenn. 1992.** *Apomixis in plants*. místo neznámé : Boca Raton: CRC Press, 1992. str. 298.
- Åström, H. a Hægström, C.A. 2004.** Generative reproduction in *Allium oleraceum* (Alliaceae). *Annales Botanici Fennici*. 2004, Sv. 1, 41, stránky 1-14.
- Barrett, Spencer C.H. 1992.** Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. *Monographs on Theoretical and Applied Genetics*. 1992, 15, stránky 1-29.
- Barringer, Brian C. 2007.** Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. *American Journal of Botany*. 2007, Sv. 9, 94, stránky 1527-1533.
- Bennett, M. D. a Leitch, I. J. 2011.** Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Annals of Botany*. 2011, Sv. 3, 107, stránky 467–590.
- Bennett, Michael D. 2004.** Perspectives on polyploidy in plants - ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2004, 82, stránky 411-423.
- Bernardette, Julier, a další. 2003.** Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biology*. 2003, Sv. 1, 3, str. 9.
- Bicknell, Ross A. a Koltunow, Anna M. 2004.** Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. *The Plant Cell*. 2004, 16, stránky 228–246.
- Bretagnolle, J. a Thompson, J. D. 1995.** Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*. 1995, Sv. 1, 129, stránky 1-22.
- Briggs, D. a Walters, S.M. 2001.** *Proměnlivost a evoluce rostlin*. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2001. str. 531.
- Carlos, Juan del Pozo a Ramirez-Parra, Elena. 2015.** Whole genome duplications in plants: an overview from. *Journal of Experimental Botany*. 2015, str. 13.
- Ceptilis, A. a Bengtsson, B. O. 2004.** Genetic variation, disequilibrium and natural selection on reproductive traits in *Allium vineale*. *Journal of Evolutionary Biology*. 2004, 17, stránky 302–311.
- Cosendai, Anne-Caroline a Hörandl, Elvira. 2009.** Cytotype stability, facultative apomixis and geographical parthenogenesis in *Ranunculus kuepferi*. *Annals of Botany*. 2009, Sv. 3, 105, stránky 457-470.

Dafni, A. 1992. *Pollination ecology: a practical approach*. místo neznámé : Oxford University Press, 1992. str. 250.

Dufresne, France, a další. 2014. Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: an overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools. *Molecular ecology*. 2014, Sv. 1, 23, stránky 40-69.

Duchoslav, Martin. 2001. *Allium oleraceum* and *A. vineale* in the Czech Republic: distribution and habitat differentiation. *Preslia*. 2001, 73, stránky 173–184.

—. **2001.** Small-scale spatial pattern of two common European geophytes *Allium oleraceum* and *A. vineale* in contrasting habitats. *Biologia-Bratislava*. 2001, Sv. 1, 56, stránky 57-62.

—. **2001.** Small-scale spatial pattern of two common European geophytes *Allium oleraceum* and *A. vineale* in contrasting habitats. *Biologia*. 2001, 56, stránky 57–62.

Duchoslav, Martin, Šafářová, Lenka a Krahulec, František. 2010. Complex distribution patterns, ecology and coexistence of ploidy levels of *Allium oleraceum* (Alliaceae) in the Czech republic. *Annals of botany*. 2010, Sv. 5, 105, stránky 719-735.

Duchoslav, Martin; Jandová, Michaela; Kalous, Roman; Trávníček, Bohumil; Kobrlová, Lucie; Krahulec, František; Michal, Sochor; Michal, Hroneš; Jírová, Alena. 2015. *Mezinárodní česneky, databáze lokalit*. [Nepublikovaný dokument] Olomouc : autor neznámý, 2015.

Feil, Robert a Berger, Frédéric. 2007. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends in Genetics*. 2007, Sv. 4, 23, stránky 192-199.

Ferrer, M. M. a Good, S. V. 2012. Self-sterility in flowering plants: preventing self-fertilization increases family diversification rates. *Annals of Botany*. 2012, Sv. 3, 110, stránky 535-553.

Fialová, Martina a Duchoslav, Martin. 2014. Response to competition of bulbous geophyte *Allium oleraceum* differing in ploidy level. *Plant Biology*. 2014, 16, stránky 186–196.

Fialová, Martina. 2012. Variabilita reprodukčních znaků a přežívání sexuálně a asexuálně vzniklého potomstva polyploidního komplexu česneku planého (*Allium oleraceum*). *Zprávy Vlastivědného muzea v Olomouci*. 2012, 303, stránky 22–31.

Fialová, Martina, a další. 2014. Biology of the polyploid geophyte *Allium oleraceum* (Amaryllidaceae): Variation in size, sexual and asexual reproduction and germination within and between tetra-, penta- and hexaploid cytotypes. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 2014, Sv. 7, 209, stránky 312–324.

Gerstein, Aleeza C. a Otto, Sarah P. 2009. Ploidy and the Causes of Genomic Evolution. *Journal of Heredity*. 2009, Sv. 5, 100, stránky 571-581.

- Gerstel, D. U.** Self-incompatibility studies in Guayule. II. Inheritance. *Genetics*. 35, stránky 482-506.
- Grant, V. 1981.** *Plant speciation*. New York : Columbia Univ Press, 1981. str. 561.
- Griese, Marco, Lange, Christian a Soppa, Jörg. 2011.** Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2011, Sv. 2, 323, stránky 124-131.
- Hilu, K. W. 1993.** Polyploidy and the evolution of domesticated plants. *American Journal of Botany*. 1993, Sv. 12, 80, stránky 1494-1499.
- Hörandl, Elvira a Temsch, Eva M. 2009.** Introgression of apomixis into sexual species is inhibited by mentor effects and ploidy barriers in the *Ranunculus auricomus* complex. *Annals of Botany*. 2009, Sv. 1, 104, stránky 81-89.
- Husband, Brian C. a Sabara, Holly A. 2004.** Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist*. 2004, Sv. 3, 161, stránky 703-713.
- Chen, Jeffrey Z. 2010.** Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *TRENDS IN PLANT SCIENCE*. 2010, Sv. 2, 15, stránky 57-71.
- Chen, Z. J. 2007.** Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual review of plant biology*. 2007, 58, stránky 377-406.
- Jackson, Scott a Chen, Jeffrey Z. 2010.** Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Current Opinion in Plant Biology*. 2010, 13, stránky 153-159.
- Jandová, Michaela. 2010.** *Cytogenetická studie generativního potomstva polyploidního komplexu Allium oleraceum*. Olomouc : Diplomová práce, 2010. str. 91.
- Jeřábková, Petra. 2005.** Determination of yeast viability by means of fluorescence microscopy and image analysis. *Institute of Physical and Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology Brno*. 2005, stránky 1-4.
- Jírová, Alena. 2007.** *Reprodukční biologie a fenologie polyploidního komplexu Allium oleraceum*. Olomouc : Diplomová práce, 2007. str. 89.
- Kohler, Claudia, Scheid, Ortrun Mittelsten a Erilova, Aleksandra. 2010.** The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. *Trends in Genetics*. 2010, Sv. 26, 3.
- Leitch, Ilia J. a Bennett, Michael D. 1997.** Polyploidy in angiosperms. *trends in plant science*. 1997, Sv. 12, 2, stránky 470-476.
- Levan, Albert. 1937.** Cytological studies in the *Allium paniculatum* group. *Hereditas*. 1937, 23, stránky 317 - 370.

- Levin, Donald A. 1983.** Polyploidy and Novelty in Flowering Plants. *The American Naturalist*. 1983, Sv. 1, 122, stránky 1-25.
- Mable, Barbara K. 2004.** Polyploidy and self-compatibility: is there an association? *New Phytologist*. 2004, 162, stránky 803–811.
- Novák, Jan a Skalický, Milan. 2012.** *Botanika : cytologie, histologie, organologie a systematika*. Praha : Powerprint, 2012. str. 336.
- Nowak, Michael D., a další. 2015.** The draft genome of *Primula veris* yields insights into the molecular basis of heterostyly. *Genome Biology*. 2015, Sv. 1, 16.
- Otto, SP. a Whitton, J. 2000.** Polyploid incidence and evolution. *ANNUAL REVIEW OF GENETICS*. 2000, 34, stránky 401-437.
- Parisod, Christian, Holderegger, Rolf a Brochmann, Christian. 2010.** Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist*. 2010, Sv. 1, 186, stránky 5-17.
- 2012.** Portál AOPK ČR: Portál informačního systému ochrany přírody - Databáze C1 rostlin (zkrácený výpis) . *Portál AOPK ČR*. [Online] 2012.
http://portal.nature.cz/c1/c1_druh.php?opener=&vztazne_id=0&order=CELED&orderhow=DESC.
- Ramsey, Justin a Schemske, Douglas W. 2002.** Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 2002, 33, stránky 589-639.
- . **1998.** Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1998, 29, stránky 467-501.
- Scott, Rod J., a další. 1998.** Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 1998, 125, stránky 3329-3341.
- Soltis, D.E. Buggs R.J.A., Doyle, J. J. a Soltis, P. S. 2010.** What we still don't know about polyploidy. *Taxon*. 2010, 59, stránky 1387-1403.
- Soltis, Douglas E. a Soltis, Pamela S. 1999.** Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution*. 1999, Sv. 9, 14, stránky 348-352.
- Soltis, Douglas E., a další. 2010.** What we still don't know about polyploidy. 2010, Sv. 5, 59, stránky 1387–1403.
- Soltis, Douglas E., Clayton, Visger J. a Soltis, Pamela S. 2014.** THE POLYPLOIDY REVOLUTION THEN...AND NOW: STEBBINS REVISITED. *American Journal of Botany*. 2014, Sv. 7, 101, stránky 1057 -1078.
- Soltis, Douglas E., Soltis, Pamela S. a Tate, Jennifer A. 2004.** Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist*. 2004, Sv. 1, 161, stránky 173-191.

Stebbins, G. L. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. London : Edward Arnold, 1971.

Suda, Jan. 2009. Darwinova „odporná záhada“ po 130 letech aneb souvisí polyploidie. *Živa*. 2009, 5, stránky 204-208.

Šafářová, Lenka, a další. 2011. *Allium oleraceum* in Slovakia: cytotype distribution and ecology. *Preslia*. 2011, 83, stránky 513–527.

Thompson J, Lumaret R. 1992. Thompson J, Lumaret R. 1992. The evolutionary dynamics of polyploid. *Trends in Ecology and Evolution*. 1992, stránky 302-307.

Vinter, Vladimír a Macháčková, Petra. 2013. *Přehled morfologie cévnatých rostlin : studijní opora e-learningových vzdělávacích modulů projektu BOTASKA*. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. str. 198.

Vinter, Vladimír. 2008. *Rostliny pod mikroskopem: základy anatomie cévnatých rostlin*. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2008. str. 186.

Vosa, C. G. 1976. Heterochromatic banding patterns in *Allium*. *Chromosoma*. 1976, 57, stránky 119–133.

Vries, Hugo De. 1914. The Probable Origin of *Oenothera Lamarckiana* Ser. *Botanical Gazette*. 1914, Sv. 5, 57, stránky 345-361.

Wikipedia: the free encyclopedia. 2001. Self-incompatibility in plants. [Online] 2001. [Citace: 11. 4 2015.] https://en.wikipedia.org/wiki/Self-incompatibility_in_plants.

Wood, Troy E., a další. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *PNAS*. 2009, Sv. 33, 106, stránky 13875–13879.

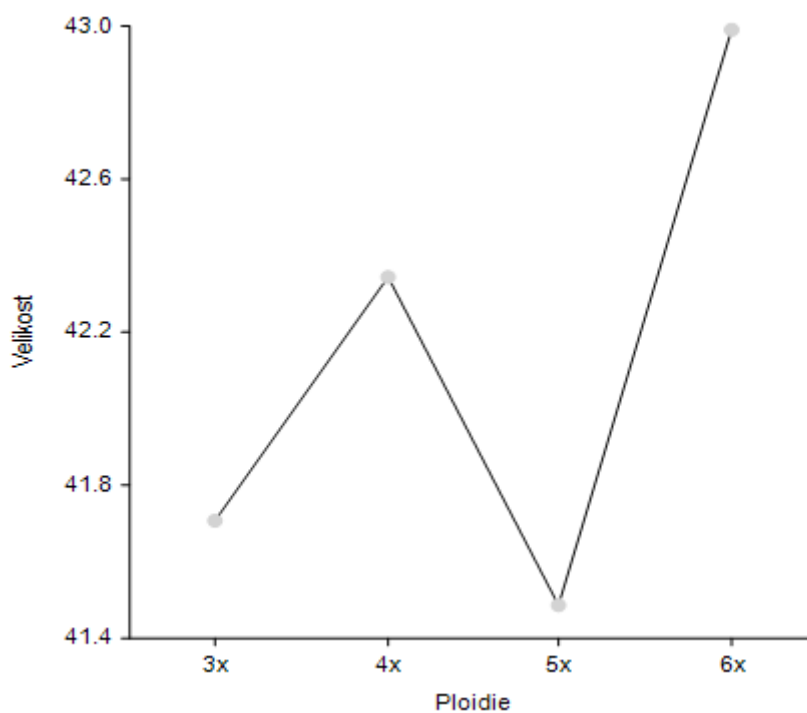
Přílohy

Tabulka 1. Průměr a standardní chyba GLM velikosti pylových zrn a studovaných cytotypů *Allium oleraceum*

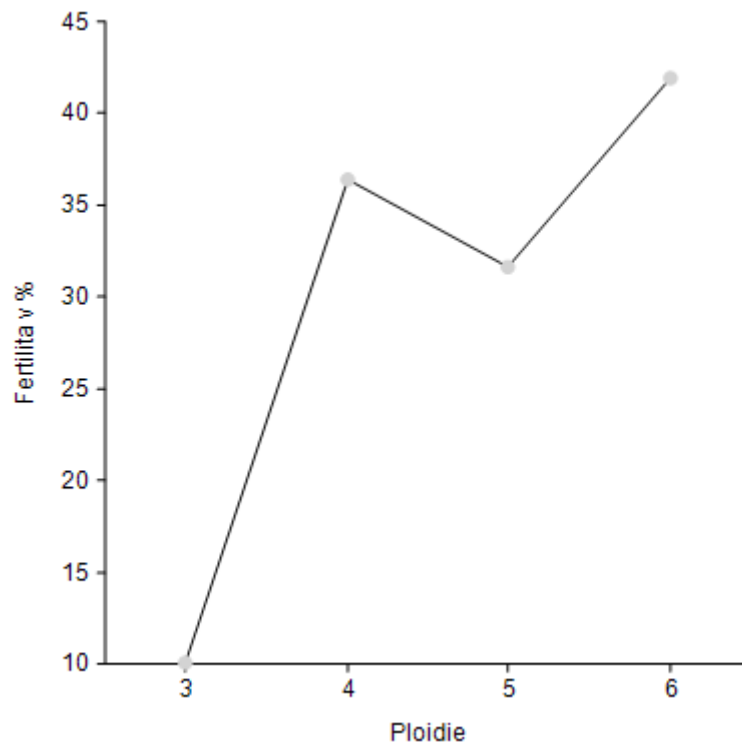
ploidie	počet	průměr	standardní chyba
3x	223	41.70	1.633264
4x	822	42.34	0.850693
5x	2274	41.48	0.511462
6x	200	42.99	1.724622

Tabulka 2. Fertilita pylových zrn (průměry a standardní chyba) studovaných cytotypů *Allium oleraceum*

ploidie	počet	průměr	standardní chyba
3x	2	10,03	16,08007
4x	9	36,41	7,580217
5x	20	31,63	5,084964
6x	2	41,88	16,08007



Obr. 10. Průměry hodnoty velikosti pylových zrn u studovaných cytotypů *A. oleraceum* v mikrometrech



Obr. 11. Průměrné hodnoty fertility pylu studovaných cytotypů *A. oleraceum* v procentech

Tabulka 3. Přehled evropských populací použitých při výzkumu

populace	jedinec	fertilita mikrospor v %	ploidie	stát
1	04/2C	18,08	5	Slovensko
2	04/4A	41,82	5	Slovensko
3	04/4C	9,44	5	Slovensko
4	04/5A	5,83	5	Maďarsko
5	04/5 C	19,71	5	Maďarsko
6	04/10E	19,53	5	Slovensko
7	04/12F	12,34	5	Slovensko
8	04/14 C	19,31	5	Slovensko
9	04/16	4,94	4	Slovensko
10	04/33E	10,90	5	Maďarsko
11	04/48C	20,00	6	Rakousko
12	04/86A	34,00	4	Slovensko
13	04/87B	29,00	4	Slovensko
14	04/88	30,00	4	Slovensko
15	04/103	64,70	4	Francie
16	05/133A	24,16	5	Německo
17	05/137	53,01	5	Německo
18	05/157	58,80	4	Slovensko
19	06/12B	58,70	5	Chorvatsko
20	06/14 A	52,77	5	Maďarsko
21	06/2A	26,75	5	Maďarsko
22	06/16 C	64,34	5	Maďarsko
23	06/24	11,00	3	Maďarsko
24	06/46	63,00	6	Itálie

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



Obr. 12. Česneky z mezinárodní databáze ve skleníku, využité pro studium (ilustrační fotografie)