

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jan Ptáček

Reprodukční systémy a hybridizace
u *Cystopteris fragilis* agg.

Reproductive modes and hybridization within *Cystopteris fragilis* agg.

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 5. 2016

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Tomáši Urfusovi za jeho cenné rady týkající se nejen bakalářské práce, ale i probíhajících experimentů do budoucí diplomové práce. Liboru Ekrtovi děkuji za bohatou odbornou literaturu o kapradinách, bez níž by tato bakalářská práce byla o poznání chudší. Poděkování patří i Martinu Čertnerovi za pomoc s výběrem tématu bakalářské práce. Děkuji také své rodině za podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

Cystopteris fragilis agg. je taxonomicky velmi komplikovaná skupina izosporických kapradin. Z celého komplexu se na území Evropy udává výskyt 4 druhů (*C. fragilis*, *C. dickieana*, *C. alpina* a *C. diaphana*), které jsou si morfologicky velmi podobné a jejich rozlišení na jednotlivé druhy je stále do jisté míry nedořešené. Tato variabilita je dána zejména procesy polyploidizace a hybridizace, které se společně podílí na výsledné retikulární evoluci celého komplexu. Celou situaci komplikuje apomiktické rozmnožování pomocí apogamie, které je velmi běžným jevem u kapradin a v minulosti bylo zaznamenáno i u *C. fragilis*. Pro studium reprodukčních systémů se využívá kultivací gametofytů a sporofytů, které nám umožní sledovat celý životní cyklus. Představeny jsou i pilotní výsledky a metody, které budou použity v navazující diplomové práci.

Klíčová slova: *Cystopteris fragilis*, polyploidizace, hybridizace, reprodukční způsoby, apogamie, kultivační experimenty

Abstract

Cystopteris fragilis agg. is taxonomically very complicated group of homosporous ferns. There are 4 species of the aggregate in Europe (*C. fragilis*, *C. dickieana*, *C. alpina* and *C. diaphana*), which are morphologically similar and their taxonomic status is still unresolved. Polyploidization, hybridization and the resulting reticulate patterns of evolution together contribute to enormous variation within the complex. Apomictic reproduction through apogamy is a very common phenomenon among ferns and it was also recorded in *C. fragilis* in the past. Gametophyte and sporophyte culture is commonly used to the study of reproductive modes. Pilot results and methods of following diploma thesis are presented in separated chapter.

Key words: *Cystopteris fragilis*, polyploidy, hybridization, reproductive modes, apogamy, cultivation experiments

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Charakteristika rodu <i>Cystopteris</i> Bernh.....	2
2.1. Zařazení v systému	2
2.2. Morfologická charakteristika.....	2
2.3. Rozšíření a ekologie	3
3. Charakteristika komplexu <i>Cystopteris fragilis</i>	3
3.1. <i>Cystopteris fragilis</i> (L.) Bernh. – puchýřník křehký	4
3.2. <i>Cystopteris dickieana</i> R. Sim – puchýřník hladký	4
3.3. <i>Cystopteris alpina</i> (L.) Desvaux – puchýřník vápencový	5
3.4. <i>Cystopteris diaphana</i> (Bory) Blasdell – puchýřník prosvítavý	6
4. Mikroevoluční procesy vedoucí k variabilitě.....	6
4.1. Polyploidizace	6
4.1.1. Polyploidizace u <i>Cystopteris fragilis</i> agg.....	7
4.2. Hybridizace.....	8
4.2.1. Hybridizace u <i>Cystopteris fragilis</i> agg.....	9
5. Reprodukční způsoby u kapradin.....	11
5.1. Apogamie.....	12
5.2. Aposporie.....	15
5.3. Apogamie a aposporie u <i>Cystopteris fragilis</i>	15
6. Kultivační experimenty.....	16
6.1. Přípravy před kultivací	17
6.2. Výsev a vývoj gametofytů.....	18
6.3. Vznik sporofytu	19
7. Navazující diplomová práce.....	21
7.1. Metodika.....	21
7.1.1. Průtoková cytometrie	21
7.1.2. Mikroskopické zhodnocení abortovanosti výtrusů	22
7.2. Pilotní studie	23
7.2.1. Příprava vzorků	23
7.2.2. Výsledky.....	24
8. Závěr	26
9. Použitá literatura	27

1. Úvod

Předkládaná bakalářská práce se zabývá taxonomicky složitým a dosud ne zcela objasněným komplexem *Cystopteris fragilis*. Poslední (a jediná) monografie rodu *Cystopteris* byla napsána před 53 lety (Blasdell, 1963) a dodnes se pozornost na tento rod soustředila hlavně na území Severní Ameriky, kde byl celý komplex detailně studován (např. Haufler et al. 1985, Haufler and Windham 1991, Paler and Barrington 1995). Podobná podrobná studie však na území Evropy chybí.

V Evropě jsou rozlišovány čtyři druhy (mikrospecie): *Cystopteris fragilis* (L.) Bernh. (puchýřník křehký), *Cystopteris dickieana* R. Sim (puchýřník hladký), *Cystopteris alpina* (L.) Desvaux syn. *Cystopteris regia* (Lam.) Desvaux (puchýřník vápencový) a *Cystopteris diaphana* (Bory) Blasdell (puchýřník prosvítavý) (Dostál, 1984; Jermy, 1993). Taxonomické pojetí a nomenklatura je v práci sjednocené podle Flora Europaea (Jermy, 1993). Rozdíly mezi jednotlivými druhy a otázka jejich taxonomického určení bude diskutována v první části bakalářské práce.

Na území České republiky se vyskytují tři druhy – *C. fragilis*, v sudetských pohořích je možný výskyt druhu *C. dickieana* (Chrtek, 1988; Kubát, 2002), avšak jeho taxonomický status není dosud zcela plně objasněn (Dyer et al., 2000; Parks et al., 2000) a této problematice je věnována kapitola 3.2. Do třetice *C. sudetica* A. Braun et Milde (puchýřník sudetský), který však nepatří do komplexu *C. fragilis* (Rothfels et al., 2013). Na našem území byl naposledy spatřen roku 1939 (Chrtek, 1988; Kubát, 2002), v roce 2010 byl však znovuobjeven v Hrubém Jeseníku (Hadinec and Lustyk, 2012) a v Červeném seznamu cévnatých rostlin je dnes klasifikován jako kriticky ohrožený druh (C1 b) (Grulich, 2012).

Příčinu vysoké variability lze hledat na úrovni polyploidizace, hybridizace a reprodukčních systémů. Z Evropy jsou známy čtyři ploidní úrovně – tetraploidní, pentaploidní, hexaploidní a oktoploidní (Manton, 1950; Dostál, 1984). V Severní Americe se vyskytují i diploidní jedinci (Haufler et al., 1993). Již od 30. let 20. století je diskutován výskyt nepohlavního rozmnožování pomocí apogamie a aposporie (Lawton, 1936).

Cílem této bakalářské práce je charakterizovat druhový komplex *Cystopteris fragilis*, zejména pak s detailním zaměřením na druh *C. fragilis* s. str. a shrnout dosavadní informace, které jsou o dané problematice známy. Další nezbytnou součástí práce jsou mikroevoluční procesy vedoucí k variabilitě a charakteristika reprodukčních systémů u kapradin. Diskutována bude také možnost využití kultivačních experimentů ke studiu rozmnožování a nástin budoucí diplomové práce.

2. Charakteristika rodu *Cystopteris* Bernh.

2.1. Zařazení v systému

Cystopteris Bernh. (puchýřník) je rod izosporických kapradin, patřících dnes do čeledi Cystopteridaceae Schmakov (puchýřníkovité), která stojí sestersky k Eupolypodiales II. (Rothfels et al., 2012a). Kromě rodu *Cystopteris* jsou do této čeledi řazeny rody *Acystopteris* Nakai, *Gymnocarpium* Newman a *Cystoathyrium* Ching (Rothfels et al., 2012a; Rothfels et al., 2012b) a jsou podpořeny jako jednoznačně monofyletické (Rothfels et al., 2013). Již dlouhou dobu je známo, že rod *Acystopteris* je blízcě příbuzný rodu *Cystopteris*, jehož byl dříve součástí, a to v širokém slova smyslu (Blasdell, 1963). V minulosti byl puchýřník převážně řazen do čeledi Athyriaceae (Dostál, 1984; Prada, 1986) – syn. Woodsiaceae (paprátkovité) (Jermy, 1993; Jonsell, 2000; Kubát, 2002; Smith et al., 2006). Jako velký omyl se ukázalo zařazení do čeledi Dryopteridaceae (Smith, 1993), od kterého bylo brzy opuštěno (Hasebe et al., 1995).

2.2. Morfologická charakteristika

Jedná se o středně velké vytrvalé byliny s krátkými nebo dlouhými oddenky, které mohou být vystoupavé nebo plazivé. Listy vyrůstají z přízemní růžice nebo jednotlivě (Dostál, 1984; Chrtek, 1988). Řapíky listů jsou tenké, slámově žluté, načervenalé až tmavě hnědé (Prada, 1986). Báze je často zduřelá a přes zimu přetrvává, jako tzv. trophopod. Na průřezu můžeme vidět 2 kulaté nebo podlouhlé cévní svazky (Haufler et al., 1993).

Čepel je 1-3× zpeřená, v obrysu může být podlouhlá, kopinatá, vejčitá až trojúhelníková. Ve většině případů je lysá, vzácně se žláznatými trichomy na abaxiální straně (na adaxiální straně chybí). Mnohobuněčné trichomy nacházíme mezi řapíkem a jednotlivými lístky. Lístky jsou (1-)2-3× zpeřené, přisedlé nebo řapíkaté, jednotlivé části mohou být vroubkované, zubaté nebo pilovité. Nejnižší pár lístků je obvykle nejdelší. Žilky na listech jsou jednoduché nebo větvené. Odění chybí nebo se vyskytuje jen v jedné řadě (Dostál, 1984; Prada, 1986; Chrtek, 1988; Haufler et al., 1993; Kubát, 2002).

Výtrusnicové kupky jsou okrouhlé, uspořádané ve 2 řadách mezi střední žilkou a okrajem lístku, ostěra je vejčitá až kopinatá. Výtrusy jsou hnědě zbarvené, na povrchu ostnitě nebo bradavičnaté (Dostál, 1984; Chrtek, 1988; Jermy, 1993).

Prokel (prothallium, gametofyt) je srdčitý až ledvinitý útvar, který klíčí ze zralých výtrusů a má pouze krátkodobé trvání (Dostál, 1984; Jonsell, 2000).

2.3. Rozšíření a ekologie

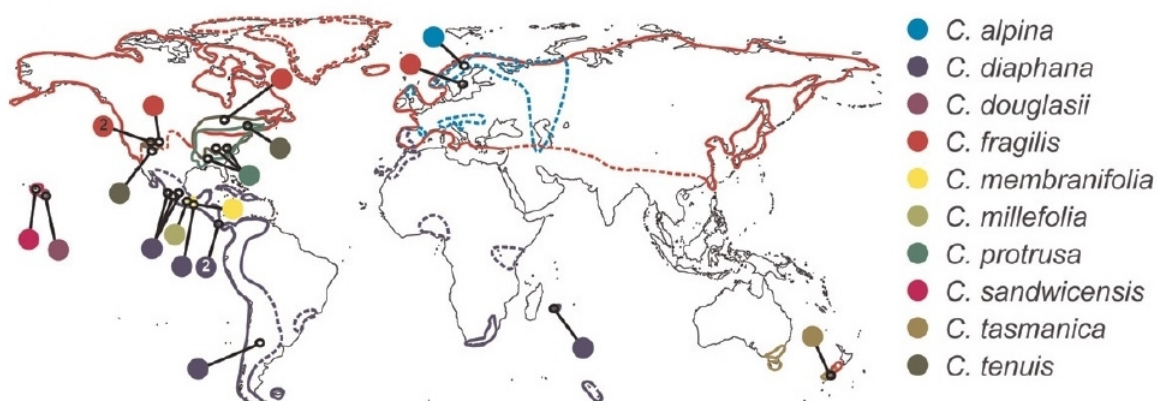
Rod *Cystopteris* zahrnuje cca 25 druhů, které jsou rozšířeny po celém světě převážně v temperátních oblastech (Haufler et al., 1993). V tropických oblastech je situován do vyšších nadmořských výšek, kde převažuje mírnější klima (Blasdell, 1963).

V České republice má těžiště rozšíření v mezofytiku, okrajově se vyskytuje i v oreofytiku a termofytiku. Vyskytuje se od nížinných oblastí až po vysoké hory (Chrtek, 1988).

Celý rod primárně osidluje skalní stěny, štěrbinu a suťové svahy. Sekundárně se pak vyskytuje v místech vytvořených lidskou činností, jako jsou staré kamenné zdi, ploty a mosty. Z hornin se jedná převážně o pískovce, břidlice, vápence, žulu a rulu. Roste tedy jak na kyselých, tak neutrálních i bazických substrátech. Některé druhy však preferují vlhké lesní půdy (např. *C. bulbifera* nebo *C. protrusa*) oproti skalnatým útvarům. Nejčastěji se nalézá na vlhkých a zastíněných místech, může však růst i na otevřených a slunných stanovištích (Blasdell, 1963; Dostál, 1984).

3. Charakteristika komplexu *Cystopteris fragilis*

Fylogeneze rodu *Cystopteris* je rozčleněna do 4 podpořených vývojových větví – *C. montana* (stojí odděleně od zbytku rodu), *C. sudetica*, *C. bulbifera* a taxonomicky složitý a polymorfní komplex *C. fragilis* (Rothfels et al., 2013), ze kterého byl vyčleněn *C. protrusa* a dnes stojí sestersky k celému agregátu (Rothfels et al., 2014). Komplex *C. fragilis* můžeme charakterizovat celosvětovým rozšířením a odlišnou ploidní úrovní. Vztahy uvnitř celého agregátu jsou komplikované, obsahující mnoho druhů a poddruhů (Rothfels et al., 2013) a některé významné druhy a jejich rozšíření je vyobrazeno na Obr. 1. Možná se jedná o „jeden z nejobtížněji uchopitelných problémů v biosystematice kapradin“ (Lovis, 1977 p. 356).



Obr. 1: Rozšíření některých zástupců komplexu *C. fragilis*. Na obrázku není uveden *C. dickieana*, neboť práce, ze které pochází tato mapa, ho neuznává jako samostatný druh (převzato z Rothfels et al., 2013).

U celého rodu se objevují tři aspekty, které ztěžují jednoznačnou morfologickou identifikaci jednotlivých druhů. Tím prvním je fenotypová plasticita listů na základě vnějšího prostředí. *C. fragilis* se vyskytuje i ve vysokých nadmořských výškách a toleruje různorodé podmínky, které se odráží na celkovém vzhledu rostliny (Gamperle and Schneller, 2002). Za druhé se může jednat o fenotypový projev polyploidizace. Cytotypy s vyšší ploidní úrovní ztrácejí charakteristické znaky na listech, které slouží k rozpoznávání jednotlivých druhů. Třetím aspektem je, že se jednotlivé druhy mohou vyskytovat sympatricky a vzájemně spolu hybridizovat za vzniku sterilních kříženců (Haufler and Windham, 1991).

Komplex na území Evropy zahrnuje 4 druhy, které budou představeny na následujících řádcích (Dostál, 1984; Jermy, 1993).

3.1. *Cystopteris fragilis* (L.) Bernh. – puchýrník křehký

Jedná se o rostliny s krátkým a vystoupavým oddenkem, který má v průměru šířku cca 5 mm (Jermy, 1993). Puchýrník dosahuje výšky od 10 do 50 cm (Dostál, 1984). Trichomy chybějí, pleviny jsou světle hnědé a kopinaté. Listy vyrůstají z přízemní růžice, řapík je kratší nebo stejně dlouhý jako čepel, pleviny vyrůstají na bázi řapíku (Haufler et al., 1993). Čepel je 1-2-3× zpeřená, kopinatá, vejčité kopinatá až oválná (Dostál, 1984; Prada, 1986; Haufler et al., 1993). Lístky jsou vstřícné, 1-2× zpeřené, okraje jsou pilovité až ostře zubaté. Žilky na lístcích směřují k okraji (Haufler et al., 1993). Ostěra je vejčitá až kopinatá, bez žláznatých trichomů, výtrusy jsou na povrchu ostnitě a dosahují velikosti 35-55-60 µm (Prada, 1986; Haufler et al., 1993). Výtrusnice se otevírají od června do srpna (Chrtek, 1988).

Jedná se o morfologicky proměnlivý druh, u kterého byla popisována řada variet, poddruhů a forem. Illustrierte Flora von Mitteleuropa (Dostál, 1984) udává 3 variety (var. *huteri*, var. *dentata* a var. *pinnatipartita*) a jednu formu (f. *anthriscifolia*), které se liší ve velikosti listů, zpeření a tvaru jednotlivých lístků. Některé významné části areálu však dosud nebyly taxonomicky zhodnoceny, např. na území Mexika se všechny druhy považují za *C. fragilis* s. l., kvůli absenci detailního studia. Rozdíly jsou zejména v morfologických znacích, velikosti výtrusů a jejich povrchu (ostnitý a bradavičnatý) (Mickel and Tejero-Díez, 2004).

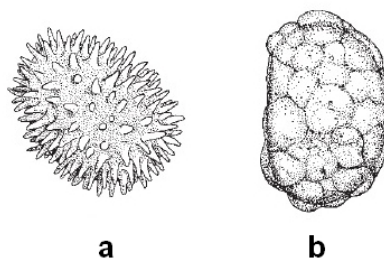
3.2. *Cystopteris dickieana* R. Sim – puchýrník hladký

Tento druh byl poprvé popsán v roce 1830 ze Skotska. Od komplexu *C. fragilis* se odlišuje pouze ve dvou znacích, a těmi jsou charakteristický způsob větvení listové čepele a povrch výtrusů (Parks et al., 2000).

Listová čepel je méně větvená, jednotlivé lístky jsou široké, tupě zaoblené a vzájemně se překrývající (Dyer et al., 2000). Avšak znaky na listu nejsou jednotné ani u druhu *C. fragilis*

a závisí na mikroklimatických podmínkách. Pokud je rostlina na slunném a suchém stanovišti, čepel listu je kompaktnější a tužší, ve vlhku a stínu je naopak širší a jemnější (Parks et al., 2000).

Výtrusy jsou bradavičnaté, zatímco u ostatních zástupců komplexu jsou ostnitě (Parks et al., 2000). Tímto morfologickým znakem se rozlišuje mezi *C. fragilis* a *C. dickieana* ve většině dostupných publikací (např. Prada 1986, Jermy 1993) a projevy tohoto charakteru lze porovnat na Obr. 2.



Obr. 2: Ostnitě výtrusy u *C. fragilis* (a) a bradavičnaté u *C. dickieana* (b) (převzato z Prada, 1986).

Při studiu allozymů na zástupcích ze Severní Ameriky, kde je rozdíl pouze v povrchové struktuře výtrusů, nedošlo k rozlišení mezi *C. fragilis* a *C. dickieana*. Byl dokonce nalezen jedinec, který měl jak ostnitě, tak bradavičnaté výtrusy (Haufler and Windham, 1991). V evropské studii allozymů, do které byla zahrnuta typová populace *C. dickieana*, se nenašla korelace mezi charakterem větvení listové čepule, morfologií výtrusů a multilokusovým fenotypem allozymů a tímto se nepotvrdilo zachování *C. dickieana* jako samostatného druhu (Parks et al., 2000).

Flora Nordica (Jonsell, 2000) neuznává *C. dickieana* jako samostatný druh. Místo toho rozlišuje u *C. fragilis* dvě formy - s ostnitými a bradavičnatými výtrusy. Dále uvádí, že jedinci vyskytující se v severní Evropě nemají morfologicky nic společného s typovou populací ve Skotsku, která má mnohem kompaktnější vzhled, členitější lístky a překrývající se segmenty. Na druhou stranu existují sterilní hybridy mezi *C. fragilis* a *C. dickieana* s abortovanými výtrusy a tato hybridizační bariéra by mohla svědčit o oprávněnosti užšího taxonomického pojetí (Vida, 1974).

V závěru shrnujícího článku o této problematice (Dyer et al., 2000) však zůstává otázka pozice *C. dickieana* nejasná a kontroverzní. Stále není jasné, jestli všichni zástupci s bradavičnatými výtrusy patří do stejného taxonu jako typový materiál a jaké je jeho zařazení v systému, zdali ho máme rozlišovat jako samostatný druh nebo podruh (či varietu) *C. fragilis*.

3.3. *Cystopteris alpina* (L.) Desvaux – puchýřník vápencový

Jedná se o dalšího evropského zástupce komplexu, který je v některých publikacích uváděn jako *C. fragilis* subsp. *alpina* (Schidlay, 1966; Prada, 1986) či *C. fragilis* subsp. *regia* (Hegi, 1935), avšak dnes je popisován jako *C. alpina* nebo *C. regia* (Tennant, 2010), popřípadě jsou u *C. regia* rozlišovány variety var. *regia* a var. *alpina* (Dostál, 1984).

Od *C. fragilis* se odlišuje jemněji členěnými listy, které jsou 3-4× zpeřené. Segmenty lístečků jsou lineárně podlouhlé, úzké, na konci tupé nebo uťaté. Většina žilek na koncových segmentech končí na bázi nebo v zářezu mezi jednotlivými zuby (na rozdíl od *C. fragilis*, kde žilky končí na okraji jednotlivých zubů) (Dostál, 1984). Bohužel se tento stejný znak vyskytuje i u *C. diaphana* a *C. dickieana* (Tennant, 2010). Výtrusy mají krátké a tupé ostny (Jermy and Harper, 1971).

Vyskytuje se převážně v horských oblastech Evropy a Malé Asie v nadmořské výšce od 1200 – 3000 m, převážně na vápencích ve vlhkých štěrbinách (Dostál, 1984; Jonsell, 2000).

3.4. *Cystopteris diaphana* (Bory) Blasdell – puchýřník prosvítavý

C. diaphana byl v minulosti zaměňován s *C. fragilis* nebo byl popisován jako jeho poddruh či varieta. V některých publikacích je popisován jako *C. viridula* (Desv.) Desv. (Prada, 1986). Kvůli mnoha přechodným formám je jeho taxonomické určení obtížné (Vida, 1974). Avšak jeho odlišnost je konečně podpořena i výrazně odlišnou velikostí genomu (Hanušová and Urfus, pers. comm.). Poprvé byl popsán z ostrova Réunion v Indickém oceánu (Dostál, 1984).

Listy vytrvávají přes zimu na rozdíl od ostatních druhů agregátu. Žilky na listech nekončí v apikální oblasti zubu na jednotlivých segmentech lístků, ale v mezerách mezi nimi (Murphy and Rumsey, 2005). Výtrusy jsou husté a krátce ostnité, liší se tak od *C. fragilis*, který je nemá tak hustě nasázené na sobě (Jermy and Harper, 1971).

Osidluje subtropické a tropické oblasti, v Evropě se vyskytuje v Makaronésii (Azory, Madeira, Kanárské ostrovy), na jihu Španělska a na Korsice (Dostál, 1984). V roce 2000 bylo nalezeno několik exemplářů ve Velké Británii, ale stále není potvrzené, zdali se jedná o původní populaci nebo o únik z pěstované kultury (Murphy and Rumsey, 2005). Preferuje středně bazické horniny (Jermy, 1993).

4. Mikroevoluční procesy vedoucí k variabilitě

Na obtížné taxonomické uchopitelnosti *C. fragilis* agg. se podílejí dva významné procesy. Jedná se o polyploidizaci (a s ní spojenou allopolyploidní speciaci), která spolu s hybridizací vede až k retikulární evoluci celého komplexu. U kapradin ji mimo *C. fragilis* agg. nalezneme například u komplexu *Polypodium vulgare* (Haufler and Windham, 1991) nebo *Adiantum pedatum* (Paris and Windham, 1988).

4.1. Polyploidizace

Polyploidie je jev, který je široce rozšířen mezi rostlinami. Odehrává se díky znásobení genové sádky (neproběhnuté buněčné dělení po mitóze, vznikají tzv. autopolyploidi) nebo splynutím

neredukovaných gamet dvou druhů (absence buněčného dělení po meiotickém dělení, vznikají tzv. allopolyploidii). Tyto neredukované gamety vznikají u kapradin z neredukovaných výtrusů (Gastony, 1986). Polyploidizace hraje důležitou roli v evoluci cévnatých rostlin, umožnila v minulosti jejich diverzifikaci a velkou měrou se podílí na jejich speciaci, která se u kapradin pohybuje okolo 7 % speciálních událostí způsobených polyploidizací (Otto and Whitton, 2000).

Předpokládá se, že alespoň jednou polyploidizací prošly všechny krytosemenné rostliny s výjimkou druhu *Amborella trichopoda* (Cui et al., 2006), u kapradin se domníváme, že existuje více než 95 % polyploidních druhů (Soltis and Soltis, 1999). Kapradiny drží ještě jedno prvenství, a to je rostlina s největším počtem chromozomů. Jedná se o *Ophioglossum reticulatum*, která má 1440 chromozomů ($2n = 1440$) (Khandelwal, 1990).

Kapradiny a plavuně mají oproti krytosemenným rostlinám větší velikost jaderného genomu. V průměru obsahuje jádro kapradin 10 616 Mb¹, zatímco u krytosemenných rostlin je to v průměru pouze 6 383 Mb (Ranker and Haufler, 2008).

4.1.1. Polyploidizace u *Cystopteris fragilis* agg.

U celého komplexu nacházíme na území Evropy ploidní úrovně od tetraploidních až po oktoploidní zástupce (Dostál, 1984). Přítomnost tak vysoké ploidní úrovně spolu s kosmopolitním rozšířením nám může indikovat, že se jedná o velmi starý komplex (Vida, 1974). Na území Severní Ameriky se vyskytují diploidní druhy (např. *C. protrusa*, $2n = 84$), které se v Evropě nenachází (Haufler et al., 1993). Tato polyploidní série je vystavená na základním chromozomovém čísle $x = 42$ (Vida, 1974) a její přehled je v Tab. 1.

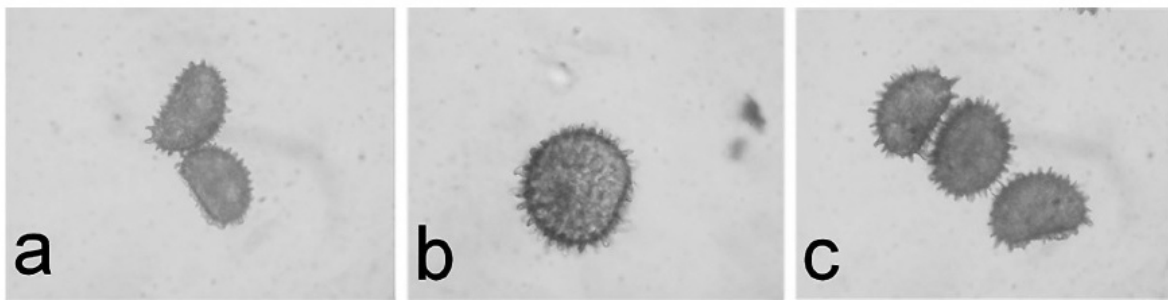
Jak je z Tab. 1. vidět, rod *Cystopteris* má velký počet chromozomů, které jsou v literatuře popisovány jako malé, zakroucené a těžko spočítatelné (Manton, 1950).

Tab. 1: Přehled počtu chromozomů a ploidie u evropských zástupců *C. fragilis* agg. * jsou označeny ploidie vyskytující se pouze mimo Evropu (převzato a upraveno podle Vida, 1974; doplněno Dostál, 1984; Kawakami et al., 2010).

Druh	2x	4x	5x	6x	8x
<i>C. fragilis</i>	–	$2n = 168$	$2n = 210$	$2n = 252$	$2n = 336$
<i>C. dickieana</i>	–	$2n = 168$	–	$2n = 252$	–
<i>C. regia</i>	–	–	–	$2n = 252$	–
<i>C. diaphana</i>	$2n = 84^*$	$2n = 168^*$	–	$2n = 252$	–

¹ Mb – mega pár bází (z ang. *mega pair base*).

Dříve se předpokládalo, že velikost výtrusů souvisí s danou ploidní úrovní a z porovnání velikosti se dá usuzovat o jakou ploidii se jedná. Při studiu *C. fragilis* na ostrově Vancouver ($2n = 168$) se zjistilo, že má mnohem menší výtrusy než *C. alpina* ze Švýcarska ($2n = 252$) (Manton, 1950). V monografii celého rodu se předpokládá, že ploidie lze určit z velikosti výtrusů (Blasdell, 1963), čehož využívají v oblasti Mexika k určení ploidní úrovně (Mickel and Tejero-Díez, 2004). Jenže již od 70. let se ví, že velikost výtrusů ve většině případů nevede k jednoznačné determinaci jednotlivých cytotypů (Vida, 1974), což se ukazuje i v nedávno publikovaných pracích (Kawakami et al., 2010), kdy se potvrdilo, že hexaploidní cytotyp *C. fragilis* má větší výtrusy než tetraploid, ale zjistilo se, že pentaploidi mají mnohem větší výtrusy než tetraploidi a hexaploidi, jak je ukázáno na Obr. 3. Pentaploidi tak pravděpodobně produkují neredukované výtrusy, které mohou souviset s rozmnožováním pomocí apogamie. Stejně tak tetraploidní cytotyp má velkou variabilitu ve velikosti výtrusů, zvláště když roste na dvou odlišných habitatech (Bhella and Razdan, 2012).



Obr. 3: Výtrusy u *C. fragilis*, a) tetraploid, b) pentaploid, c) hexaploid, měřítko = 50 μm (převzato a upraveno dle Kawakami et al., 2010).

C. fragilis diverzifikuje na tetraploidní úrovni pravděpodobně díky tzv. genovému silencingu („genové umlčení“) (Haufler and Windham, 1991). Allozymové studie odhalily u izosporických kapradin expresi genů na diploidní úrovni (Haufler and Soltis, 1986). To se děje pravděpodobně opakovanými cykly polyploidizace a následným umlčením znásobené chromozomové sádky (Ranker and Haufler, 2008).

4.2. Hybridizace

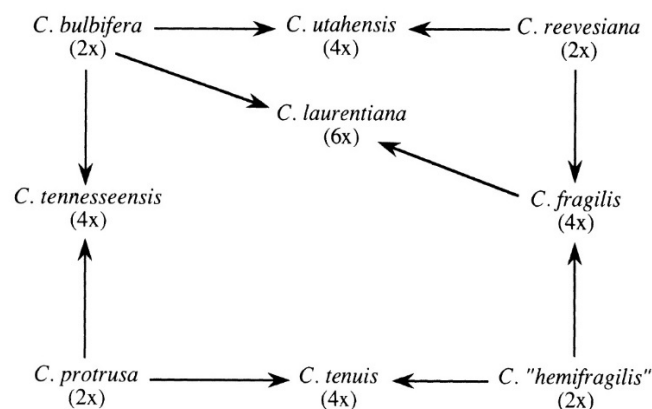
Hybridizace a přítomnost hybridů je velmi běžná u kapradin. Chybí jim totiž specifická bariéra, která by bránila ve splnutí spermatozoidů a vaječné buňky dvou různých druhů. Pokud se tedy na jedné lokalitě vyskytují dva různé druhy, dá se očekávat mezidruhová hybridizace (Ranker and Haufler, 2008).

Hybridní druhy kapradin můžeme rozdělit do tří kategorií. První kategorie zahrnuje sterilní hybridy, kteří produkují abortované výtrusy. Nadměrný výskyt znaků jako jsou nepravidelný tvar a velikost výtrusů a špatně vyvinutá, neotevřená sporangia mohou být důkazem přítomnosti hybridů první kategorie, ale nemusí to být tak jednoznačné. Až 10-20 % abortovaných výtrusů se může vyskytovat u nehybridních druhů (Wagner et al., 1986). Na druhou stranu, u triploidního *C. protrusa* se objevují převážně normální výtrusy, a tak nelze tohoto hybridu identifikovat jen na základě abortovaných výtrusů (Haufler et al., 1985). Druhým typem jsou fertilitní hybridy, kteří produkují normální životaschopné výtrusy. Tito jedinci vznikají nejčastěji allopolyploidizací. Posledním typem jsou apogamní hybridy, kteří vytvářejí neredukované výtrusy (Wagner et al., 1986) a ty budou diskutovány v části týkající se reprodukčních systémů kapradin.

4.2.1. Hybridizace u *Cystopteris fragilis* agg.

Polyplodizace se spolu s hybridizací podílí na výsledné retikulární evoluci celého komplexu. Tento problém byl studován hlavně na území Severní Ameriky, kde se vyskytují i diploidní zástupci. Dalším problémem je velmi častá hybridizace mezi jednotlivými druhy, což opět znesnadňuje jejich identifikaci.

Jak vypadají vzájemné vztahy je vidět na Obr. 4. Tetraploidní *C. fragilis* pravděpodobně vznikl hybridizací mezi diploidním *C. reevesiana* a neznámým diploidním *C. „hemifragilis“*, který nebyl do současné doby nalezen a zřejmě je vyhynulý (Haufler and Windham, 1991). Jak je z obrázku patrné, tento neznámý diploid dal vzniknout ještě tetraploidnímu *C. tenuis*, který se dlouho dobu považoval pouze za varietu *C. fragilis* (Paler and Barrington, 1995).



Obr. 4: Schématické znázornění vztahu mezi jednotlivými druhy *C. fragilis* agg. na území Severní Ameriky (převzato z Haufler and Windham, 1991).

U hexaploidního cytotypu *C. laurentiana* se předpokládá allopolyploidní původ z tetraploidního *C. fragilis* a diploidního *C. bulbifera* (Haufler and Windham, 1991). Situace u hexaploidního *C. fragilis*, je do jisté míry stále nevyřešenou otázkou. Pokud by se např. předpokládal allopolyploidní původ splynutím redukované a neredukované gamety tetraploida, pak by se při cytologickém zkoumání musely kromě bivalentů, najít i univalenty. Ty však nebyly v jedné z prací pozorovány (Kawakami et al., 2010). Dřívější studie zabývající se počtem chromozomů poukazuje na to, že přítomnost 84 bivalentů a 42 univalentů u hexaploidního cytotypu nám pouze indikuje to, že jeden z předků byl tetraploid (Vida, 1974). Další možností je vznik hybridizací mezi diploidem a tetraploidem za vzniku triploida, který zdvojením chromozomové sádky dá vzniknout hexaploidu (Kawakami et al., 2010). Jeho původ by tak mohl být autoallopolyploidní (Vida, 1974).

Pentaploid zřejmě vzniká hybridizací mezi tetraploidem a hexaploidem. Jelikož všechny tyto tři cytotypy mohou růst společně a byly pozorovány univalentní chromozomy, zdá se tato hypotéza jako velmi pravděpodobná (Kawakami et al., 2010).

Jak je to s oktoploidním cytotypem stále není jasné a tato problematika čeká na objasnění (Vida and Mohay, 1980).

Jak již bylo diskutováno výše, je známý kříženec mezi tetraploidními druhy *C. fragilis* a *C. dickieana*, který má abortované výtrusy a je sterilní (Vida, 1974; Breckle, 1987). Další velmi častý hybridní druh vzniká mezi tetraploidním *C. fragilis* a hexaploidním *C. alpina*. Je pentaploidní ($2n = 210$) a jeho morfologický vzhled je intermediární mezi rodiči (Vida, 1974; Dostál, 1984).

V Severní Americe byl popisován *C. fragilis* var. *mackayi*, u kterého se předpokládalo, že je hybridem mezi *C. fragilis* a *C. diaphana*. Tato hypotéza se však nepotvrdila a na základě morfologických a cytologických znaků byl zařazen do samostatného druhu *C. tenuis* (Moran, 1983).

Na Obr. 4 je ještě jedna pozoruhodná hybridizační událost, která se týká diploidních druhů *C. protrusa* a *C. bulbifera*. Jejich vztah byl naznačen už v 50. letech 20. století (McGregor, 1950), ale až později se potvrdilo, že dávají vzniknout allotetraploidnímu *C. tennesseensis* (Haufler et al., 1990). Zjistilo se, že se na tomto procesu velkou měrou podílí rostlinný fytohormon antheridiogen, který iniciuje tvorbu gametangií u izosporických kapradin. Je tvořen a vylučován plně vyvinutým gametofytem (u kterého převažují samičí gametangia) a zajišťuje u sousedních gametofytů tvorbu antheridií (samčích gametangií). Pokud se tedy oba dva diploidní druhy vyskytují sympatricky (spolu na jednom místě), pak je umožněna hybridizace.

zace mezi těmito druhy na základě ustanovení pohlaví gametofytů pomocí odpovědi na fytohormony. *C. bulbifera* neodpovídá na hormonální podnět, tvoří archeogonia, zatímco *C. protrusa* na něj odpovídá a tvoří převážně antheridia na gametofytu. Tato situace umožní splnutí spermatozoidu od *C. protrusa* s vaječnou buňkou *C. bulbifera* a vzniku nového allotetraploidního druhu. Hormonální regulace tak může hrát významnou roli v usnadnění hybridizace mezi jednotlivými druhy izosporických kapradin (Haufler and Ranker, 1985).

5. Reprodukční způsoby u kapradin

Životní cyklus kapradin zahrnuje dvě střídající se fáze – gametofytickou (pohlavní) a sporofytickou (nepohlavní) generaci, každá z nich je volně žijící a umožňuje kapradinám využívat rozdílné niky v prostředí. Na rozdíl od semenných rostlin, kapradiny využívají lehké šířitelné výtrusy, aby se dostaly dále od mateřské rostliny a mohly tak kolonizovat nové a neosídlené habitaty (Vogel et al., 1999). Výtrusy vznikají meiotickým dělením ve výtrusnici a tradičně dělíme kapradiny podle typu výtrusů na izosporické a heterosporické. Izosporické kapradiny produkují jeden typ výtrusu a dávají vzniknout oboupohlavnému gametofytu. Tyto kapradiny jednoznačně převládají (cca 36 čeledí) nad heterosporickými kapradinami (cca 4 čeledi), které produkují dva typy výtrusů a dávají vzniknout jednopohlavným gametofytům (Ranker and Haufler, 2008; Mehlreter et al., 2010).

Ve většině případů převládá pohlavní rozmnožování, kdy se na proklu tvoří samčí pohlavní orgány (antheridia, mitózou produkující spermatozoidy) a samičí pohlavní orgány (archegonia, mitózou produkující vaječnou buňky) a po oplození vzniká opět sporofytická generace (Asker and Jerling, 1992; Ranker and Haufler, 2008).

Pohlavní rozmnožování u izosporických kapradin můžeme rozdělit do tří kategorií. První je samooplození („intragametophytic selfing“) při kterém splývá vaječná buňka se spermatozoidem z oboupohlavného gametofytu. V první generaci tak vzniká homozygotní zygota a následně i sporofyt. Druhým typem je de facto také samooplození, ale při kterém splývá vaječná buňka se spermatozoidem z různých gametofytů, ale tyto pocházejí ze stejného sporofytu (tzv. intergametophytic selfing). Heterozygotnost je tu nižší než u rodičovských jedinců. Jedná se o analogii samooplození u krytosemenných rostlin. Třetím typem je „cizooplození“ („intergametophytic crossing“) při kterém splývají gamety ze dvou odlišných rostlin. Někdy se ještě rozlišuje tzv. „intergametophytic mating“, při kterém splývají gamety z různých gametofytů, ale není znám jejich původ (neví se, jestli pochází od jednoho či dvou různých jedinců nebo od dvou odlišných druhů) (Klekowski, 1973; Lloyd, 1974; Ranker and Haufler, 2008).

Analýzy vývoje gametofytů ukázaly, že ačkoliv je většina izosporických kapradin schopná produkovat oboupohlavné gametofyty, tak jsou přítomny mechanismy, jako je asynchronní dozrání gametangií a hormonální kontrola pomocí antheridiogenů, které zajišťují u mnoha druhů gametofyty funkčně jedнопohlavné (Lloyd, 1974).

U cca 10 % kapradin se však tak neděje a rozmnožují se nepohlavní cestou pomocí apomixie, resp. apogamie a aposporie (Ranker and Haufler, 2008). Novější odhady ukazují, že přinejmenším 3 % kapradin se rozmnožuje pomocí apogamie. To je mnohem vyšší počet, než jaký se udává u krytosemenných rostlin. Dále se předpokládá, že apogamie vznikla u kapradin několikrát nezávisle na sobě a u odvozených čeledí se vyskytuje s vysokou frekvencí – u Dryopteridaceae a Pteridaceae je až 70 % takto se rozmnožujících druhů. Naopak je vzácná např. u čeledi Polypodiaceae (Liu et al., 2012).

Terminologie používaná u nepohlavního rozmnožování kapradin je velmi nejednotná, a tak se někdy uvádějí ještě termíny apomixie a agamosporie. Druhý termín zahrnuje dva procesy – nepřítomnost meiotického dělení při sporogenezi (produkce neredukovaných výtrusů, někdy také nazývané diplosporie a neredukované výtrusy jako diplospory) a následný vývoj sporofytu z gametofytu bez splynutí gamet (nazývají to apogamií nebo apomixií) (Gastony and Windham, 1989). Ve většině novějších publikací (Asker and Jerling, 1992; Ranker and Haufler, 2008) se používá členění na apogamii (která v tomto případě zahrnuje i agamosporii) a aposporii, které jsem použil i v následujících kapitolách.

5.1. Apogamie

Jedním z nejčastějších typů nepohlavního rozmnožování u kapradin je apogamie, kdy nový sporofyt nevzniká splynutím dvou gamet, ale z pletiva gametofytu, nejčastěji v blízkosti apikálního meristému (Asker and Jerling, 1992). Apogamické kapradiny ve většině případů vytvářejí antheridia, archegonia chybí, ale existují druhy, které produkují nefunkční archegonia. Přítomnost funkčních antheridií může zajišťovat rozmnožování mezi apogamickými a normálně pohlavně se množícími druhy (Asker and Jerling, 1992; Schneller and Krattinger, 2010), jak se děje např. u triploidního *C. protrusa* (Haufler et al., 1985). Apogamické kapradiny jsou převážně triploidní a pentaploidní (Park and Kato, 2003), ale najdou se i výjimky, např. rod *Pteris*, u kterého se nepohlavně rozmnožují diploidní druhy (Huang et al., 2011). Předpokládá se, že diploidi a triploidi mohou produkovat až 90 % fertálních neredukovaných výtrusů, zatímco tetraploidi a pentaploidi okolo 20-40 % (Schneller and Krattinger, 2010). Apogamie se dělí na fakultativní (indukovanou) a obligátní (Raghavan, 1989; Ranker and Haufler, 2008).

Fakultativní apogamie se vyskytuje u pohlavně se množících rostlin, které se dostaly do nějaké stresující situace (nedostatek vody, vysoká expozice slunečnímu záření, nedostatek živin v půdě) (Ranker and Haufler, 2008), často se tak může vyskytovat při nesprávné manipulaci s rostlinami v umělých podmínkách (Raghavan, 1989). Tyto rostliny pak produkují neživotaschopné výtrusy (Manton, 1950). V přírodě byla zaznamenána fakultativní apogamie u druhu *Asplenium hallbergii* (Dyer et al., 2012).

Obligátní apogamie je pak u kapradin mnohem běžnější, na rozdíl od krytosemenných rostlin, kde je mnohem častější tzv. fakultativní apomixie (Asker and Jerling, 1992). Ve výtrusnici neprobíhá meióza a rostlina vytváří neredukované výtrusy, které mají stejnou ploidii jako mateřský sporofyt. Z těchto neredukovaných výtrusů vzniká gametofyt, který pak dává vzniknout sporofytu bez předchozího splynutí vaječné buňky se spermatozoidy (Ranker and Haufler, 2008).

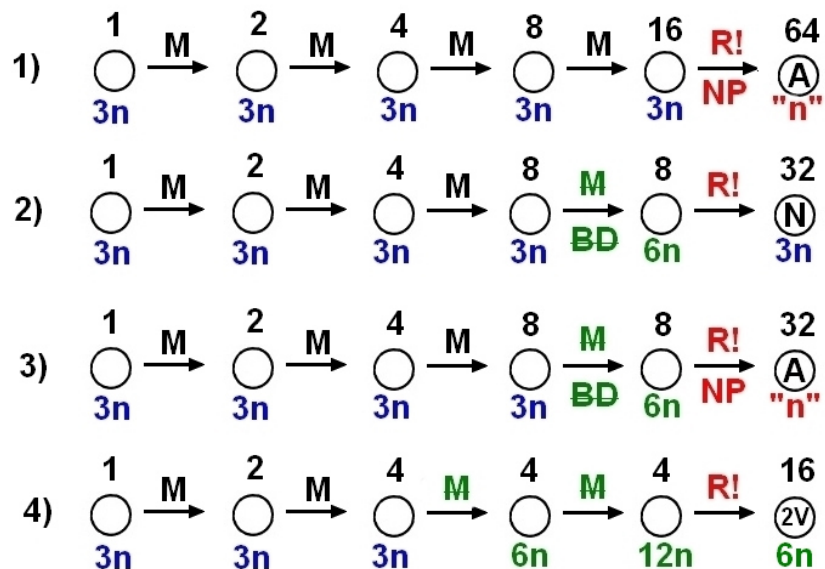
U obligátní apogamie máme dva různé typy sporogeneze, které umožňují dokončení životního cyklu apogamních kapradin – tzv. „Döpp-Manton“ a „Braithwaite“ schéma (Manton, 1950; Braithwaite, 1964).

„Döpp-Manton sporogeneze zahrnuje dva (Gastony and Windham, 1989) až čtyři (Klekowski, 1973; Raghavan, 1989) procesy vedoucí ke vzniku výtrusů. Na jedné rostlině bychom tak teoreticky mohli najít čtyři různé výtrusnice s výtrusy vzniklými čtyřmi různými procesy (Raghavan, 1989).

U prvních tří typů se začíná s archesporiální buňkou, která projde třemi následnými mitotickými děleními a vzniká 8 buněk. První proces (na Obr. 5 pod číslem 1) probíhá tak, že se 8 buněk počtvrté mitoticky rozdělí a vzniká tak 16 mateřských buněk spor, které mají stejnou ploidii jako sporofyt (je to podobné, jako u pohlavního rozmnožování) (Raghavan, 1989). V průběhu meiózy však nedochází ke správnému párování chromozomů jako u pohlavního rozmnožování, vznikají tak buňky, které nemají správný počet chromozomů a jsou abortované. Výsledkem je 64 výtrusů na jedno sporangium (stejně jako u pohlavního rozmnožování, jen s tím rozdílem, že většina je abortovaná a chromozomy jsou rozděleny nerovnoměrně). U druhé možnosti (na Obr. 5 pod číslem 2) začíná probíhat čtvrté mitotické dělení normálně, chromozomy se seřadí v ekvatoriální rovině, ale nedojde k jadernému, ani buněčnému dělení. Vzniká 8 buněk, které mají zdvojnásobený počet chromozomů. Při meiotickém dělení spolu párují sesterské chromozomy a výsledkem je 32 životaschopných výtrusů o stejné ploidii jako sporofyt (Gastony and Windham, 1989; Huang et al., 2011). U třetího typu (na Obr. 5 pod číslem 3) dochází k nedokonalému znovu ustanovení jádra v jedné nebo více z 8 mateřských buněk spor. Meiotické dělení je nepravidelné a ve výsledku vede k 32 abortovaným výtrusům. Poslední

možnost (na Obr. 5 pod číslem 4) nemá stejný začátek jako předchozí tři typy sporogeneze. Dvěma následnými mitotickými děleními, která jsou následována dvěma mitotickými děleními končícími v anafázi, dochází ke znovu ustanovení jádra a vzniku 4 velkých, autotetraploidních a homozygotních buněk (Klekowski, 1973). Ty se následně dělí meiózou a vzniká 16 výtrusů, které mají dvojnásobný počet chromozomů oproti sporofytu (Raghavan, 1989).

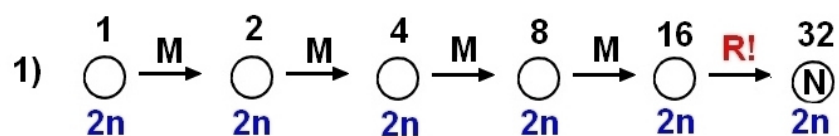
Döpp-Manton



Obr. 5: Sporogeneze typu Döpp-Manton. Horní čísla udávají počet buněk, dolní pak ploidní úroveň. „n“ – nerovnoměrně rozdělené chromozomy, 3n – triploid, 6n – hexaploid, 12n – dodekaploid, M – mitóza, přeškrtnuté M – nepravidelná mitóza, přeškrtnuté BD – absence jaderného a buněčného dělení, R! – meióza, NP – nepravidelná párování v meióze, A – abortované výtrusy, N – neredukované výtrusy, 2V – výtrusy s dvojnásobným počtem chromozomů (vytvořeno podle Gastony and Windham, 1989; Raghavan, 1989).

„Braithwaite“ sporogeneze (Obr. 6) začíná stejně jako u „Döpp-Manton“, tedy čtyřmi mitotickými děleními a vznikem 16 mateřských buněk spor. Avšak při meiotickém dělení se bivalenty chromozomů rozpadnou na osamocené univalenty. Dochází k znovu ustanovení jádra a vzniku 32 životaschopných neredukovaných výtrusů uspořádaných v dyádách. Poprvé byl tento typ pozorován u *Asplenium aethiopicum* (Braithwaite, 1964).

Braithwaite



Obr. 6: Sporogeneze typu Braithwaite. Horní čísla udávají počet buněk, dolní čísla pak ploidní úroveň (zde $2n$ – diploid, jako modelový příklad). M – mitóza, R! – meióza, N – neredukovaný výtrus, u tohoto typu v dyádách, více viz popis (vytvořeno podle Braithwaite, 1964).

Počet výtrusů na jednu výtrusnici může být určitým vodítkem, zdali se kapradina rozmnožuje pohlavně nebo pomocí apogamie. Ve většině případů tedy vede pohlavní rozmnožování k 64 redukovaným výtrusům v 16 tetrádách, na rozdíl od rozmnožování pomocí apogamie, kdy nejčastěji vzniká 32 neredukovaných výtrusů v 8 tetrádách nebo 32 neredukovaných výtrusů v 16 dyádách (Raghavan, 1989). Tento počet nemusí přesně odpovídat počtu 32, ale může jich být více i méně. Na konci dělení se můžou místo dyád vytvářet triády a tetrády (Braithwaite, 1964). Tato hypotéza musí být potvrzena experimentálně pomocí kultivačních experimentů, počítání chromozomů (Park and Kato, 2003) nebo průtokové cytometrie (Ekrt and Koutecký, 2015). Dalšími znaky mohou být velikost výtrusů, vývoj gametangií, vznik a morfologie sporofytické generace (Huang et al., 2011).

5.2. Aposporie

Aposporie je druhý typ nepohlavního rozmnožování, kdy gametofyt vzniká přímo ze sporofytického pletiva (např. z listů nebo sporangia). Neprobíhá tak meióza a netvoří se výtrusy (Ranker and Haufler, 2008). Prokel vzniklý pomocí aposporie vypadá úplně stejně jako z pohlavního rozmnožování, až na to, že ploidie je stejná jako u sporofytu (Raghavan, 1989). Můžou se na něm vyvíjet pohlavní orgány a docházet k pohlavnímu rozmnožování. Tímto krokem se však generují polyploidní série lišící se ploidní úrovní (Asker and Jerling, 1992).

Předpokládá se, že aposporie je v přírodě velmi vzácná (tzv. obligátní aposporie) a odehrává se jen u mála kapradin. Lze ji však snadno indukovat v umělých podmínkách při kultivaci rostlin (tzv. indukovaná aposporie) (Raghavan, 1989).

5.3. Apogamie a aposporie u *Cystopteris fragilis*

U *C. fragilis* byl již ve 30. letech 20. století naznačen výskyt apogamie a aposporie. Vědělo se, že se sporofyt vyvíjel přímo z pletiva gametofytu nebo z přeměněných pohlavních orgánů. Dalšími pokusy se dále přišlo na možnost rozmnožování pomocí aposporie, kdy nové rostliny vzni-

kaly přímo z listů. Všechny tyto výsledky se získávaly pomocí kultivačních experimentů gametofytické generace a jejich pozorováním pod mikroskopem, popřípadě jednoduchými cytologickými metodami (Lawton, 1936).

Další zmínka o apogamii pochází ze 70. let 20. století. Do květináčů byly vysety výtrusy tetraploidního *C. fragilis* a byly zalévány pouze ze spodu, aby nedošlo k případnému pohlavnímu rozmnožování. Ve dvou kulturách se objevily apogamní rostliny, které byly hustě pokryté plevinami a měly více zpeřené lístky. Část se nedožila reprodukčního věku (nevytvořily se kořeny), část přežila a produkovala výtrusy. Pravděpodobně se jednalo o fakultativní apogamii (Vida, 1974).

U triploidního *C. protrusa* ze Severní Ameriky byla pozorována sporogeneze typu „Braithwaite“. Produkoval tak neredukované výtrusy v dyádách, které se vyznačovaly přítomností velkého jádra. První meiotické dělení začalo normálně, ale nebylo dokončeno. Došlo k znovu ustanovení jádra, které tak obsahovalo všechny chromozomy. Tento jev byl však pozorován pouze zřídka. Výtrusnice nebyly abortované, ani jinak deformované, ale produkovaly velké množství morfologicky odlišných výtrusů (Haufler et al., 1985).

U pentaploidního cytotypu *C. fragilis* byly pozorovány výtrusy, které byly větší než u tetraploidů a hexaploidů. Jak již bylo psáno v kapitole o polyploidizaci, může se pravděpodobně jednat o neredukované výtrusy (Kawakami et al., 2010).

6. Kultivační experimenty

Pokud se chceme věnovat rozmnožování kapradin, je potřeba se zaměřit na tu fázi, která vytváří pohlavní orgány, tedy na gametofytickou generaci. Tu můžeme studovat buď ve volné přírodě, nebo ještě lépe v umělých podmínkách v laboratoři. V přírodě je ale velmi často těžké najít a správně identifikovat gametofyty a většina studií je tak odkázána na studium v laboratoři (Ranker and Haufler, 2008). Předpokládá se, že studium v laboratoři, vede k podobným výsledkům, k jakým by se došlo pozorováním v přírodě. Na druhou stranu, v případě detailního pozorování pohlaví gametofytů se ukazuje, že v umělých podmínkách se tvoří více samčích než samičích gametofytů (Ranker and Houston, 2002).

Metody kultivace rostlin jsou hojně využívány ve studiu fyziologických procesů, záchraně ohrožených druhů a v zahradnictví k množení okrasných rostlin. Můžeme využívat totipotenci schopnosti rostlinných buněk a nové rostliny získávat z vegetativních orgánů nebo nechat proběhnout přirozený životní cyklus od výtrusů až ke zralému sporofytu a studovat tak probíhající životní procesy (Fernández et al., 2011).

6.1. Přípravy před kultivací

Vše začíná u mateřské rostliny na námi zvolené studované lokalitě, kde chceme sbírat zralé trofosporofyly (případně sporofyly, pokud jsou oddělené sterilní a fertlní listy). Důležité je přitom vědět, kdy má námi studovaný druh zralé výtrusnice a začíná uvolňovat výtrusy do okolí. U *C. fragilis* dochází ke zrání od června do srpna (Chrtek, 1988), záleží však také na vnějších podmínkách a nadmořské výšce (Gamperle and Schneller, 2002). Nezralé výtrusnice jsou většinou bělavě zelené a v takovémto stavu se nesbírají. Stejně tak se zachází i s plně vyvinutými výtrusnicemi, které začaly uvolňovat výtrusy do okolí. Ty mají většinou tmavě hnědou až černou barvu. Zralé výtrusnice, které jsou vhodné ke sběru, mají u většiny druhů světle hnědou barvu (existují však i zelené nebo žluté výtrusnice) a při bližším ohledání lupou nevykazují známky žádného poškození stěn (nedošlo zatím k jejich otevření) (Hoshizaki and Moran, 2001).

Listy s vyvinutými výtrusnicemi se ukládají do papírových sáčků a obálek. Při pokojové teplotě se nechají listy vysychat 1-2 dny a poté jsou výtrusy připraveny k výsevu na substrát (Fernández et al., 2011). Využít se dají i herbářové položky, zde si však musíme dát pozor, zdali námi studovaný druh má výtrusy klíčící i po dlouhé době. Mezi druhy, u kterých mají výtrusy krátkou životnost, patří např. *C. protrusa* a *Woodsia obtusa* (Windham and Haufler, 1986). Pro dlouhodobější skladování jsou vhodné teploty okolo 4 °C (Somer et al., 2010). Obecně se doporučuje skladování výtrusů v suchých, tmavých a chladných podmínkách (Camloh, 1999).

Výhodou je pěstování studovaných rostlin ve skleníku, kde se může zabránit kontaminaci ostatními kapradinami (Park and Kato, 2003). K tomu nám může také pomoci obalení jednoho fertlního listu z rostliny polyamidovou sítovinou o rozměru ok 25 µm, která nepropustí výtrusy ostatních kapradin (Ekrt and Koutecký, 2015).

V případě využití *in vitro* kultur je nutné si připravit živné médium, na které budeme vysévat. U kapradin se nejčastěji využívá Murashige-Skoog (MS) a Knopovo médium. Většina obsahuje málo živin, neboť výtrusy, stejně jako semena, si sebou nesou zásobní látky nutné pro klíčení (Fernández et al., 2011). Pokud tedy chceme získat sporofytickou generaci, je nutné přesadit gametofyty na nové kultivační médium nebo do substrátu (Hickok et al., 1995).

Výtrusy je nutné na povrchu sterilizovat, aby nedošlo ke kontaminaci cizorodými organismy. Nejprve se nechají máčet v destilované vodě 2 hodiny, a poté se sterilizují 0,5% chlornanem sodným po dobu 3-10 minut. Mezi další použitelné látky patří chlornan vápenatý, pe-

roxid vodíku, ethanol nebo antibiotikum streptomycin. Po aplikaci následuje promytí destilovanou vodou (Fernández et al., 1999, 2011). Někdy se výtrusy neošetřují a pak se přidává látka zabraňující růstu patogenních hub (např. Nystatin) přímo do minerálního agaru (Pangua et al., 2003). Problémem povrchového ošetření může být fakt, že některé výtrusy jím mohou být poškozeny. Může dojít ke zpoždění klíčení až k jeho úplnému zastavení. Pokud se porovná kultura sterilizovaných a nesterilizovaných výtrusů, pak ta bez povrchového ošetření měla větší procento klíčivosti. Na druhou stranu ale došlo ke kontaminaci patogenními houbami, které zabrzdily vývoj gametofytů (Camloh, 1993, 1999).

Pěstování v substrátu je druhá možnost, kterou lze využívat k pěstování gametofytické generace. Kombinuje v sobě techniku *in vitro* kultur se zahradnickým pěstováním (Ranker and Haufler, 2008). Výhodou je, že není potřeba sterilizovat výtrusy, a proto nedochází k tak velkým ztrátám kvůli poškození sterilizující látkou. To je důležité v případě, že vyséváme vzácný druh, od kterého máme malé množství výtrusů (Camloh, 1999). Nejčastěji se používají různé komerční substráty či rašelina, která se míchá s křemičitým pískem v poměru 3:1 (Pangua et al., 2003; Ekrt and Koutecký, 2015). Některé studie využívají substrát dovezený spolu se vzorkem na kultivaci (Prada et al., 1995). Vždy ho musíme sterilizovat, abychom se zbavili nežádoucích organismů a popřípadě i výtrusů od jiných kapradin. Toho docílíme pomocí autoklávu při 125 °C 20 minut (Pangua et al., 2003) nebo v kuchyňské troubě při 120 °C 2 hodiny (Prada et al., 1995).

Zajímavý je způsob pěstování sporofytické a gametofytické generace v jedné pěstební nádobě v laboratoři pro simulaci v co nejpřirozenějších podmínkách. K tomu bylo využito přirozené denní světlo a květináče byly zakryté transparentním plastovým obalem. Kultura musela být častěji zalévána, aby se zabránilo vysychání substrátu (Liu et al., 2012).

Obě dvě metody můžeme kombinovat, tzn. nejprve začít s pěstováním na minerálním médiu *in vitro* a poté pokračovat na substrátu. Může to být dobrý kompromis mezi oběma technikami (Pangua et al., 2003; Ekrt and Koutecký, 2015).

6.2. Výsev a vývoj gametofytů

Na kultivaci se nejčastěji používají Petriho misky o průměru 5-10 cm, na které se snažíme rovnoměrně vyset izolované výtrusy. Udává se hodnota 100-150 výtrusů na cm² (Zhang et al., 2011). Ty se zalepí Parafilmem, aby se minimalizovaly ztráty vody a zamezilo případné kontaminaci (Beri and Bir, 1993; Pangua et al., 2003). Vzorky se poté umístí do růstové komory, která zajistí stabilní podmínky pro vyklíčení, růst a vývoj gametofytů. Kultivace probíhá nejčastěji při teplotě 20-22 °C při 12 nebo 16 hodinové světelné periodě, u tropických kapradin

(např. *Platyserium bifurcatum*) se používá teplota mezi 23-25 °C (Camloh, 1993; Fernández et al., 1999; Pangua et al., 2003). Při studiu morfologie gametofytů u *C. fragilis* byla použita teplota 24 ± 2 °C (Kaur, 1963).

Klíčení výtrusů trvá od několika dní až po několik měsíců (Fernández et al., 2011) a nejčastěji je definováno jako objevení se prvního rhizoidu (Camloh, 1993; Pangua et al., 2003). Např. u komplexu *Asplenium adiantum-nigrum* klíčí výtrusy 10 dní (Prada et al., 1995), u *C. fragilis* 14 dní až 3 týdny od výsevu (Blasdell, 1963; Kaur, 1963). Gametofyt začíná svůj vývoj jako vláknitý útvar složený z několika buněk, které už obsahují chloroplasty. Druhou fází je plochý útvar, který později začíná růst do šířky a do délky díky aktivitě apikální buňky a vzniká srdčitý prokel, který je nejčastější mezi kapradinami (Raghavan, 1989). Nacházíme ho i u *C. fragilis*, kde vývoj celého gametofytu trvá přibližně 3 měsíce (Kaur, 1963). Gametangia vznikají na spodní straně proklu. Nejprve se na něm vytvoří antheridia produkující spermatozoidy, a až poté archegonia produkující vaječnou buňku (Blasdell, 1963). Jiná studie však pozorovala vývoj gametangií u *C. bulbifera* a *C. tennesseensis*, kde vznikala archegonia před antheridii, tedy naopak, než je udáváno v monografické studii. Na druhou stranu, u *C. protrusa* se vyvíjela prvně antheridia, ale po vzniku archegonií se některé gametofyty staly znopohlavnými. Důležitou roli v určení pohlavnosti gametofytů hraje hormon antheridiogen (Haufler and Ranker, 1985). V případě použití metody pěstování na substrátu, je nutné každý týden zalévat kulturu pár kapkami vody, aby případně mohlo dojít k pohlavnímu rozmnožování a přenosu spermatozoidů na vaječnou buňku (Pangua et al., 2003).

U tohoto stádia můžeme provádět morfologická pozorování a sledovat vývoj pohlavních orgánů pod mikroskopem, zkoušet experimentální křížení (Pangua et al., 2003) nebo analyzovat prokly na průtokovém cytometru (Ekrt and Koutecký, 2015).

V minulosti se porovnávaly gametofyty 6 druhů a 2 hybridních druhů rodu *Cystopteris*, jestli by na nich nemohly být znaky vhodné k rozlišení a jestli se u nich nevyskytuje apogamie. Ve výsledku nebyla nalezena ani apogamie, a ani znaky jednoznačně determinující jednotlivé druhy (Blasdell, 1963).

6.3. Vznik sporofytu

Po oplození se ze zygoty, popřípadě z pletiva gametofytu při apogamickém rozmnožování, vyvíjí nový sporofyt. U *Polystichum aculeatum* se první sporofyly objevují po 32 týdnech po výsevu výtrusů (Pangua et al., 2003), zatímco u rodu *Dryopteris* po 8-12 týdnech (Zhang et al., 2011). Při pěstování *in vitro* je potřeba vznikající sporofyt přesadit na nové médium s dostatkem

živin. Přesazení do normálního substrátu a navyknutí skleníkových podmínek je možné po vyvinutí několika kořenů a cca 10 listů. Nutné je však postupné zvykání na vnější podmínky, aby nedošlo k úhynu (Hickok et al., 1995; Somer et al., 2010).

Pokud gametofyty nevytvořily sporofytickou generaci, tak u *Dryopteris affinis* agg. přežívají 8-32 měsíců a poté umírají (Ekrt and Kouček, 2015).

Tímto byl uzavřen celý životní cyklus kapradiny v umělých podmínkách. Dopěstováním sporofytu do stádia, kdy začne vytvářet fertilní listy, nám umožní sledovat další generaci, i když ve většině dostupných studií je hlavní zaměření na gametofytickou generaci, případně na vznikající mladý sporofyt.

7. Navazující diplomová práce

V navazující diplomové práci bych se rád věnoval problematice reprodukčních systémů a hybridizace u *C. fragilis* s. str. na území České republiky. Na tomto tématu spolupracuji s Kristýnou Hanušovou (PřF UK Praha), Liborem Ekrtem a Zuzanou Keltnerovou (PřF JU České Budějovice). Kristýna Hanušová se věnuje cytogeografii celého komplexu a morfometrickým analýzám. Na katedře botaniky v Českých Budějovicích je pak studována haplotypová variabilita chloroplastové DNA se snahou o potvrzení nebo vyvrácení nezávislé geneze vzniku hexaploidního cytotypu v populacích tetraploidů a molekulární porovnání hladkovýtrusných (*C. dickiana*) a ostnovýtrusných (*C. fragilis* s. str.) typů v rámci *C. fragilis* s. l. Přepokládaným výsledkem bude zjištění reprodukčních způsobů a dynamika polyploidního komplexu. Otázky kladené do diplomové práce jsou následující.

- 1) Jaké je zastoupení ploidii v populacích sporofytů a gametofytů?
- 2) Je opravdu přítomno rozmnožování pomocí apogamie?
- 3) Jaké je zastoupení abortovaných a životaschopných výtrusů?
- 4) Produkují pentaploidi životaschopné potomstvo? Jsou gametofyty schopné vytvořit sporofyt?
- 5) Jaká je frekvence hybridizace ve smíšených populacích tetraploidů a hexaploidů?

7.1. Metodika

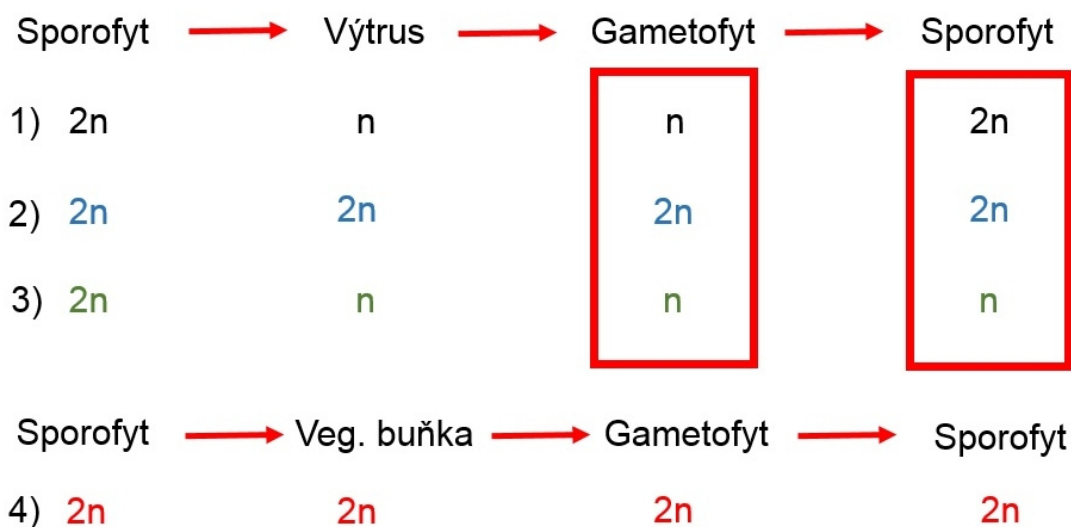
K řešení dané problematiky bude využit metodický aparát od průtokové cytometrie, kultivačních experimentů *in vitro* a na substrátu (viz kapitola 6. Kultivační experimenty), až po mikroskopické zhodnocení procenta abortovaných a životaschopných výtrusů.

7.1.1. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je cytogenetická metoda, která umožňuje analýzu chemických a fyzikálních vlastností izolovaných částic jako jsou buňky, jádra a chromozomy. Princip spočívá v zaznamenání optických vlastností částic (nejčastěji intenzita fluorescence), které se pohybují v úzkém proudu tekutiny (nejčastěji v destilované vodě) (Shapiro, 2003).

Na průtokovém cytometru budou změřeny listy sporofytické generaci, z jejichž výtrusnic bude odebrán materiál na kultivaci gametofytů a F₂ generace sporofytů, které budou také analyzovány. Porovnáním ploidní úrovně jednotlivých generací se bude dát určit způsob reprodukce, tak jak je to ukázáno na Obr. 7. Využití průtokové cytometrie v oblasti reprodukčních systémů kapradin je v současných studiích velmi malé a teprve až poslední dobou získává i tato metoda své místo v biosystematice kapradin (Kawakami et al., 2010; Ekrť and Koutecký, 2015).

Životní cyklus kapradin



Obr. 7: Životní cyklus u izosporických kapradin – 1) pohlavní rozmnožování, 2) obligátní apogamie, 3) fakultativní apogamie a 4) aposporie. Červený obdélník ukazuje na generace, u kterých pomocí porovnání ploidie (zde $2n$ – diploid jako modelový příklad) dokážeme určit typ reprodukce. Zároveň dokážeme rozlišit mezi obligátní apogamií (2), která je u kapradin přirozená a fakultativní apogamií (3), která je přítomna při nevhodných kultivačních podmínkách. Aposporie (4) by neměla být při použití výtrusů zaznamenána, neboť tam vzniká gametofyt přímo z vegetativní buňky (obrázek vytvořen podle Ranker and Haufler, 2008).

7.1.2. Mikroskopické zhodnocení abortovanosti výtrusů

Velikost výtrusů a poměr abortovaných/životaschopných výtrusů nám pomůže určit životaschopnost gametofytické generace. Tyto údaje se dají získávat z herbářových položek, ale musíme si dávat pozor, aby nedošlo ke kontaminaci jinými rostlinami, které by naše výsledky mohly zkreslit (Wagner et al., 1986).

K pozorování se používá světelný mikroskop o $400\times$ – $1000\times$ zvětšení (Ekrt and Koutecký, 2015). Na podložní sklíčko se umístí kapka vody, do které se preparační jehlou přenesou výtrusy z výtrusnice. Následuje pozorování jednotlivých charakteristických znaků, které jsou popsány v Tab. 2 (Wagner et al., 1986).

Tab. 2: Přehled znaků na výtrusnicích a výtrusech, kterých si všímáme při mikroskopickém pozorování k detekci abortovaných výtrusů (Wagner et al., 1986).

Znaky, které pozorujeme	Charakteristiky abortovaných výtrusů
Velikost výtrusnic	Menší velikost Špatně vyvinutý prstenec (<i>annulus</i>) a obústí (<i>stomium</i>)
Velikost výtrusů	Variabilita ve velikosti
Buněčná stěna (perispora) a pigmentace	Ukládání tmavých globulí do buněčné stěny Ztloustlá perispora Zborcení stěn („tvar sušené švestky“) (souvisí s buněčnou smrtí protoplastu)
Protoplast	Nepřítomnost (buněčná smrt) Malá velikost Velká velikost (nepravidelná meióza)

7.2. Pilotní studie

V rámci pilotní studie byla vybrána velká populace *C. fragilis* v Roztokách u Křivoklátu (50°1'55,275"N a 13°52'0,474"E), u které se v červnu 2015 zjišťovalo zastoupení jednotlivých cytotypů. Pro lepší orientaci byla lokalita rozčleněna do 15 nepravidelných rovnoběžníků a z každého se náhodně odebraly vzorky listů na analýzu na průtokovém cytometru. Náhodně vybraných 25 rostlin bylo na lokalitě označeno štítkem a odebraly se fertily listy na následné kultivační experimenty. Ty budou zahrnuty ve výsledcích diplomové práce.

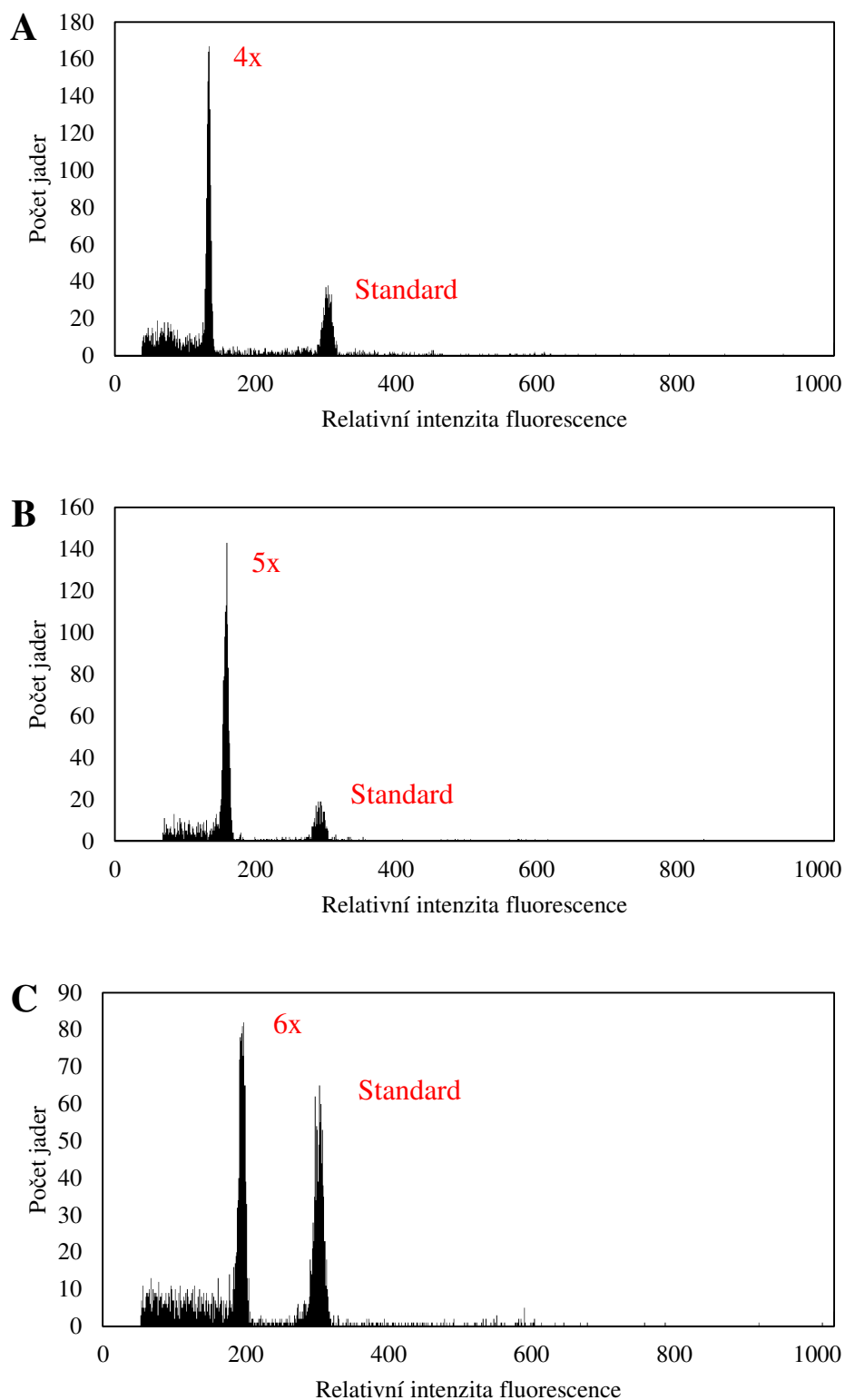
7.2.1. Příprava vzorků

Vzorky listů byly zabaleny do igelitových sáčků a nejpozději do tří dnů byly zpracovány. Použit byl standardní dvoukrokový postup (Doležel et al., 2007). Cca 2 cm² listu *C. fragilis* spolu s interním standardem *Vicia faba* cv. 'Inovec' (2C = 26,9 pg) jsem rozsekal žiletkou ve vychlazeném pufru Otto I. (0,1 M kyselina citronová, 0,5% Tween 20) na Petriho misce.

Vzniklou suspenzi jsem přefiltroval do zkumavky přes nylonový filtr s průměrem ok 42 μm. Přidal jsem fluorescenční barvivo DAPI (4',6-diaminido-2-fenylindol), které bylo v roztoku spolu s pufrům Otto II. (0,4 M Na₂HPO₄ · 12H₂O) a β-merkapt ethanolom a suspenze se nechala inkubovat 2 minuty při pokojové teplotě. Analýza byla provedena na průtokovém cytometru Partec CyFlow ML v laboratoři průtokové cytometrie Katedry botaniky PřF UK.

7.2.2. Výsledky

Analýzou 225 zástupců se potvrdila přítomnost tetraploidů, pentaploidů a hexaploidů. Oktoploidi nebyli na této lokalitě nalezeni. Výsledné histogramy jsou uvedeny na Obr. 8. Hodnota koeficientu variance (CV) vzorku i standardu je u těchto analýz nižší než 3 %.



Obr. 8: Výsledné histogramy z analýzy na průtokovém cytometru. A – tetraploid (CV = 2,7 %) a standard (CV = 2,06 %), B – pentaploid (CV = 2,42 %) a standard (CV = 2,4 %), C – hexaploid (CV = 2,34 %) a standard (CV = 2,2 %).

8. Závěr

Předkládaná bakalářská práce shrnuje dosavadní informace o problematice polyploidizace, hybridizace a reprodukčních způsobů u kapradin a v agregátu *Cystopteris fragilis*. Diskutována je také možnost využití kultivačních experimentů při práci s kapradinami.

Zájem o celý komplex začíná už v 50. letech 20. století a později dochází k vydání monografie rodu *Cystopteris*. Největší rozkvět se však datuje od 80. let 20. století na území Severní Ameriky, kde jsou pro studium používány morfologické, karyologické a jednoduché molekulární metody. Dnes se studium přesouvá převážně do Evropy a Asie.

Využití průtokové cytometrie v biosystematice kapradin se objevuje až posledních 10 let. Ve většině případů se polyploidní komplexy a reprodukční způsoby studovaly pomocí počítání chromozomů a morfologických analýz (zejména velikost výtrusů a znaky na apogamním gametofytu). Využití průtokové cytometrie jako rychlé a efektivní metody nám umožní studovat velké množství jedinců v krátkém čase a získat tak velké množství informací o způsobu rozmnožování kapradin. Toto spojení průtokové cytometrie a kultivačních experimentů teprve na své místo v biosystematice čeká a bude součástí navazující diplomové práce, jejíž otázky a cíle jsou uvedeny v samostatné kapitole.

9. Použitá literatura

- ASKER, S.E., and L. JERLING. 1992. Apomixis in Plants. CRC Press, Boca Raton.
- BERI, A., and S.S. BIR. 1993. Germination of Stored Spores of *Pteris vittata* L. *American Fern Journal* 83: 73–78.
- BHELLUM, B.L., and B. RAZDAN. 2012. *Cystopteris fragilis* f. *kashmiriensis* Bhellum and Razdan-A new forma from India. *International Journal of Scientific and Research Publications* 2: 4–7.
- BLASDELL, R.F. 1963. A Monographic Study of the Fern Genus *Cystopteris*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 21: 1–102.
- BRAITHWAITE, A.F. 1964. A new type of apogamy in ferns. *New Phytologist* 63: 293–305.
- BRECKLE, S.-W. 1987. Distribution and ecology of *Cystopteris* (Athyraceae) species within the Flora Iranica region. *Plant Systematics and Evolution* 155: 59–65.
- CAMLOH, M. 1999. Spore Age and Sterilization Affects Germination and Early Gametophyte Development of *Platyserium bifurcatum*. *American Fern Journal* 89: 124–132.
- CAMLOH, M. 1993. Spore Germination and Early Gametophyte Development of *Platyserium bifurcatum*. *American Fern Journal* 83: 79–85.
- CUI, L., P.K. WALL, J.H. LEEBENS-MACK, B.G. LINDSAY, D.E. SOLTIS, J.J. DOYLE, P.S. SOLTIS, ET AL. 2006. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research* 16: 738–749.
- DOLEŽEL, J., J. GREILHUBER, and J. SUDA. 2007. Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- DOSTÁL, J. 1984. *Cystopteris*. In K. U. Kramer, and G. Hegi [eds.], *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Band I, Teil 1. Pteridophyta., 192–201. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, Germany.
- DYER, A.F., J.C. PARKS, and S. LINDSAY. 2000. Historical review of the uncertain taxonomic status of *Cystopteris dickieana* R. Sim (Dickie's bladder fern). *Edinburgh Journal of Botany* 57: 71–81.
- DYER, R.J., V. SAVOLAINEN, and H. SCHNEIDER. 2012. Apomixis and reticulate evolution in the *Asplenium monanthes* fern complex. *Annals of Botany* 110: 1515–1529.
- EKRT, L., and P. KOUTECKÝ. 2015. Between sexual and apomictic: unexpectedly variable sporogenesis and production of viable polyhaploids in the pentaploid fern of the *Dryopteris affinis* agg. (Dryopteridaceae). *Annals of Botany* 117: 97–106.

- FERNÁNDEZ, H., A. M. BERTRAND, and R. SÁNCHEZ-TAMÉS. 1999. Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 211–214.
- FERNÁNDEZ, H., A. KUMAR, and M.A. REVILLA. 2011. Working with Ferns. Springer, New York.
- GAMPERLE, E., and J.J. SCHNELLER. 2002. Phenotypic and isozyme variation in *Cystopteris fragilis* (Pteridophyta) along an altitudinal gradient in Switzerland. *Flora* 197: 203–213.
- GASTONY, G.J. 1986. Electrophoretic Evidence for the Origin of Fern Species by Unreduced Spores. *American Journal of Botany* 73: 1563–1569.
- GASTONY, G.J., and M.D. WINDHAM. 1989. Species Concepts in Pteridophytes: The Treatment and Definition of Agamosporous Species. *American Fern Journal* 79: 65–77.
- GRULICH, V. 2012. Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. *Preslia* 84: 631–645.
- HADINEC, J., and P. LUSTYK. 2012. Additamenta ad floram Reipublicae Bohemicae. X. *Zprávy České botanické společnosti* 47: 43–158.
- HASEBE, M., P.G. WOLF, K.M. PRYER, K. UEDA, M. ITO, R. SANO, G.J. GASTONY, ET AL. 1995. Fern phylogeny based on rbcL nucleotide sequences. *American Fern Journal* 85: 134–181.
- HAUFLER, C.H., R.C. MORAN, and M.D. WINDHAM. 1993. *Cystopteris*. In C. H. Haufler, R. C. Moran, and M. D. Windham [eds.], *Flora of North America North of Mexico*, Vol. 2., 263–270. Oxford University Press, New York.
- HAUFLER, C.H., and T.A. RANKER. 1985. Differential Antheridiogen Response and Evolutionary Mechanisms in *Cystopteris*. *American Journal of Botany* 72: 659–665.
- HAUFLER, C.H., and D.E. SOLTIS. 1986. Genetic evidence suggests that homosporous ferns with high chromosome numbers are diploid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 4389–4393.
- HAUFLER, C.H., and M.D. WINDHAM. 1991. New species of North American *Cystopteris* and *Polypodium*, with Comments on Their Reticulate Relationships. *American Fern Journal* 81: 7–23.
- HAUFLER, C.H., M.D. WINDHAM, D.M. BRITTON, and S.J. ROBINSON. 1985. Triploidy and its evolutionary significance in *Cystopteris protrusa*. *Canadian Journal of Botany* 63: 1855–1863.
- HAUFLER, C.H., M.D. WINDHAM, and T.A. RANKER. 1990. Biosystematic Analysis of the *Cystopteris tennesseensis* (Dryopteridaceae) Complex. *Annals of the Missouri Botanical*

- Garden* 77: 314–329.
- HEGI, G. 1935. *Cystopteris Bernhardi*. In *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Band I. Pteridophyta, Gymnospermae und Monocotyledones I, 13–17. J. F. Lehmanns Verlag, München.
- HICKOK, L.G., T.R. WARNE, and R.S. FRIBOURG. 1995. The Biology of the Fern *Ceratopteris* and Its Use as a Model system. *International Journal of Plant Sciences* 156: 332–345.
- HOSHIZAKI, B.J., and R.C. MORAN. 2001. *Fern Grower's Manual*. Timber Press, Portland, Oregon.
- HUANG, Y.-M., S.-Y. HSU, T.-H. HSIEH, H.-M. CHOU, and W.-L. CHIOU. 2011. Three *Pteris* species (Pteridaceae: Pteridophyta) reproduce by apogamy. *Botanical Studies* 52: 79–87.
- CHRTEK, J. 1988. *Cystopteris Bernh.* In S. Hejný, and B. Slavík [eds.], *Květena ČSR* 1, 256–259. Academia, Praha.
- JERMY, A.C. 1993. *Cystopteris*. In T. G. Tutin, N. A. Burges, A. O. Chater, J. R. Edmondson, V. H. Heywood, D. M. Moore, D. H. Valentine, et al. [eds.], *Flora Europaea*, Vol 1, 2nd Ed., 24–25. Cambridge University Press.
- JERMY, A.C., and L. HARPER. 1971. Spore morphology of the *Cystopteris fragilis* complex. *British Fern Gazette* 10: 211–213.
- JONSELL, B. 2000. *Flora Nordica* 1. Stockholm.
- KAUR, S. 1963. The gametophyte of *Cystopteris fragilis*. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* 58: 148–152.
- KAWAKAMI, S.M., S. KAWAKAMI, J. KATO, K. KONDO, S. V. SMIRNOV, and O. DAMDINSUREN. 2010. Cytological study of a fern *Cystopteris fragilis* in Mongolian Altai. *Chromosome Botany* 5: 1–3.
- KHANDELWAL, S. 1990. Chromosome evolution in the genus *Ophioglossum* L. *Botanical Journal of the Linnean Society* 102: 205–217.
- KLEKOWSKI, E.J. JR. 1973. Sexual and Subsexual Systems in Homosporous Pteridophytes: A New Hypothesis. *American Journal of Botany* 60: 535–544.
- KUBÁT, K. 2002. Woodsiaceae. In K. Kubát, L. Hrouda, J. Chrtek Jr, Z. Kaplan, J. Kirschner, and J. Štěpánek [eds.], *Klíč ke květeně České republiky*, 87–89. Academia, Praha.
- LAWTON, E. 1936. Regeneration and Induced Polyploidy in *Osmunda regalis* and *Cystopteris fragilis*. *American Journal of Botany* 23: 107–114.
- LIU, H.-M., R.J. DYER, Z.-Y. GUO, Z. MENG, J.-H. LI, and H. SCHNEIDER. 2012. The evolutionary dynamics of apomixis in ferns: a case study from polystichoid ferns. *Journal of Botany* 2012: 1–11.

- LLOYD, R.M. 1974. Reproductive Biology and Evolution in the Pteridophyta. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 318–331.
- LOVIS, J.D. 1977. Evolutionary patterns and processes in ferns. *Advances in Botanical Research* 4: 229–415.
- MANTON, I. 1950. Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta. Cambridge University Press, England.
- MCGREGOR, R.L. 1950. Two Varieties of *Cystopteris fragilis*. *American Fern Journal* 40: 201–207.
- MEHLTRETER, K., L.R. WALKER, and J.M. SHARPE. 2010. Fern Ecology. Cambridge University Press, New York.
- MICKEL, J.T., and J.D. TEJERO-DÍEZ. 2004. Three New Species of Ferns (Woodsiaceae and Polypodiaceae) from Mexico. *Brittonia* 56: 115–120.
- MORAN, R.C. 1983. *Cystopteris tenuis* (Michx.) Desv.: A Poorly Understood Species. *Castanea* 48: 218–223.
- MURPHY, R.J., and F.J. RUMSEY. 2005. *Cystopteris diaphana* (Bory) Blasdel (Woodsiaceae) - an overlooked native new to the British Isles? *Watsonia* 25: 255–263.
- OTTO, S.P., and J. WHITTON. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34: 401–437.
- PALER, M.H., and D.S. BARRINGTON. 1995. The Hybrid *Cystopteris fragilis* x *C. tenuis* (Dryopteridaceae) and the Relationship Between Its Tetraploid Progenitors. *Systematic Botany* 20: 528–545.
- PANGUA, E., L.G. QUINTANILLA, A. SANCHO, and S. PAJARÓN. 2003. A Comparative Study of the Gametophytic Generation in the *Polystichum aculeatum* Group (Pteridophyta). *International Journal of Plant Sciences* 164: 295–303.
- PARIS, C.A., and M.D. WINDHAM. 1988. A Biosystematic Investigation of the *Adiantum pedatum* Complex in Eastern North America. *Systematic Botany* 13: 240–255.
- PARK, C.-H., and M. KATO. 2003. Apomixis in the interspecific triploid hybrid fern *Cornopteris christenseniana* (Woodsiaceae). *Journal of Plant Research* 116: 93–103.
- PARKS, J.C., A.F. DYER, and S. LINDSAY. 2000. Allozyme, spore and frond variation in some Scottish populations of the ferns *Cystopteris dickieana* and *Cystopteris fragilis*. *Edinburgh Journal of Botany* 57: 83–105.
- PRADA, C. 1986. *Cystopteris* Bernh. In S. Castroviejo, M. Laínz, G. López González, P. Montserrat, F. Muñoz Garmendia, J. Paiva, and L. Villar [eds.], Flora Iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. I. Lycopodiaceae-Papaveraceae,

- 115–121. Real Jardín Botánico, SCIC, Madrid.
- PRADA, C., E. PANGUA, S. PAJARÓN, A. HERRERO, A. ESCUDER, and A. RUBIO. 1995. A comparative study of gametophyte morphology, gametangial ontogeny and sex expression in the *Asplenium adiantum*—*nigrum* complex (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Annales Botanici Fennici* 107–115.
- RAGHAVAN, V. 1989. Developmental biology of fern gametophytes. P. W. Barlow, D. Bray, P. B. Green, and J. M. W. Slack [eds.], Cambridge University Press, New York.
- RANKER, T.A., and C.H. HAUFLER. 2008. Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes. Cambridge University Press, Cambridge.
- RANKER, T.A., and H.A. HOUSTON. 2002. Is Gametophyte Sexuality in the Laboratory a Good Predictor of Sexuality in Nature? *American Fern Journal* 92: 112–118.
- ROTHFELS, C.J., A.K. JOHNSON, M.D. WINDHAM, and K.M. PRYER. 2014. Low-copy nuclear data confirm rampant allopolyploidy in the Cystopteridaceae (Polypodiales). *Taxon* 63: 1026–1036.
- ROTHFELS, C.J., A. LARSSON, L.Y. KUO, P. KORALL, W.L. CHIOU, and K.M. PRYER. 2012a. Overcoming Deep Roots, Fast Rates, and Short Internodes to Resolve the Ancient Rapid Radiation of Eupolypod II Ferns. *Systematic Biology* 61: 490–509.
- ROTHFELS, C.J., M.A. SUNDUE, L.-Y. KUO, A. LARSSON, M. KATO, E. SCHUETTPELZ, and K.M. PRYER. 2012b. A revised family-level classification for eupolypod II ferns (Polypodiidae: Polypodiales). *Taxon* 61: 515–533.
- ROTHFELS, C.J., M.D. WINDHAM, and K.M. PRYER. 2013. A Plastid Phylogeny of the Cosmopolitan Fern Family Cystopteridaceae (Polypodiopsida). *Systematic Botany* 38: 295–306.
- SHAPIRO, H.M. 2003. Practical flow cytometry. 4th ed. John Wiley & Sons, New York.
- SCHIDLAY, E. 1966. *Cystopteris* Bernh. In J. Futák, M. Jasičová, and E. Schidlay [eds.], Flóra Slovenska II, 179–191. Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava.
- SCHNELLER, J., and K. KRATTINGER. 2010. Genetic composition of Swiss and Austrian members of the apogamous *Dryopteris affinis* complex (Dryopteridaceae, Polypodiopsida) based on ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution* 286: 1–6.
- SMITH, A.R. 1993. Dryopteridaceae. In C. H. Haufler, R. C. Moran, and M. D. Windham [eds.], Flora of North America North of Mexico, Vol. 2., 246–308. Oxford University Press, New York.
- SMITH, A.R., K.M. PRYER, E. SCHUETTPELZ, P. KORALL, H. SCHNEIDER, and P.G. WOLF. 2006. A classification for extant ferns. *Taxon* 55: 705–731.

- SOLTIS, D.E., and P.S. SOLTIS. 1999. Polyploidy: Recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 348–352.
- SOMER, M., R. ARBESÚ, V. MENÉNDEZ, M.A. REVILLA, and H. FERNÁNDEZ. 2010. Sporophyte induction studies in ferns in vitro. *Euphytica* 171: 203–210.
- TENNANT, D.J. 2010. The British records of *Cystopteris alpina* (Lamarck) Desvaux; Woodsiaceae. *Watsonia* 28: 57–63.
- VIDA, G. 1974. Genome analysis of the European *Cystopteris fragilis* complex: 1. Tetraploid taxa. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae* 20: 181–192.
- VIDA, G., and J. MOHAY. 1980. Cytophotometric DNA studies in polyploid series of the fern genus *Cystopteris* Bernh. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae* 26: 455–461.
- VOGEL, J.C., F.J. RUMSEY, J.J. SCHNELLER, J.A. BARRET, and M. GIBBY. 1999. Where are the glacial refugia in Europe? Evidence from pteridophytes. *Biological Journal of the Linnean Society* 66: 23–37.
- WAGNER, W.H., F.S. WAGNER, and W.C. TAYLOR. 1986. Detecting Abortive Spores in Herbarium Specimens of Sterile Hybrids. *American Fern Journal* 76: 129–140.
- WINDHAM, M.D., and C.H. HAUFLER. 1986. Biosystematic Uses of Fern Gametophytes Derived from Herbarium Specimens. *American Fern Journal* 76: 114–128.
- ZHANG, K.M., B.D. LIU, Y.M. FANG, L. SHI, and S.J. TANG. 2011. Studies on the Gametophytes of Eight Chinese Species of *Dryopteris* (Dryopteridaceae). *American Fern Journal* 101: 12–24.