

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Botanika



Bc. Jan Ptáček

Mikroevoluční procesy u *Cystopteris fragilis* agg.

Microevolutionary processes in *Cystopteris fragilis* agg.

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Praha, 2018

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, 27. 04. 2018

.....
Bc. Jan Ptáček



“Cystopteris is dominated by the widespread and polymorphic C. fragilis complex, which constitutes perhaps the most formidable biosystematic problem in the ferns.”

(Lovis, 1977, p. 356)

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří přispěli na mé cestě pteridologickou botanikou od bakalářského až po magisterský stupeň a významně tak ovlivnily podobu předkládané diplomové práce.

Na prvním místě bych rád poděkoval svému školiteli Tomáši Urfusovi, za spolupráci na celém tématu, ať už se jednalo o sběr v terénu, konzultaci výsledků a v neposlední řadě i trpělivé čtení textu, který následuje.

Liboru Ekrtovi bych chtěl poděkovat za spoustu podnětů, bohatou pteridologickou literaturu, skvělou spolupráci a všemožné konzultace od metodiky až po výsledky.

Martinu Čertnerovi děkuji za to, že mě přivedl ke kapradinovému tématu a že se mu věnuji už od bakalářského studia.

Díky Honzovi Ponertovi jsem poslední kultivační experimenty rozjel na umělém médiu a děkuji mu za možnost naučit se a aplikovat tyto znalosti *in vitro* kultur na kultivace kapradin.

Děkuji také své rodině za podporu po celou dobu mého studia.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt č. 912613).



Abstrakt

Polyploidizace a hybridizace jsou pro kapradiny určujícími mikroevolučními procesy a podílejí se na jejich variabilitě a případné speciaci. S oběma fenomény také souvisí specifické reprodukční strategie, a to zejména různorodé formy apomiktického rozmnožování, které je u kapradin zastoupeno oproti krytosemenným rostlinám ve zvýšené míře.

Cystopteris fragilis (L.) Bernh. (puchýřník křehký) je příkladem kapradiny, u které se výše uvedené evoluční jevy podílely a stále podílejí na vzniku a izolaci nových cytotypů. Hlavní zaměření předkládané diplomové práce je na cytotypovou strukturu jednotlivých fází životního cyklu puchýřníku křehkého se zvláštním zřetelem na zhodnocení sporogeneze (životaschopnosti, velikosti a počtu výtrusů) spolu s testováním reprodukčních způsobů jednotlivých cytotypů pomocí průtokové cytometrie. Navazující částí práce je i experimentální heteroploidní hybridizace.

Hlavní zdroje variability byly odhaleny u tetraploidního a pentaploidního cytotypu. Hexaploidní cytotyp naproti tomu vytváří pouze uniformní potomstvo. Tetraploidy produkují jak diploidní výtrusy, tak neredukované tetraploidní výtrusy v minoritním zastoupení (1,97 % výtrusů z celkového počtu). Pentaploidy mají variabilní sporogenezi s vysokým zastoupením neživotaschopných výtrusů. Jsou však schopné vytvářet výtrusy všech nižších ploidií a liší se populaci od populace. Jednou skupinou pentaploidů jsou pravděpodobně časné hybridy, které jsou téměř sterilní a vytváří pouze pár životaschopných výtrusů rozmnožujících se pohlavně, zatímco druhé jsou představovány spíše ustálenými hybridy, které se rozmnožují obligátní apomixií. Tímto byla poprvé potvrzena apomixie v čeledi Cystopteridaceae (puchýřníkovité).

Heteroploidní hybridizace se odehrává vzácně (pouze v 0,58 % případů experimentálního křížení), protože se jinak pohlavní rozmnožování odehrává zejména na úrovni gametofytického samooplození (tj. autogamie, oplození v rámci jednoho gametofytu).

Pro variabilitu puchýřníku křehkého jsou důležité smíšené populace. Právě v nich se odehrávají důležité procesy, které generují variabilitu, ať už se jedná o různorodou sporogenezi, vznik neredukovaných výtrusů, apomiktické rozmnožování či výjimečnou heteroploidní hybridizaci.

Klíčová slova: Apomixie, *Cystopteris fragilis*, experimentální hybridizace, gametofytické samooplození, polyploidizace, průtoková cytometrie

Abstract

Polyploidization and hybridization are the main microevolutionary processes, which take place within pteridophytes and dominantly participate in their variability and further speciation. Reproductive strategies are also related with above mentioned processes, especially various type of apomictic reproduction, which play an important role within ferns (compared to Angiosperms).

Polyploidization and hybridization take part in *Cystopteris fragilis* (L.) Bernh. (common fragile fern) and both are also recently participating in origin of new cytotype (mirrored by enormous proportion of mixed populations consisting of tetraploids to octoploids). The main goal of this diploma thesis is cytotype structure of particular stages within the life cycle of common fragile fern with evaluation of sporogenesis (viability, exospore length and number of spores), together with testing reproductive strategies of individual cytotype using flow cytometry. Moreover, an experimental hybridization is supplementing above mentioned aims of the diploma thesis.

The main sources of variability seem to be restricted to tetraploids and pentaploids, whereas hexaploids produce only uniform progeny. Tetraploids form both diploid reduced and tetraploid unreduced spores (but only 1,97 % of total amount of spores). Pentaploids have variable sporogenesis with high number of aborted spores. They tend to produce spores of all lower ploidy levels, but it differs between populations. The first group of pentaploids consist of recent hybrids, which are almost sterile, but still produce some viable spores (reproduce sexually), whereas the second group is formed by stable hybrids, which reproduce asexually via obligate apomixis. These findings confirm apomixis for the first time in Cystopteridaceae family.

Heteroploidy hybridization is very rare (only 0,58 % experimental crosses), because sexual reproduction is realized through intragametophytic selfing (autogamy within one gametophyte).

Cystopteris fragilis variability is generated predominantly in mixed ploidy populations via specific microevolutionary processes (i.e. heterogenous sporogenesis, unreduced spores, apomictic reproduction or exceptional heteroploid hybridization).

Key words: Apomixis, *Cystopteris fragilis*, experimental hybridization, intragametophytic selfing, polyploidization, flow cytometry

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	3
2.1. Mikroevoluční procesy u kapradin	3
2.1.1. Polyploidizace	3
2.1.2. Hybridizace	4
2.1.3. Reprodukční strategie u izosporických kapradin	5
2.2. Charakteristika komplexu <i>Cystopteris fragilis</i>	13
2.3. Studovaný druh <i>Cystopteris fragilis</i> L. (Bernh.)	14
2.4. Polyploidizace, hybridizace a reprodukční strategie u <i>Cystopteris fragilis</i>	14
3. Metodika	17
3.1. Sběr materiálu	17
3.2. Kultivace sporofytů P generace	18
3.3. Kultivace gametofytů <i>in vitro</i>	19
3.4. Průtoková cytometrie	21
3.4.1. Analýza sporofytů P generace	21
3.4.2. Analýza gametofytů a sporofytů F ₁ generace	21
3.4.3. Analýza výtrusů	22
3.4.4. Analýza dat	22
3.5. Mikroskopické zhodnocení výtrusů	23
3.5.1. Zhodnocení viability výtrusů	23
3.5.2. Velikost výtrusů	25
3.5.3. Počet výtrusů na jednu výtrusnici	25
3.6. Experimentální hybridizace	26
4. Výsledky	31
4.1. Průtoková cytometrie	31
4.1.1. Sporofyty P generace	31
4.1.2. Výtrusy	34
4.1.3. Gametofyty	37
4.1.4. Sporofyty F ₁ generace	42
4.2. Mikroskopické zhodnocení výtrusů	43
4.2.1. Viabilita výtrusů	43
4.2.2. Velikost výtrusů	48
4.2.3. Počet výtrusů na jednu výtrusnici	52
4.3. Experimentální hybridizace	54

5. Diskuze	55
5.1. Reprodukční strategie puchýřníku křehkého	55
5.2. Sporogeneze.....	59
5.2.1. Životaschopnost výtrusů	59
5.2.2. Lze pomocí velikosti výtrusů odhalit diplospory?	60
5.2.3. Počet výtrusů na jednu výtrusnici	61
5.3. Dynamika smíšených populací	63
5.3.1. Hybridizace u puchýřníku křehkého	64
6. Závěr	67
7. Seznam citované literatury.....	69
8. Přílohy.....	75

1. Úvod

Polyploidizace a hybridizace jsou řazeny k hlavním mikroevolučním procesům, které generují variabilitu a podílejí se na speciaci rostlin (Soltis *et al.*, 2015). Přestože je jejich význam hodnocen především u krytosemenných rostlin, jsou neméně důležité pro evoluci cévnatých výtrusných rostlin (Soltis & Soltis, 1987). Polyploidizace stojí alespoň za 7 % speciálních událostí (Otto & Whitton, 2000). Spolu s výše uvedenými jevy do značné míry souvisí i reprodukční strategie, tj. různé typy pohlavního rozmnožování (od samooplození v rámci jednoho gametofytu po oplození mezi dvěma gametofyty od různých jedinců) až po apomiktické rozmnožování (Haufler *et al.*, 2016). Apomixie je u kapradin ve srovnání s krytosemennými rostlinami velmi běžným typem reprodukce (Hörandl & Hojsgaard, 2012; Liu *et al.*, 2012).

Jednou z kritických skupin kapradin je *Cystopteris fragilis* (L.) Bernh. agg. (puchýřník křehký), na jejíž komplikovanosti se právě výše zmíněné evoluční procesy podílejí. Z Evropy jsou popisovány čtyři ploidní úrovně – tetraploidní, pentaploidní, hexaploidní a oktoploidní (Dostál, 1984). Velmi časté jsou cytotypově smíšené populace, zejména tetraploidů a hexaploidů (Hanušová *et al.*, in prep.). První studie na téma polyploidizace a hybridizace byly prováděny na území Severní Ameriky mezi několika druhy agregátu *C. fragilis*, které se však z podstatné části v Evropě nevyskytují. Analogická situace s jiným uspořádáním taxonů a cytotypů předurčovala evropské zástupce *C. fragilis* agg. k podobné studii, která by byla zaměřena zejména na hybridizaci a vznik nových ploidních úrovní (Haufler & Windham, 1991).

Mezi dosud hlavní nevyřešené problémy patří vznik jednotlivých cytotypů a jejich interakce ve smíšených populacích, zvláště pak hybridizace mezi ploidně různorodými rostlinami (tzv. heteroploidní hybridizace). Zejména pentaploidní cytotyp byl dlouhou dobu přehlížený a nebyla mu věnována dostatečná pozornost. Teprve až v poslední době u něj byly spočítány chromozomy (Kawakami *et al.*, 2010) a pozorovány výtrusy o větší velikosti, což by mohlo nasvědčovat na apomiktický způsob reprodukce (Kawakami *et al.*, 2016). Apomixie byla u *C. fragilis* poprvé pozorována už ve 30. letech 20. století, ale v tomto případě se jednalo o haploidní partenogenezi (pteridology označované za fakultativní apomixii), kdy se nový sporofyt vyvíjel přímo z pletiva gametofytu u tetraploidní rostliny pěstované v podmínkách neumožňující oplození (Lawton, 1936). Až později byl u triploidního severoamerického puchýřníku *C. protrusa* pozorovaný apomiktický typ sporogeneze (Haufler *et al.*, 1985). Avšak do dnešní doby je celá čeleď

Cystopteridaceae uváděná bez apomiktických rodů a druhů (Liu *et al.*, 2012). Jak probíhá sporogeneze u zbývajících ploidí a jaké vzniká potomstvo není dosud dostatečně objasněné (Vida, 1974). Oproti situaci a stavu probádanosti u evoluce krytosemenných rostlin (Mason & Pires, 2015) je zejména potencionální mechanismus polyploidizace prostřednictvím neredukovaných výtrusů u pohlavně se rozmnožujících rostlin dosud zcela nepoznanou pteridologickou problematikou (Gastony, 1986).

Předkládaná diplomová práce se s využitím kombinace metod průtokové cytometrie (všech částí životního cyklu), kultivačních experimentů zahrnujících experimentální hybridizaci mezi gametofyty a mikroskopického zhodnocení výtrusů klade za cíl odpovědět na následující otázky:

- 1) Jaké je zastoupení ploidí mezi mateřskou rostlinou a gametofytem vzniklým z jejích výtrusů?
- 2) Jaká je reprodukční strategie jednotlivých cytotypů, zejména hybridního pentaploidu?
- 3) Jaká je frekvence heteroploidní hybridizace v modelově smíšených populacích?

2. Literární přehled

2.1. Mikroevoluční procesy u kapradin

Mezi mikroevoluční procesy, které nejčastěji generují variabilitu u kapradin patří polyploidizace a hybridizace, které společně vedou k retikulární evoluci (Otto & Whitton, 2000). Velkou souvislost s výše uvedenými procesy mají i rozličné reprodukční strategie (tj. sexuální nebo apomiktické rozmnožování) a s nimi související kryptická speciace, v jejímž rámci jsou reprodukčně izolované jinak velmi morfologicky podobné druhy (Paris, 1989).

2.1.1. Polyploidizace

Polyploidizace je mikroevoluční proces, při kterém dochází ke znásobení sady chromozomů v buňce a právě tento děj je jedním z dominantních způsobů sympatrické speciace u rostlin, na druhou stranu u živočichů je spíše vzácným jevem (Otto & Whitton, 2000). Všechny krytosemenné rostliny prošly v minulosti dávnou polyploidizací, označovanou jako „*whole genome duplication*“ (WGD) (Albert *et al.*, 2013). Stejně tak všechny kapradiny prošly ve své evoluční historii paleopolyploidizací (Clark *et al.*, 2016) a většina izosporických kapradin má mnohem vyšší průměrné chromozomové číslo (54) ve srovnání s krytosemennými rostlinami (16) (Klekowski, 1973), heterosporické kapradiny mají chromozomové číslo nižší (14) (Ranker & Haufler, 2008). Není náhodou, že rostlinou s nejvyšším počtem chromozomů je právě kapradina, a to *Ophioglossum reticulatum*, která má 1440 chromozomů (Khandelwal, 1990).

Neopolyploidizace, tj. recentní polyploidizace proběhla u kapradin v 31 % případech, na rozdíl od krytosemenných rostlin, kde se udává 15 % (Wood *et al.*, 2009). U izosporických kapradin rozlišujeme tři typy polyploidizace (Ranker & Haufler, 2008). Aloploidizace, kdy došlo ke znásobení velikosti genomu přes sterilní hybridy, je zdaleka nejčastější mezi izosporickými kapradinami (Werth & Windham, 1991). Autopolyploidizace, tedy znásobení chromozomové sádky v rámci jednoho druhu, je u kapradin vzácná (Soltis & Soltis, 1987) a dlouhou dobu bylo toto téma přehlížené, stejně jako vznik neredukované gamety z neredukovaného výtrusu (Gastony, 1986). U některých druhů může hrát významnou roli, zvláště ve spojení s apomixií (Windham & Yatskievych, 2003). Nejčastěji se jedná o apomiktické triploidy, které vzešly z diploidu, např. u rodu *Pteris* (Chao *et al.*, 2012) nebo autotetraploidy rodu *Asplenium* (Vida, 1970). Nejméně studovaná byla alohomoploidizace při které dochází ke křížení

dvou diploidních druhů, které nejsou reprodukčně izolovány (Ranker & Haufler, 2008). Ke vzniku nového druhu dojde díky geografické nebo reprodukční izolaci¹ F₁ generace (Barrington *et al.*, 1989). První pozorování bylo u diploidů rodu *Pteris* (Walker, 1958) s dalším příkladem u tropických stromovitých kapradin čeledi Cyatheaceae (Conant & Cooper-Driver, 1980).

Větší velikost genomu u izosporických kapradin se vysvětluje jako obrana proti inbreední depresi, která je způsobena převažujícím gametofytickým samooplozením (*intragametophytic selfing*, více v kapitole 2.1.3), čemuž by mohlo napovídat i nižší chromozomové číslo u heterosporických kapradin, které mají jednopohlavné gametofyty (Klekowski, 1973). Polyploidy mohou být i zdatnějšími kolonizátory nových habitatů než jejich diploidní předci (Haufler *et al.*, 2016). Polyploidie má dále vliv na velikost buněk (u kapradin související s velikostí výtrusnic a výtrusů), geografickou distribuci a reprodukční strategie s tendencí k apomiktickému rozmnožování, viz kapitola 2.1.3 (Otto & Whitton, 2000). Ačkoliv se izosporické kapradiny uvádějí jako vysoce polyploidní, genetická data naznačují, že se jedná funkčně o diploidy, které prošly rozsáhlým procesem umlčení genů – „*gene silencing*“, v rámci kterého se pravděpodobně střídaly cykly alopolyplodizace a umlčení genů (Haufler & Soltis, 1986).

2.1.2. Hybridizace

Hybridizace, hybridy a hybridogenní druhy jsou velmi běžné mezi kapradinami a často jsou jedním z problémů při jejich taxonomickém zhodnocení (Barrington *et al.*, 1989). Na druhou stranu, hybridizace je jedním z mechanismů speciace jak u krytosemenných rostlin, tak kapradin (Ranker & Haufler, 2008). Jelikož kapradinám chybí specifická bariéra jako krytosemenným rostlinám, může docházet ke splynutí spermatozoidu a vaječné buňky mezi značně odlišnými taxony (druhy i rody). Příkladem mezidruhové hybridizace může být křížení dvou diploidních druhů *A. filix-femina* a *A. distentifolium* za vzniku hybridu *A. ×reichsteinni* (Schneller & Rasbach, 1984). Mezirodové křížení je zaznamenáno u stromovitých kapradin mezi rodem *Cyathea* a *Cnemidaria* (Conant & Cooper-Driver, 1980).

Hybridizace kapradin může být náhodná a obousměrná (symetrická) nebo pouze jedním směrem (asymetrická). Síla, která řídí asymetrickou hybridizaci u kapradin byla však dlouhou dobu velkou neznámou a je společná pro mechanismy zabraňující

¹ Reprodukční izolace díky gametofytickému samooplození, tj. samooplození v rámci jednoho gametofytu pocházejícího od jednoho sporofytu P generace (Haufler *et al.*, 2016).

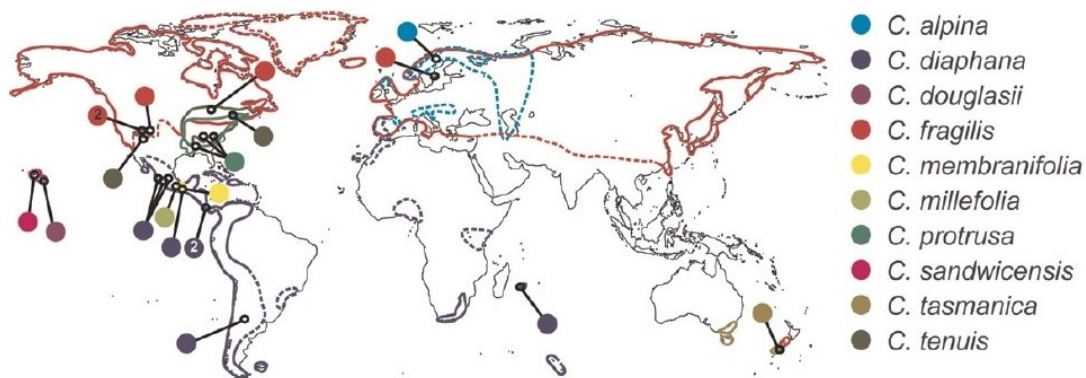
hybridizaci (Testo *et al.*, 2015). Jedná se zejména o asynchronní dozrávání gametangií a produkci pohlavně specifických hormonů – tzv. antheridiogenů, které usnadňují hybridizaci a „*outcrossing*“ v rámci jednoho druhu nebo mezi jednotlivými cytotypy (Schneller *et al.*, 1990; Jiménez *et al.*, 2008).

Hybridy u kapradin tradičně rozdělujeme do tří kategorií, v poslední době se k nim přidává čtvrtý typ. První jsou sterilní hybridy produkující neživotaschopné (abortované výtrusy), avšak tyto abortované výtrusy se mohou vyskytnout u kapradin nehybridního původu, a to i ve velké míře až 20 % z celkového počtu. Sterilní hybridy nalezneme např. v rodech *Asplenium*, *Blechnum* či *Polystichum* (Wagner *et al.*, 1986). Fertilní hybridy produkují životaschopné výtrusy. Tento typ křížence vzniká alopolyploidizací, kdy dojde ke znásobení chromozomové sádky u sterilního hybridu a současnému obnovení fertility. Takovým hybridem je i *C. fragilis* nebo *C. tenuis*. Oba sdílejí jednoho společného předka a ten druhý je zatím neznámý (Paler & Barrington, 1995). Další možností jsou apomiktické hybridy, které vytvářejí neredukované výtrusy (tzv. diplospory) (Barrington *et al.*, 1989). Avšak jako čtvrtou a velmi málo prozkoumanou kategorii bychom mohli uvést hybridy se smíšeným typem reprodukce, tj. apomiktickým a sexuálním, jako je tomu u *Dryopteris × critica* (Ekrt & Koutecký, 2015).

2.1.3. Reprodukční strategie u izosporických kapradin

V rodu změně izosporických kapradin se střídají dvě morfologicky a cytologicky jednoznačně odlišitelné fáze – pohlavní (gametofytická) a nepohlavní (sporofytická), obě dvě generace jsou samostatně žijící a na sobě nezávislé (Mehltreter *et al.*, 2010). Nejčastějším typem je pohlavní rozmnožování, kdy ve výtrusnicích (sporangích) jsou sporogenní buňky, které čtyřmi po sobě následujícími mitotickými děleními dají vzniknout mateřské buňce výtrusu (tzv. sporocytu, SMC – *spore mother cell*, $2n$ – diploidní). Z jedné sporogenní buňky vznikne 16 mateřských buněk výtrusů, které se následně meiózou rozdělí na 64 haploidních výtrusů (spor) – viz obr. 4, 1 (Raghavan, 1989). Takto vzniklé výtrusy jsou lehce šířitelné propagule, umožňující dálkový přenos a kolonizaci nových habitatů (Vogel *et al.*, 1999). Díky nim dosahuje řada kapradin kosmopolitního rozšíření (obr. 1) – puchýřník křehký není výjimkou (Vida, 1974). Z výtrusu po nějaké době začne klíčit oboupohlavný gametofyt (*prothallium*, prokel, prvoklíček, obr. 2), většinou lupenitý útvar, převážně srdčitého tvaru, na kterém jsou ve spodní části umístěné pohlavní orgány (gametangia), které mají své specifické morfologické umístění na proklu. Samčí pohlavní orgány (antheridia) mitózou vytvářejí

spermatozoidy (antheridiozoidy) a jsou umístěny v blízkosti rhizoidů. Antheridium se skládá z bazální (*basal*), prstencové (*ring*) a víčkové (*opercular*) buňky, díky jejímu otevření se ven uvolňují spermatozoidy. U rodu *Dryopteris* se udává 10–40 antheridií na jeden gametofyt (Zhang *et al.*, 2011). Samičí pohlavní orgány (archegonia) vytvářejí mitotickým dělením vaječnou buňku a jsou lokalizovány v horním zářezu lupenitého gametofytu v blízkosti meristemické zóny (Raghavan, 1989). Po oplození pouze jedné vaječné buňky se díky hormonální kontrole vyvíjí jediný sporofyt, viz obr. 3. (Guo & Liu, 2013).



Obr. 1: Kosmopolitní rozšíření agregátu *C. fragilis*. Hlavní těžiště rozšíření puchýřníku křehkého je v Evropě, Asii a Severní Americe. Převzato z Rothfels *et al.*, 2013.

Pohlavní rozmnožování u izosporických kapradin můžeme rozdělit do tří kategorií (Haufler *et al.*, 2016). První dva typy jsou analogií k samoopylení (autogamii) u krytosemenných rostlin. Jedná se o samooplození v rámci jednoho gametofytu (gametofytické samooplození, *intragametophytic selfing*), které už v první generaci může vytvářet kompletně homozygotní potomstvo, a samooplození v rámci dvou gametofytů pocházejících ze stejného sporofytu (sporofytické samooplození, *intergametophytic selfing*). Třetím typem je splynutí dvou gamet od geneticky odlišných jedinců (sporofytický outcrossing, *intergametophytic crossing*). Všechny tyto tři možnosti se mohou u výtrusných rostlin kombinovat, pak se označují termínem „*mixed mating*“ (Klekowski, 1973; Lloyd, 1974; Soltis & Soltis, 1987). Gametofytické samooplození je výhodné při kolonizaci dosud neosídlených stanovišť a při dálkovém přenosu výtrusů. Sporofytický outcrossing hraje hlavní roli v udržení genetické variability populace (Haufler *et al.*, 2016). Některé studie ukazují, že polyploidy častěji provozují gametofytické samooplození než jejich diploidní předci, kteří dávají přednost sporofytickému outcrossingu (Haufler & Soltis, 1984; Masuyama & Watano, 1990). Příkladem, kdy to tak neplatí, je provedená studie na třech druzích rodu *Dryopteris*, kdy

díky hormonálnímu efektu a funkčně jednopohlavným gametofytům převažoval sporofytický outcrossing (Jiménez *et al.*, 2008). Dále se předpokládá, že vyšší frekvence samooplození je u alopolyloidních než u autopolyloidních druhů, avšak tato problematika byla studována pouze u krytosemenných rostlin (Husband *et al.*, 2008).



Obr. 2: Lupenitý gametofyt puchýřníku křehkého. Na okrajích je možné pozorovat drobné, bíle zbarvené trichomy, ve spodní části pak rhizoidy.



Obr. 3: Nově vznikající tetraploidní sporofyt F_1 generace puchýřníku křehkého vznikající oplozením na diploidním gametofytu.

Izosporické kapradiny, ač produkují oboupohlavné gametofyty, disponují mechanismy, které zajišťují u mnoha druhů prokly funkčně jednopohlavné. Prvním z nich je asynchronní dozrávání gametangií, kdy jsou nejprve funkční antheridia, a až později dozrávají archegonia (Lloyd, 1974). Izosporické kapradiny mají labilní determinaci pohlaví, což znamená, že existuje celá řada faktorů (zejména ekologických), které ovlivňují pohlavnost gametofytů (Korpelainen, 1998). Je dokázáno, že archegonia se vyvíjejí v příznivějších podmínkách než antheridia (Jiménez *et al.*, 2008). Nejdůležitějším faktorem je hormonální kontrola pomocí antheridiogenů, což jsou látky podobné fytohormonu giberelinu (Raghavan, 1989).

Jedná se zejména antheridiogen A (*Pteridium aquilinum*), B (čeleď Schizaeaceae) a C (*Ceratopteris richardii*), pojmenovaných podle kapradin či čeledí, u kterých byly studované (Schneller *et al.*, 1990). Antheridiogeny jsou tvořeny plně vyvinutým samičím gametofytem a jejich vylučování způsobuje u sousedních gametofytů tvorbu antheridií. Po oplození dochází k ukončení produkce tohoto hormonu a ze sousedních gametofytů se můžou stát samičí nebo oboupohlavné gametofyty (Schneller *et al.*, 1990). Tento hormon funguje i mezidruhově a jeden z příkladů je známý na severoamerických druhích rodu *Cystopteris*. Jedná se o hybridizaci dvou diploidů – *C. bulbifera*, který vylučuje antheridiogen (má samičí gametofyt) a *C. protrusa*, který na hormonální podnět reaguje a vytváří antheridia. Díky oplození spermatozoidem od *C. protrusa* vzniká nový druh *C. × tenesseensis* (Haufler *et al.*, 1990).

Pohlavní rozmnožování není jedinou cestou k zajištění potomstva. Druhou možností je nepohlavní rozmnožování pomocí apomixie (někdy také nazývané apogamie, agamosporie, terminologie viz níže). Dřívější odhady okolo 10 % takto se rozmnožujících druhů byly zřejmě nadnesené (Ranker & Haufler, 2008), novější odhad okolo 3 % je zase velmi nízký (Liu *et al.*, 2012) a pravda bude ležet někde mezi těmito čísly (Ekrť pers. comm.). U spousty druhů stále nemáme dostatečné informace o jejich způsobu reprodukce. Důležité je však upozornit, že se jedná o stále větší počet apomikticky se rozmnožujících druhů než u krytosemenných rostlin, kde se hodnota pohybuje okolo 0,1 % (Hörandl & Hojsgaard, 2012). Apomixie vznikla u kapradin několikrát nezávisle na sobě a velmi početně je zastoupena u odvozených čeledí Dryopteridaceae (kapradovitě) a Pteridaceae (křídelnícovitě), kde se takto rozmnožuje až 70 % druhů. Na druhou stranu je velmi vzácná u nejdíverzifikovanější čeledi kapradin – Polypodiaceae (osladičovité) (Liu *et al.*, 2012). Apomixie úzce souvisí s polyploidii, největší tendence k tomuto typu rozmnožování je u lichých ploidiích, kdy nedochází

ke správnému párování chromozomů. Udává se, že 50–70 % triploidů se rozmnožuje apomikticky, u pentaploidů je procento nižší (Lin *et al.*, 1992). Dále se apomikticky mohou rozmnožovat diploidní druhy (20–35 %). Tato problematika je známa u rodu *Pteris* (křídelnice), kdy nefunkční archeogonia předurčují rostliny k nepohlavnímu rozmnožování (Huang *et al.*, 2011). Velmi vzácná je apomixie u tetraploidního cytotypu, např. u hybridního druhu rodu *Phegopteris* (bukovinec) (Driscoll *et al.*, 2003). Diploidy a triploidy mohou produkovat 80–90 % neredukovaných výtrusů (diplospor), u tetraploidů a pentaploidů se udává nižší počet, cca 20–40 % (Schneller & Krattinger, 2010).

Apomixii u kapradin dělíme na obligátní a fakultativní (indukovanou). Fakultativní apomixie² je velmi vzácný jev v přírodě a byla pozorována u jediného druhu – *Asplenium hallbergii*, avšak tento případ by si zasloužil případné znovu zhodnocení (Dyer *et al.*, 2012). Nejčastěji se tento typ nepohlavního rozmnožování vyskytuje u rostlin v laboratorních podmínkách, kde jsou vystaveny nadměrnému záření a nedostatku vody. V takovém případě není umožněno oplození a nový sporofyt vzniká z pletiva gametofytu (Raghavan, 1989). Ploidie výsledného sporofytu je stejná jako gametofytu (v případě diploidního rodičovského sporofytu je haploidní). Většinou nepřežije déle než pár týdnů a nikdy nevyprodukuje životaschopné výtrusy (Manton, 1950). Některé studie se tomuto fenoménu věnovali detailně za účelem studia polyploidizace kapradin (Lloyd, 1973; Kawakami *et al.*, 2011).

Obligátní apomixie je pak zásadní děj v nepohlavním rozmnožování kapradin, který vylučuje pohlavní rozmnožování (Liu *et al.*, 2012) a zahrnuje dva procesy. První je tzv. diplosporie, kdy dochází k produkci neredukovaných výtrusů, která je následována vývojem nového sporofytu ze somatických buněk gametofytu v blízkosti apikálního meristému (tzv. apogamie). Celý tento proces pak můžeme nazvat jako apomixie nebo agamosporie (Gastony & Windham, 1989). Obligátně apomiktické kapradiny ve většině případů vytvářejí antheridia, archeogonia chybí nebo jsou nefunkční (Guo & Liu, 2013). Přítomnost funkčních antheridií může umožňovat pohlavní rozmnožování mezi apomiktickými a pohlavně se množícími druhy, jako je to zaznamenáno u severoamerického *C. protrusa* (Haufler *et al.*, 1985) nebo triploidního hybridu

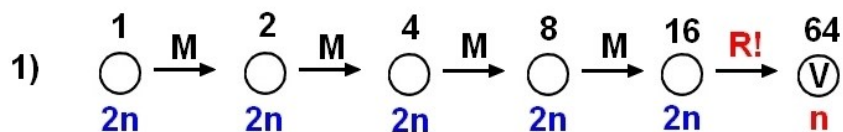
² Fakultativní apomixie v pteridologické literatuře označuje jiný proces než u krytosemenných rostlin. U nich se jedná o popis smíšeného typu reprodukce, tj. pohlavního a apomiktického rozmnožování. Pokud bychom měli tento typ rozmnožování nazývat jako krytosemenná část botaniky, pak by se jednalo o haploidní partenogenezi (Cruden & Lloyd, 1995).

z komplexu *Dryopteris affinis* (Schneller & Krattinger, 2010). Pokud se jedná o výtrus s neredukovaným počtem chromozomů, pak by i výsledný spermatozoid měl být neredukovaný (tzv. neredukovaná gameta). Koncept vzniku a role neredukovaných gamet v evoluci kapradin je stále nejasná na rozdíl od jejich významu u krytosemenných rostlin (Gastony, 1986; Chao *et al.*, 2012). Předpokládá se, že křížení apomiktických a pohlavně se rozmnožujících druhů dává vzniknout hybridům, které se rozmnožují opět apomikticky (Windham & Yatskievych, 2003). Apomixie u kapradin nemusí produkovat pouze klony svých rodičů (Gastony & Windham, 1989). Díky homolognímu párování chromozomů a *crossing overu* se vytvářejí geneticky různorodé výtrusy (Lin *et al.*, 1992). V poslední době se ukazuje, že obligátně apomiktické kapradiny mohou produkovat dva typy gametofytů, jedny se rozmnožují apomikticky a druhé pohlavně, liší se však v ploidní úrovni. Příkladem mohou být triploidní apomikty a pohlavně se rozmnožující hexaploidy u hybridu *Polystichum* × *bicknellii* (Pinter, 1995) nebo pentaploidní apomikty a aneuploidní (2,5 ploidní) pohlavně se rozmnožující hybridy *Dryopteris* × *critica* (Ekrt & Koutecký, 2015).

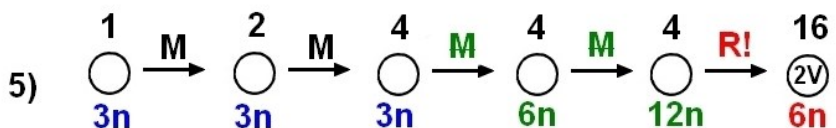
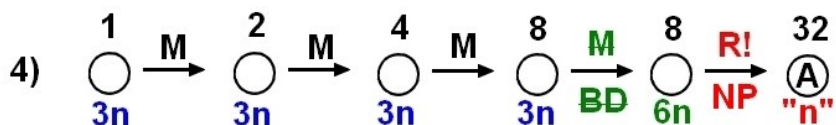
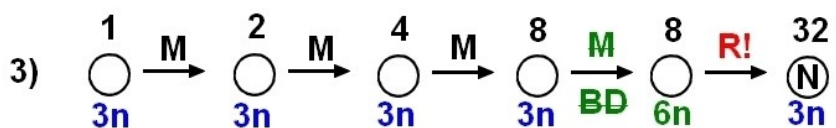
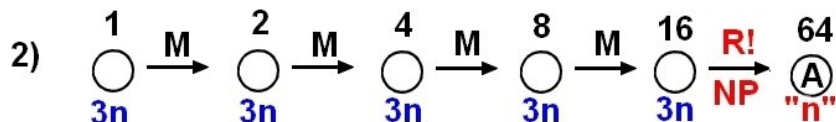
U apomikticky se rozmnožujících kapradin máme dva typy sporogeneze, které umožňují dokončení jejich životního cyklu. Jedná se o schéma Döpp–Mantonové a vzácnější Braithwaite, obě dvě nazvané podle svých objevitelů v minulém století (Döpp, 1939; Manton, 1950; Braithwaite, 1964).

Sporogeneze typu Döpp–Mantonové zahrnuje čtyři různé typy sporogeneze, které se liší výsledným produktem (Döpp, 1939; Manton, 1950) a jsou směrodatné pro většinu leptosporangiálních kapradin. Následující řádky jsou shrnutím sporogeneze z několika různých zdrojů (Klekowski, 1973; Gastony & Windham, 1989; Raghavan, 1989; Hickok *et al.*, 1995).

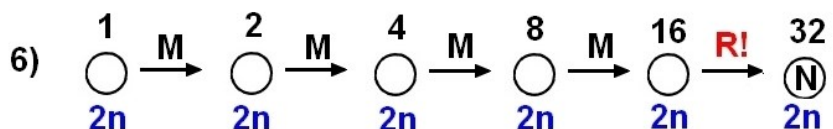
Pohlavní rozmnožování



Döpp-Manton



Braithwaite



Obr. 4: Schéma rozličných typů sporogeneze u výtrusných rostlin. Pohlavní rozmnožování (1), jehož výsledkem je 64 redukovaných výtrusů, Döpp-Mantonové (2–5) a Braithwaite schéma (6). Horní čísla udávají počet buněk, dolní pak ploidní úroveň (n – haploidní, „ n “ – nerovnoměrně rozdělené chromozomy, $2n$ – diploid, $3n$ – triploid, $6n$ – hexaploid, $12n$ – dodekaploid). Zkratky nad nebo pod šipkami naznačují probíhající procesy (M – mitóza, přeškrtnuté M – nepravidelná mitóza, přeškrtnuté BD – absence jaderného a buněčného dělení, R! – meióza, NP – nepravidelné párování chromozomů). Kolečko naznačuje výtrusy (A – abortované výtrusy N – neredukované výtrusy, V – redukované výtrusy, 2V – výtrus s dvojnásobným počtem chromozomů).

Sporogeneze I. typu: (obr. 4, 2)

Začínáme u sporogenní buňky, která projde třemi následnými mitotickými děleními a vzniká 8 buněk. Těchto 8 buněk se počtvrté mitoticky rozdělí a vzniká 16 mateřských buněk spor. V průběhu následující meiózy nedochází ke správnému párování chromozomů a vznikají buňky, které nemají správný počet chromozomů a dochází k jejich abortaci. Ve výsledku máme 64 výtrusů na jedno sporangium, které jsou všechny abortované.

Sporogeneze II. typu: (obr. 4, 3)

Sporogenní buňka projde třemi mitotickými děleními a vznikne 8 buněk. Čtvrté mitotické dělení začne probíhat normálně, chromozomy se seřadí v ekvatoriální rovině, ale nedojde k jadernému, ani buněčnému dělení. Stále máme 8 buněk, ale ty mají zdvojnásobený počet chromozomů. Při meiotickém dělení spolu párují sesterské chromozomy. Ve výsledku máme 32 životaschopných výtrusů uspořádaných v klasických tetradách o stejné ploidii jako sporofyt (tzv. diplospory nebo neredukované výtrusy).

Sporogeneze III. typu: (obr. 4, 4)

U třetího typu dochází k nedokonalému znovu ustanovení jádra v jedné nebo více z 8 mateřských buněk. Meiotické dělení je nepravidelné a ve výsledku vede k 32 abortovaným výtrusům na jednu výtrusnici.

Sporogeneze IV. typu: (obr. 4, 5)

U čtvrté možnosti sporogeneze je začátek odlišný od předchozích typů. Dvěma následnými kompletními mitotickými děleními, která jsou následovány dvěma mitotickými děleními končícími v anafázi, dochází ke vzniku 4 velkých, autotetraploidních a homozygotních buněk. Ty se dělí meiózou a vzniká 16 výtrusů uspořádaných v tetradách o dvojnásobném počtu chromozomů oproti sporofytu.

Sporogeneze typu Braithwaite (obr. 4, 6) byla poprvé pozorována u druhu *Asplenium aethiopicum* a jedná se o vzácnější typ. Začátek s mitotickými děleními je stejný jako u schématu Döpp–Mantonové a ve výtrusnicích je 16 mateřských buněk výtrusů. Při meiotickém dělení však dochází k rozpadu bivalentu chromozomů na osamocené univalenty. Znovu se ustanovuje jádro a vzniká 32 životaschopných

neredukovaných výtrusů (diplospor) uspořádaných nikoliv v tetradách, ale v diádách (Braithwaite, 1964).

Teoretická schémata nám tedy ukazují, že pro určení apomiktické leptosporangiální kapradiny nám stačí spočítat počet výtrusů na jednu výtrusnici a podle toho rozhodnout, zdali se rozmnožuje pohlavně (64 výtrusů) nebo pomocí apomixie (32 výtrusů uspořádaných v 8 diádách nebo 16 tetradách) (Raghavan, 1989). Tato metodika, která byla v dřívější době jednou ze stěžejních, je stále součástí výzkumu reprodukční strategie u kapradin (Park & Kato, 2003; Huang *et al.*, 2011). Situace ovšem není tak jednoduchá. Za prvé se mohou na konci dělení vytvářet kromě diád a tetrad i triády výtrusů (Braithwaite, 1964) a za druhé se všechny čtyři typy sporogeneze Döpp–Mantonové mohou současně odehrávat v jedné výtrusnici (Dyer *et al.*, 2012; Ekrt & Koutecký, 2015). Ukazuje se, že apomiktické kapradiny mohou produkovat cytotypově různé výtrusy. U triploidního *Dryopteris pacifica* se vytváří diploidní a triploidní gametofyty, které dávají vzniknout sporofytu o stejné ploidii (Lin *et al.*, 1992).

2.2. Charakteristika komplexu *Cystopteris fragilis*

Cystopteris Bernh. (puchýřník) je celosvětově (s výjimkou Antarktidy) rozšířený rod izosporických kapradin patřících do čeledi Cystopteridaceae Schmakov (puchýřníkovité), jež stojí na bázi skupiny Eupolypodiopsida II. (Rothfels *et al.*, 2012; PPG I, 2016). Tento rod je podle fylogenetické studie rozdělen do 4 podpořených větví – *C. montana*, který stojí odděleně od zbytku celého rodu, *C. bulbifera* (vyskytující se převážně v Severní Americe), *C. sudetica* s těžištěm rozšíření v Asii a polymorfní druhový komplex *C. fragilis* (případně také označován jako *C. fragilis* agg.). Celý rod zahrnuje cca 27 druhů, některé z nich jsou však doposud nejasného taxonomického postavení (Rothfels *et al.*, 2013, 2014).

Na území Evropy se tradičně udává výskyt 4 druhů (mikrospecií) z tohoto komplexu – *C. fragilis* (p. křehký), který je pravděpodobně jednou z nejrozšířenějších kapradin na světě (Rothfels *et al.*, 2013), *C. alpina* (p. vápencový), *C. diaphana* (p. prosvítavý) a taxonomicky nejednoznačný druh *C. dickieana* (p. hladký) (Dostál, 1984; Jermy, 1993), který je podle recentních studií pravděpodobně součástí druhu *C. fragilis* (Dyer *et al.*, 2000; Parks *et al.*, 2000, Hanušová *et al.*, in prep.).

V České republice se z celého agregátu vyskytuje pouze jediný druh – *C. fragilis* (Chrtek, 1988). V Klíči ke květeně České republiky (Kubát, 2002) je udáván ještě *C. dickieana*, ale s poznámkou, že tento druh vyžaduje taxonomickou revizi. Mimo tento

složitý komplex se na našem území nachází ještě *C. sudetica* (p. sudetský), který se v současné době udává pouze z jednoho místa v CHKO Jeseníky, kde byl nalezen v roce 2010. Do té doby byl považován za nezvěstný druh a dnes je veden jako kriticky ohrožený (Daníhelka *et al.*, 2012; Grulich, 2012; Hadinec & Lustyk, 2012).

2.3. Studovaný druh *Cystopteris fragilis* L. (Bernh.)

Puchýřník křehký je vytrvalá bylina dosahující výšky 10–20 cm. Oddenek je krátký, vystoupavý nebo plazivý, z něhož vyrůstají růžice listů, které jsou na bázi zduřelé. Řapík je stejně dlouhý nebo kratší než listová čepel a ve spodní části se na něm objevují pleviny. Čepel je 1–2–3× zpeřená. Lístky jsou vstřícně postavené, 1–2× zpeřené, na okrajích pilovité až zubaté a žilky směřují k okraji (Haufler *et al.*, 1993; Jermy, 1993). Výtrusnicové kupky jsou okrouhlé, uspořádané ve dvou řadách a umístěné mezi střední žilkou a okrajem lístku. Výtrusy jsou hnědé, na povrchu ostnitě a dosahují velikosti 35–55–65 μm. Z výtrusnice vypadávají od června do srpna (Chrtek, 1988; Tryon & Lugardon, 1991). Krátkověký lupenitý gametofyt má srdčitý tvar a na jeho okraji jsou jednobuněčné trichomy (Pajarón *et al.*, 1996). Plně je vyvinutý po 3 měsících od vyklíčení. Antheridia a archegonia jsou umístěny na spodní straně v blízkosti střední žilky (Kaur, 1963).

V České republice má *C. fragilis* těžiště rozšíření v mezofytiku, avšak vyskytuje se okrajově i v ostatních oblastech. Jedná se o diagnostický druh svazu *Cystopteridion* Richard 1972, což je společenstvo vlhkých, stinných a bazických skalních štěrbin (primární výskyt druhu *C. fragilis*). Lze jej sekundárně nalézt na kamenných zdech a mostech. Převážně se tedy vyskytuje na zásaditých horninách (Dostál, 1984; Chrtek, 1988), avšak můžeme ho nalézt i na substrátech neutrálních či kyselých (Hanušová *et al.*, in prep.).

2.4. Polyploidizace, hybridizace a reprodukční strategie

u *Cystopteris fragilis*

Na území střední Evropy má *C. fragilis* čtyři ploidní úrovně (tab. 1) – tetraploidní (převažuje), pentaploidní, hexaploidní a velmi vzácní jsou jedinci oktoploidní (Hanušová *et al.*, in prep.). Polyploidní série byla poprvé postulována v roce 1961 na základě měření velikosti výtrusů (Hagenah, 1961) a potvrzena o dva roky později (Blasdell, 1963). Již od 70. let 20. století se ukazuje, že velikost výtrusů nevede k jednoznačné determinaci jednotlivých cytotypů (Vida, 1974), a to zejména díky produkci neredukovaných výtrusů

(Kawakami *et al.*, 2010) a velké morfologické variabilitě (Gamperle & Schneller, 2002). Základní chromozomové číslo je 84, diploidní jedinci *C. fragilis* s. str. však nejsou z Evropy známi a celý druh diverzifikuje na tetraploidní úrovni pravděpodobně díky genovému umlčení („*gene silencing*“) (Haufler & Windham, 1991).

Tab. 1: Jednotlivé ploidie u druhu *C. fragilis*, počet chromozomů a velikost genomu (pg – pikogram, 1 pg = 10⁻¹² g, SD – směrodatná odchylka, NA – u oktoploidního cytotypu není známá absolutní velikost genomu).

Ploidie	Počet chromozomů	Odkaz	Velikost genomu (průměr + SD)	Odkaz
4x	2n = 168	Vida, 1974	14,26 pg ± 0,070	Hanušová <i>et al.</i> , in prep.
5x	2n = 210	Kawakami <i>et al.</i> , 2010	17,59 pg ± 0,059	
6x	2n = 252	Vida, 1974	20,80 pg ± 0,424	
8x	2n = 336	Vida, 1974	NA	

Právě polyploidie a vznik nových ploidí je problém v celém komplexu a první studie na toto téma byly prováděny na území Severní Ameriky mezi jednotlivými druhy komplexu *C. fragilis*, které se v Evropě nevyskytují. Tento pohled nám umožňuje podobně uvažovat i o procesech probíhajících mezi cytotypy na evropském kontinentě. Tetraploidní cytotyp pravděpodobně vznikl hybridizací mezi diploidním druhem *C. reevesiana* a neznámým, pravděpodobně vymřelým diploidem, který se označuje jako *C. „hemifragilis“* (Haufler & Windham, 1991).

U hexaploidního cytotypu je situace složitější. Pokud bychom se drželi amerického modelu, pak by hybridizoval tetraploid s diploidem za vzniku triploidního druhu, který by autopolyploidizací dal vzniknout hexaploidu, stejně tak, jako v případě amerického *C. laurentiana*. Druhou možností jeho vzniku je existence neredukovaného výtrusu a neredukované gamety u tetraploidu, která by dala vzniknout hexaploidnímu cytotypu (Urfus, unpubl.). Ovšem existence neredukovaných gamet u kapradin je stále dostatečně neprobádaná oblast (Gastony, 1986). Ani analýza haplotypové variability chloroplastové DNA (cpDNA) nepotvrdila, ani nevyvrátila jednu z těchto teorií (Hanušová *et al.*, in prep.). Dřívější studie poukazují, že přítomnost 84 bivalentů a 42 univalentů ukazuje na fakt, že jedním z předků byl tetraploid (Vida, 1974). Otázkou také zůstává, zdali se jedná o dávnou hybridizační událost nebo o děj probíhající v současné době.

Pentaploid vznikl hybridizací mezi tetraploidem a hexaploidem (Knobloch *et al.*, 1984). Tuto teorii potvrzuje pozorování univalentních chromozomů (Kawakami *et al.*, 2010), velmi časté cytotypově smíšené populace a analýza variability cpDNA neprokázala u pentaploidů žádné unikátní haplotypy (Hanušová *et al.*, in prep.). Dosud však není známo, zdali pentaploidní cytotyp vznikl dávnou hybridizační událostí nebo vzniká opakovaně. Jak vzniká oktaploidní cytotyp je dosud neznámo (Vida & Mohay, 1980).

První zmínky o apomixii u *C. fragilis* přicházejí ve 30. letech 20. století, kdy byl pozorován vývoj nového sporofytu z pletiva gametofytu (Lawton, 1936). Ze 70. let pochází experiment s kultivací tetraploidního cytotypu, u kterého se řízenou kultivací snažili omezit oplození. Část nově vzniklých sporofytů neměla dlouhé trvání, některé však dorostly a začaly produkovat výtrusy (Vida, 1974). V obou případech se však jednalo o fakultativní apomixii.

U severoamerického triploidního *C. protrusa* byla pozorována sporogeneze typu Braithwaite. Kromě produkce velkých, neredukovaných výtrusů, byly přítomny i další morfologicky odlišné typy výtrusů (Haufler *et al.*, 1985).

Pentaploidní cytotyp *C. fragilis* byl dlouhou dobu přehlížený a nebyla mu nikdy věnována dostatečná pozornost (Vida, 1974). Teprve v poslední době u něj byly pozorovány výtrusy, které jsou větší než u hexaploidního cytotypu s charakteristickými znaky pro diplospory (Kawakami *et al.*, 2010) a pravděpodobně potvrzen čtvrtý typ sporogeneze Döpp–Mantonové (Kawakami *et al.*, 2016). U tetraploidního cytotypu v Indii byly pozorovány dvě velikostní frakce výtrusů, které jsou vysvětlovány jako reakce na rozdílné podmínky prostředí (Bhella & Razdan, 2012). V jednom ze shrnujících článků o apomixii u kapradin (Liu *et al.*, 2012) je čeleď Cystopteridaceae uváděna jako pohlavně se rozmnožující, bez apomixie.

3. Metodika

3.1. Sběr materiálu

Na základě údajů z předchozí cytogeografické studie agregátu *Cystopteris fragilis* (Hanušová *et al.*, in prep) byly vybrány převážně smíšené modelové populace doplněné o jednu kontrolní nesmíšenou (viz tab. 2) k detailnímu studiu ploidní úrovně a reprodukčních způsobů. Jednalo se o čtyři populace z České republiky a dvě ze Slovenska, ve kterých probíhaly sběry ve vegetačních sezónách mezi lety 2015-2017. Všechny populace byly zaměřeny GPS (Garmin, Dakota 20) pro případnou pozdější identifikaci. Detailní informace o počtu sporofytů využitých v dílčích studiích je uveden v příloze 2 a herbářové doklady budou uloženy v herbáři Karlovy Univerzity (PRC).

Tab. 2: Přehled studovaných modelových populací.

označení	lokality	nadmořská výška (m. n. m.)	souřadnice	datum sběru	ploidie	sporofyt (ks)
ROZ	Roztoky u Křivoklátu	275	50°3'20"N 13°86'67"E	19. 6. 2015 11. 5. 2016	4x, 5x, 6x	182
BEL	Bělá pod Pradědem	511	50°8'16"N 17°12'37.7"E	21. 6. 2016	4x, 5x	49
NOV	Nové Město nad Metují	299	50°21'10.0"N 16°09'44.7"E	1. 6. 2017	4x, 6x	49
OHB	Oheb	550	49°50'1.13"N 15°39'14.71"E	1. 6. 2017	4x, 5x, 6x	45
RAD	Velký Radzim	850	48°46'30.0"N 20°20'36.8"E	24. 5. 2017	4x, 5x, 6x	14
ZAD	Zád'iel	510	48°38'20.25"N 20°48'53.08"E	26. 5. 2017	4x, 5x, 6x	15
OPA	Oparno	244	50°32'35.5"N 14°00'31.8"E	13. 8. 2017	4x	11

Pilotní testování metodiky bylo provedeno na lokalitě Roztoky u Křivoklátu. Zde bylo náhodným výběrem sebráno 118 rostlin ke zjištění ploidní úrovně pomocí průtokové

cytometrie. Dalších 27 rostlin bylo označeno plastovým štítkem (pro jejich budoucí identifikaci a odběr do kontrolovaných podmínek), fertilní listy byly odebrány pro analýzu ploidie a na kultivační experimenty. Jednotlivé listy byly uchovávány v chladu v plastovém sáčku, nejpozději do tří dnů zpracovány a následně vysušeny jako herbářové položky pro další studium. Pro lepší manipulaci a zamezení kontaminace výtrusy jinými kapradinami bylo u následujících populací přistoupeno k odběru celých rostlin, včetně kořenů, přesazení a ke kontrolované kultivaci ve skleníku katedry botaniky.

Ke studiu velikosti výtrusů byly použity také herbářové položky z předchozí studie (Hanušová *et al.*, in prep.) a jejich seznam je v příloze 1.

3.2. Kultivace sporofytů P generace

Rostliny odebrané z přírody byly jednotlivě zasazeny do umělohmotných květináčů o průměru 13 cm, označeny a umístěny do skleníku katedry botaniky (obr. 5). Substrát byl namíchan podle dostupné literatury (Hoshizaki & Moran, 2001) a obsahoval 7 dílů zahradního substrátu, 2 díly agropérlitu a 1 díl křemičitého písku. Každá rostlina byla zakrytá technickou tkaninou UHELON 130T (Silk & Progress, s. r. o., Brněnec, Česká republika) o průměru ok 42 μm (Ekrt & Koutecký, 2015), aby nedošlo ke kontaminaci výtrusy od jiných ploidii nebo kapradin. Ploidie rostlin byla zanalyzována užitím průtokového cytometru (viz kapitola 3.4.1).



Obr. 5: Kultivace sporofytů P generace pod zákrytem monofilu v experimentálním skleníku katedry botaniky.

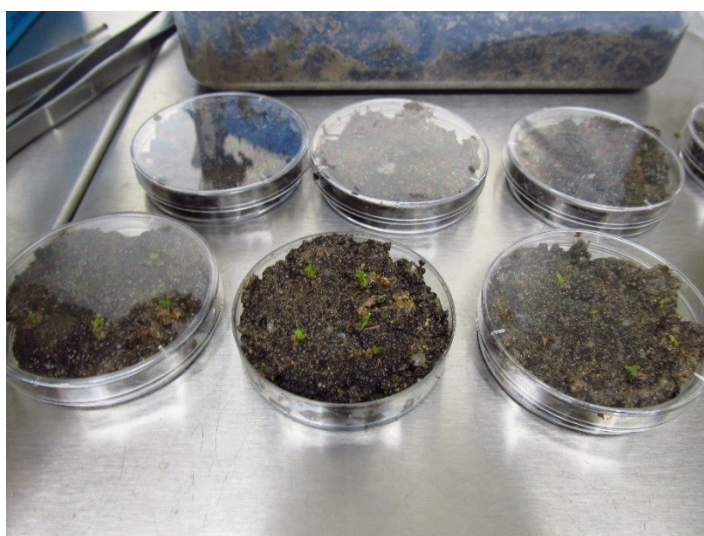
Trofosporofyly byly odebírány ve dvou fázích. V první fázi, kdy byly výtrusnice nezralé a zelené, byla část lístku s výtrusnicemi fixována v 70% ethanolu a uchovávána v mikrozkuhavce, aby byl posléze stanoven počet výtrusů na výtrusnici (kapitola 3.5.3).

V druhé fázi, když začaly dozrávat výtrusnice, byl celý trofosporofyl uschován do obálky vyrobené ze savého papíru a nechal se přirozeně vysychat. Takto připravený materiál sloužil ke kultivačním experimentům a měření jednotlivých morfologických charakteristik na výtrusech.

3.3. Kultivace gametofytů *in vitro*

Pro pěstování gametofytické generace byly zvoleny dva odlišné přístupy – výsev na substrát (obr. 6) a umělé médium. Aby se zamezilo kontaminaci jinými mikroorganismy, výsev byl prováděn v laminárním boxu (J1001 Telstar), který byl spolu s pracovními nástroji sterilizován prostřednictvím UV záření po dobu 1 hodiny.

Jako první kultivační metoda bylo zvoleno pěstování na substrátu o složení 1 dílu rašeliny a 3 dílů křemičitého písku. Ten byl následně zalit vodou o teplotě 100 °C a dále vyvařován po dobu 10 minut v mikrovlnné troubě, aby došlo ke zničení případných cizích výtrusů a nežádoucích mikroorganismů. Výtrusy nebyly před vysetím žádným způsobem chemicky ošetřovány. Substrát byl naplněn do Petriho misek o průměru 6 cm, navlhčen převařenou vodou s přípravkem proti houbovým chorobám (Previcur®) a pomocí preparační jehly byly izolovány výtrusy na podložku z filtračního papíru a následně rovnoměrně rozprostřené po celé kultivační ploše. Každá ploidie byla vysévána v rámci samostatného běhu z důvodu zamezení přenosu výtrusů mezi jednotlivými Petriho miskami. Laminární box se opětovně vysvítí UV záření a nástroje byly omyté 70% ethanolem a destilovanou vodou. Petriho misky byly na závěr izolovány parafilmem k zamezení úniku vlhkosti.



Obr. 6: Kultivace gametofytů v Petriho miskách.

Vybrané tetraploidní rostliny byly vysety s oddělením dvou frakcí výtrusů pomocí filtru o průměru ok 50 µm (Sysmex) na „malé“ výtrusy (pod 50 µm) a „velké“ výtrusy (nad 50 µm) s cílem odhalit neredukované výtrusy u tetraploidního cytotypu. Jinak se postup nelišil od výše uvedeného.

Z důvodu nevhodné manipulace a dopěstování následující F₁ sporofytické generace bylo přistoupeno k využití umělého média pro výtrusné rostliny (Baslerová & Dvořáková, 1962), které bylo připraveno ve spolupráci s Janem Ponertem z Laboratoře studia regulačních faktorů morfogeneze rostlin (Katedra experimentální biologie rostlin, PřF UK).

Pro přípravu 0,5 l média byly použity následující komponenty:

Látka	Zásobní roztok (10 ml)	Použité množství (do 0,5 l destilované vody)
NH ₄ NO ₃	0,08 g	1,25 ml
KH ₂ PO ₄	0,136 g	0,325 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12 g	0,2 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,11 g	0,5 ml
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,016 g	0,08 ml
Agar		7,5 g

Ze zásobních roztoků bylo odpipetováno požadované množství do 0,5 l destilované vody, upraveno pH na 5,7-5,8 pomocí roztoku kyseliny chlorovodíkové (HCl) a hydroxidu sodného (NaOH) a následně byl přidán gelovací prostředek (agar). Celá směs byla uvedena do bodu varu (100 °C), přelita do zásobních lahví a nechala se ¾ hodiny v autoklávu na programu 120 °C. Částečně zchladlé médium bylo nalito do Petriho misek o průměru 12 cm. Po vychladnutí byly umístěny do igelitového sáčku a uchovány v lednici do doby, než na ně byly vysety výtrusy.

Výtrusy byly izolovány preparační jehlou na filtrační papír a přesypány do injekční stříkačky o objemu 10 ml. Přes hrdlo byl umístěn filtr o velikosti ok 10 µm (aby nedošlo ke ztrátě výtrusů) a následně injekční jehla o průměru 1,2 mm.

Dezinfekce výtrusů probíhala následujícím způsobem:

- 1) Nasátí roztoku 70% ethanolu (1×, 5 minut)
- 2) Omytí autoklávovanou destilovanou vodou (3×)
- 3) Dezinfekce chlornanem vápenatým (Ca(ClO)₂) (3×, 1 minuta)
- 4) Omytí autoklávovanou destilovanou vodou (3×)

5) Nasátí autoklávované destilované vody pro výsev na připravené médium

Z injekční stříkačky byl odstraněn filtr a nasazena jehla o průměru 1,6 mm. Z jedné injekční stříkačky byla vytlačena dávka 2 ml roztoku do jedné Petriho misky.

Kultivační nádoby byly umístěny do růstové komory (ThermoForma) s následujícími parametry: 12 hodin světlo (20 °C) a 12 hodin tma (12 °C). Gametofyty vyšetě prvním způsobem byly použity pro cytometrické analýzy, mikroskopické pozorování a hybridizační experimenty, gametofyty z umělého média byly použity na hybridizační experimenty.

3.4. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je hlavní metodický přístup předkládané diplomové práce. Tato metoda byla ve studiu výtrusných rostlin využívána jen zřídka (Bureš *et al.*, 2003; Ekrt *et al.*, 2009; Hanušová *et al.*, 2014), zvláště pak při studiu jednotlivých generací rodozměny (Ekrt & Koutecký, 2015). Mateřské sporofyty, výtrusy, gametofyty a následné sporofyty F₁ potomstva byly podrobeny studiu relativní velikosti genomu (DNA ploidní úrovně). Porovnáním ploidní úrovně mezi gametofyty a sporofyty lze zjistit jejich reprodukční strategii (viz kapitola 3.4.4).

3.4.1. Analýza sporofytů P generace

Při analýze byl použit standardní dvoukrokový postup (Doležel *et al.*, 2007). Přibližně 2 cm² listu (trofosporofylu) bylo žiletkou rozsekáno společně s 1 cm² interního standardu *Vicia faba* cv. 'Inovec', 2C = 26,9 pg (Doležel *et al.*, 1992) ve vychlazeném pufru Otto I. (650 ml, složeno z 0,1 M kyseliny citronové a 0,5% Tween 20) na Petriho misce. Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes nylonový filtr o průměru ok 42 μm (Silk & Progress, s. r. o., Brněnec, Česká republika). Takto připravené vzorky se nechaly půl hodiny inkubovat a před jejich analýzou byl přidán 1 ml barvicího roztoku, který se skládal z fluorescenčního barviva DAPI (4',6-diaminido-2-fenylindol), pufru Otto II. (0,4 M Na₂HPO₄ · 12H₂O) a antioxidantu β-merkptoethanolu (C₂H₆OS). Po obarvení byl vzorek analyzován na průtokovém cytometru CyFlow ML (UV LED 365 nm jako excitační zdroj) v Laboratoři průtokové cytometrie, Katedry botaniky PřF UK.

3.4.2. Analýza gametofytů a sporofytů F₁ generace

Pro analýzu gametofytů a následně sporofytů F₁ generace byl použit stejný postup jako při analýze rodičovské generace (viz kapitola 3.4.1). V případě malé velikosti gametofytů

bylo přistoupeno k simultánní analýze tří gametofytů. Pokud byl přítomen nově vznikající sporofyt, byl zanalyzován společně s gametofytem v jedné analýze.

3.4.3. Analýza výtrusů

Pro velmi rychlou analýzu reprodukčních způsobů lze použít výtrusy. Výhoda této metody spočívá ve velkém množství analyzovaných částic z jednoho jedince, nevýhodou je nemožnost srovnání s následující generací. Problém, jak dostat nepoškozená jádra z výtrusu řeší recentně publikovaná metodika analýzy výtrusů na průtokovém cytometru (Kuo *et al.*, 2016), jež byla pro naše potřeby částečně modifikována (viz dále).

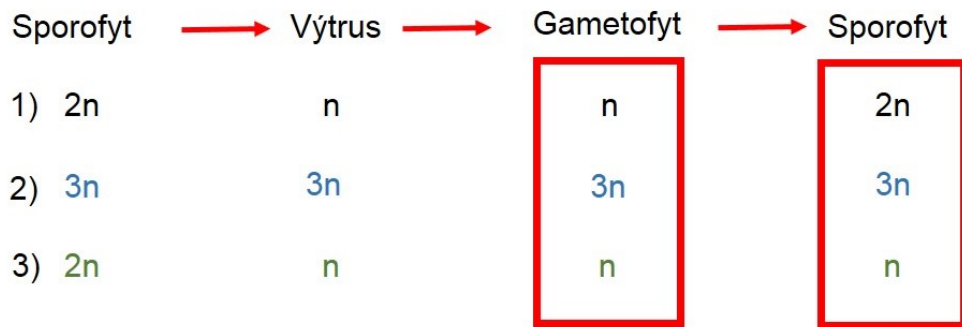
Z různých částí trofosporofyly byly pomocí preparační jehly izolovány výtrusy na podložku z filtračního papíru a přesunuty do 2 ml zkumavek společně s 1 ml pufrem Otto I (složení viz kapitola 3.4.1). Tento roztok byl přefiltrován přes filtr o průměru ok 100 µm (Sysmex), aby došlo k oddělení sporofytického pletiva. K přefiltrované směsi byly přidány silika-karbidové kuličky (0,75 – 0,90 g) a vše se nechalo rozdrtit v mlýnku na drcení rostlinného materiálu (Retsch MM200) po dobu 8 minut rychlostí 30 otáček/s. Po ukončení drcení byla směs přefiltrována přes technickou tkaninu s průměrem ok 42 µm (Silk & Progress, s. r. o., Brněnec, Česká republika) a bylo přidáno 200-300 ml interního standardu *Vicia faba* cv. 'Inovec'. Kvůli možnému překryvu s vyššími ploidiemi, bylo u části pentaploidních sporofytů přistoupeno k využití jiného standardu – *Pisum sativum* 'Ctirad', 2C = 9,09 pg (Doležel *et al.*, 2007). Další postup se už nelišil od uvedeného výše v kapitole 3.4.1.

3.4.4. Analýza dat

Výsledné histogramy byly vyhodnoceny v programu Partec FloMax 2.4b (Partec GmbH, Münster). Z poměru vzorku ke standardu byla odvozena DNA ploidní úroveň a zároveň byl zaznamenán variační koeficient (CV), který odkazuje na přesnost analýzy. Do celkového zhodnocení byly použity analýzy, které nepřesahovaly 5 % hodnoty CV.

Z porovnání DNA ploidie mezi jednotlivými generacemi byl odvozen pravděpodobný reprodukční způsob (viz obr. 7).

Test reprodukčních strategií s využitím průtokové cytometrie



Obr. 7: Základní schéma testu reprodukčních strategií s využitím průtokové cytometrie. Velmi snadno lze porovnáním DNA ploidie gametofytické a sporofytické generace rozlišit pohlavní rozmnožování (1), obligátní apomixii (2) a fakultativní apomixii (3), n – haploidní, $2n$ – diploidní, $3n$ – triploidní. Červené obdélníky vyznačují porovnávané generace.

3.5. Mikroskopické zhodnocení výtrusů

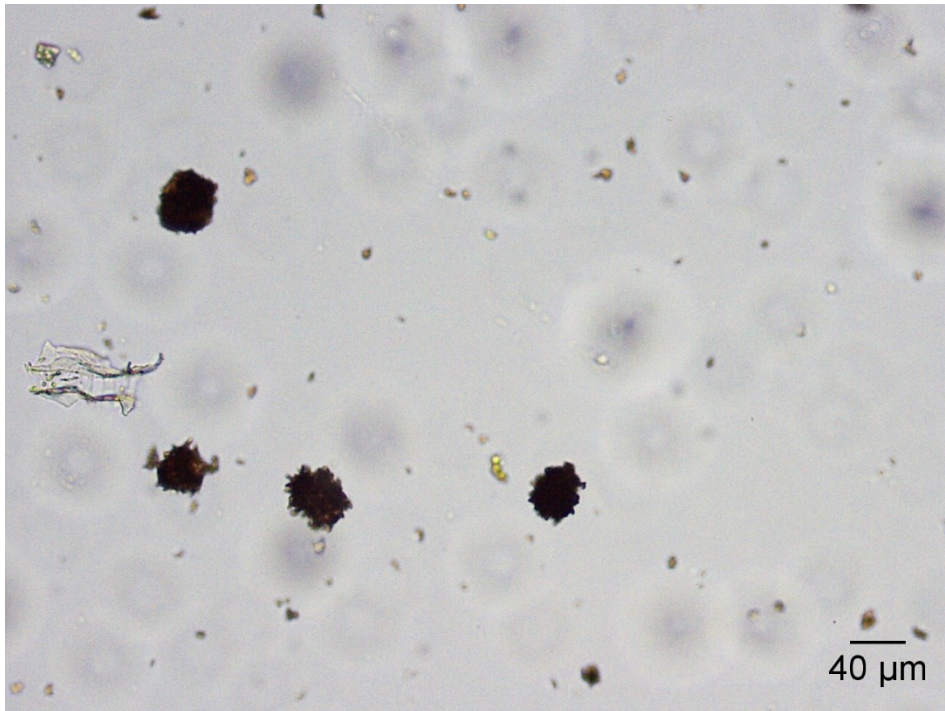
Pro komplexní zhodnocení reprodukčních strategií je důležité použít některé tradičně využívané metody a získat morfologické znaky. Mezi ně patří mikroskopické zhodnocení viability (Hornych & Ekt, 2017), velikosti (Dyer *et al.*, 2012) a počtu výtrusů na jednu výtrusnici (Hickok *et al.*, 1995) následované srovnáním dle DNA ploidie mateřské rostliny.

3.5.1. Zhodnocení viability výtrusů

Ke zhodnocení viability (životaschopnosti) výtrusů se dnes používá index SAI (*spore abortion index*) (Hornych & Ekt, 2017). SAI vyjadřuje procento abortovaných (neživotaschopných) výtrusů (obr. 8) z celkového počtu studovaných výtrusů u jedné rostliny.

$$SAI (\%) = \frac{\text{počet abortovaných výtrusů}}{1000} \times 100$$

Z jednotlivých lístků bylo odebráno potřebné množství výtrusů pomocí preparační jehly a umístěny do kapky vody na podložním sklíčku. Aby bylo dosaženo objektivního výsledku, byly výtrusy odebírány ze čtyř různých částí listu. Následně byly spočítané abortované a životaschopné výtrusy na vzorku 1000 kusů pod světelným mikroskopem (Olympus BX-61, zvětšení: 200×–400×). Výtrusy byly považované za abortované, pokud nabývaly některé z charakteristik uvedených v tab. 3 (Wagner *et al.*, 1986).



Obr. 8: Abortované výtrusy pentaploidní rostliny 1K19. Mezi pozorované znaky neživotaschopných výtrusů patří pigmentace, ztráta ornamentace a zborcení buněčné stěny.

Na hodnocení životaschopnosti výtrusů byly použity dva datasety. První obsahoval rostliny z modelových populací, druhý byl obohacen o pentaploidní rostliny z cyto geografické studie (Hanušová *et al.*, in prep.). Tato data byla vyhodnocena pomocí základních statistických postupů v programu R, v. 3.2.3 (R Core Team, 2017).

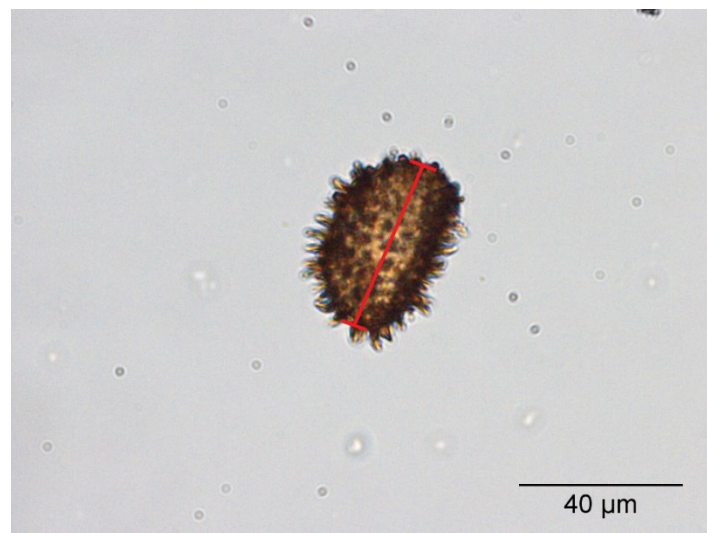
Tab. 3: Přehled struktur, znaků a jejich charakteristik, které slouží k detekci abortovaných výtrusů (Wagner *et al.*, 1986).

Struktura	Znaky	Charakteristika
Výtrusnice	Velikost	Malé
	Prstenec (<i>annulus</i>) Obústí (<i>stomium</i>)	Špatné vyvinuté
Výtrusy	Velikost	Velmi variabilní ve velikosti, nejčastěji malé
		Velké (pravděpodobně životaschopné diplospory, nutno ověřit kultivací)
	Buněčná stěna (<i>perispora</i>)	Ukládání tmavých globulí (pigmentace)
		Ztloustlá
		Zborcení stěn
	Protoplast	Ztráta ornamentace
Nepřítomnost (buněčná smrt)		
		Malý/velký

3.5.2. Velikost výtrusů

Velikost výtrusů je dalším vodítkem pro odhalení neredukovaných výtrusů (tzv. diplospor), které vznikají poruchami jaderného a buněčného dělení (Quintanilla & Escudero, 2006).

Pro měření velikost výtrusů byly použity jak rostliny z modelových populací, tak i rostliny z předchozí studie (Hanušová *et al.*, in prep.). Od každého jedince bylo vyfoceno 20 výtrusů pod světelným mikroskopem (Olympus BX-61, zvětšení: 200×–400×) a následně změřena délka exospory bez ostnů (obr. 9) v programu ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Z naměřených hodnot byl vypočítán průměr na celou rostlinu. Takto získaná data byla vyhodnocena základními statistickými postupy v programu R, v. 3.2.3, (R Core Team, 2017) a PAST, v. 2.17c (Hammer *et al.*, 2001).



Obr. 9: Metodika měření velikosti výtrusů. Červenou úsečkou je v ilustračním obrázku naznačen měřený úsek. DNA tetraploidní rostlina 1C3 z Roztok u Křivoklátu.

3.5.3. Počet výtrusů na jednu výtrusnici

Tato metoda vychází z teoretických předpokladů, že pohlavně se rozmnožující leptosporangiátní kapradiny mají 64 výtrusů, zatímco apomikté pouze 32 nebo 16 (Döpp, 1939; Manton, 1950; Braithwaite, 1964). V začátcích výzkumu apomixie u kapradin tak tato metoda sloužila jako vodítko, které společně s počítáním chromozomů a přímým pozorováním gametofytů detekovala apomiktické druhy. I dnes je počet výtrusů nedílnou součástí studia reprodukce u výtrusných rostlin (Park & Kato, 2003; Ekrť & Koutecký, 2015).

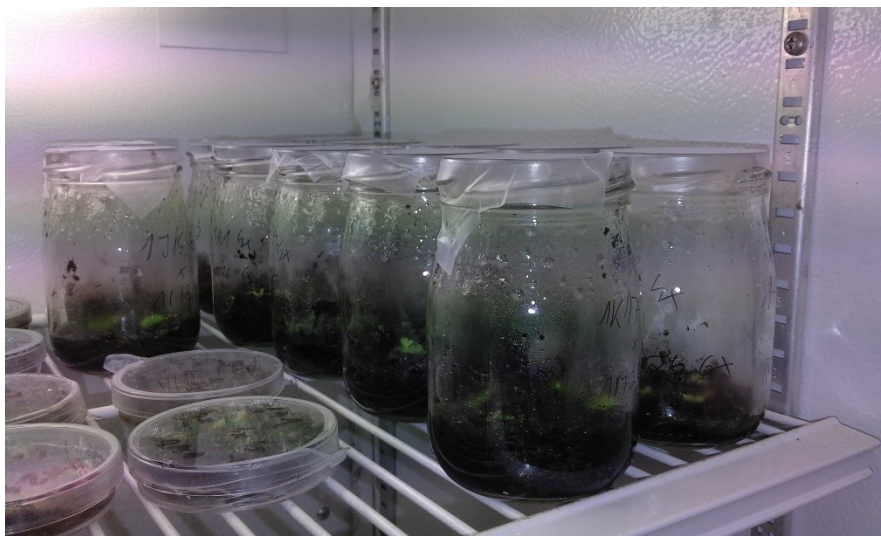
Ještě nezralé a neotevřené výtrusnice vybraných rostlin byly společně s částí listu naloženy do 70% ethanolu a uchovávané do doby, než byly počítané. Následně byla celá

výtrusnice přemístěna do kapky vody na podložním sklíčku, otevřena preparační jehlou a pod optickým mikroskopem (Olympus BX-61, zvětšení: 200×–400×) byl zaznamenán celkový počet výtrusů. Data byla vyhodnocena v programu R, v. 3.2.3 (R Core Team, 2017).

3.6. Experimentální hybridizace

Experimentální křížení není běžnou metodou výzkumu evoluce kapradin (Hickok *et al.*, 1995), na rozdíl od opylovacích pokusů u krytosemenných rostlin (Dafni, 1992). Dle dostupné literatury (Hoshizaki & Moran, 2001; Hall *et al.*, 2006; Sleep, 2014) je několik možných způsobů hybridizace, které byly použité i ve výzkumu smíšených ploidních populací a vzniku nových ploidních úrovní. Teoretické schéma křížení mezi jednotlivými ploidiemi je uvedeno v tab. 4.

Pro experimentální hybridizaci bylo zvoleno několik odlišných metod z důvodu obtížného provedení křížení mezi gametofyty. Stručná charakteristika všech hybridizací je uvedena v tab. 5 a další detaily jsou rozepsány v následujícím textu.



Obr. 10: Experimentální hybridizace gametofytů v kultivačních nádobách.

Tab. 4: Teoretické možnosti pohlavního a apomiktického rozmnožování u *Cystopteris fragilis* s. str. a jejich možné využití jako podklad pro experimentální hybridizaci.
* – při obligátní apomixie nejsou ve většině případů přítomny pohlavní buňky (archegonia a antheridia).

Gametofytické samooplození (<i>intragametophytic selfing</i>)				
	Ploidie sporofyt	Ploidie gametofyt	Ploidie gamety	Ploidie sporofyt
1	4x	2x	2x	4x
2	4x	4x	4x	8x
3	6x	3x	3x	6x
4	8x	4x	4x	8x
Homoploidní hybridizace (křížení stejných ploidii) Sporofytické samooplození (<i>intergametophytic selfing</i>) Sporofytický outcrossing (<i>intergametophytic crossing</i>)				
	Ploidie sporofyt	Ploidie gametofyt	Ploidie gamety	Ploidie sporofyt
1	4x	2x	2x	4x
	4x	2x	2x	
2	4x	4x	4x	8x
	4x	4x	4x	
3	6x	3x	3x	6x
	6x	3x	3x	
4	8x	4x	4x	8x
	8x	4x	4x	
Heteroploidní hybridizace (křížení odlišných ploidii) Sporofytický outcrossing (<i>intergametophytic crossing</i>)				
	Ploidie sporofyt	Ploidie gametofyt	Ploidie gamety	Ploidie sporofyt
1	4x	2x	2x	5x
	6x	3x	3x	
2	4x	2x	2x	6x
	4x	4x	4x	
3	4x	2x	2x	8x
	6x	6x	6x	
4	5x	5x	5x	8x
	6x	3x	3x	
Obligátní apomixie				
1	5x	5x	X*	5x
2	4x	4x	X*	4x

Při pilotním testování hybridizace gametofytů byly použity rostliny z lokality Roztoky u Křivokláta, později k nim byla přidána populace Bělá pod Pradědem. Byla zvolena metoda přiložení dvou gametofytů různých ploidii k sobě na Petriho misce (obr. 11, a), zalití kapkami vody a jejich pozdějšího přesazení do větších kultivačních nádob pro lepší rozvoj sporofytu (obr. 10).

Druhý hybridizační pokus využil lokalizaci gametangií na gametofytu. Antheridia jsou umístěna v dolní části u rhizoidů a archeonia v horním zářezu, pak prostým oddělením jednotlivých částí se zamezí gametofytickému samooplození a tyto jednotlivé části se samčím nebo samičím gametangiem se přiloží k jiné části tak, aby proběhla požadovaná hybridizace (obr. 11; b, c).

Jako třetí možnost bylo zvoleno společné vysévání výtrusů dvou různých ploidií do jedné Petriho misky.

Poslední křížení bylo provedeno na umělém médiu. Pipetou se sterilní špičkou byla na jednotlivé zralé gametofyty kápnuta kapka autoklávované destilované vody. Po uvolnění spermatozoidů byly přemístěny na zralý gametofyt jiné ploidy a opačně.

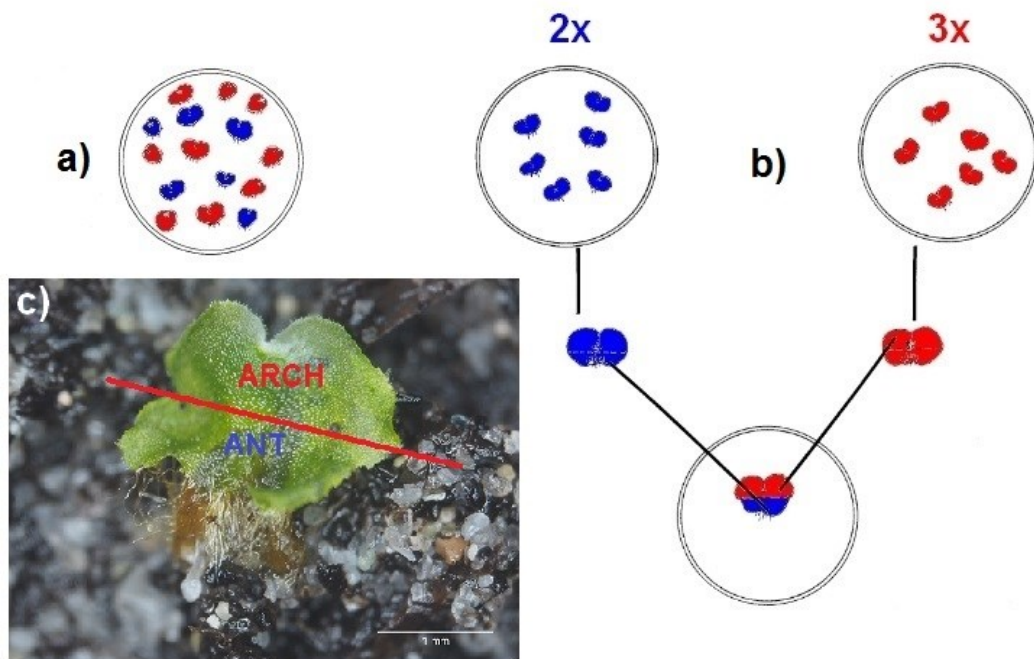
Jako kontrola sloužily rostliny 1E5 (Roztoky u Křivoklátu), 238 (Bělá pod Pradědem), u kterých k sobě byly přiloženy dvě stejné ploidy a ostatní Petriho misky s gametofyty se kterými nebyly prováděny žádné manipulace.

V následující tab. 5 jsou uvedeny všechny kombinace provedených křížení.

Tab. 5: Design experimentální hybridizace mezi jednotlivými ploidiemi. Čísla a písmena ve sloupci gametofyt a potomstvo značí jednotlivé rostliny, počet opakování – počet Petriho misek s daným typem křížení, zkratky populací: ROZ – Roztoky u Křivoklátu, BEL – Bělá pod Pradědem, NOV – Nové Město nad Metují, OHB – Oheb.

Hybridizace 1: gametofyty odlišných nebo stejných ploidií se umístily do těsné blízkosti při udržování vlhkého substrátu						
gametofyt	ploidie	gametofyt	ploidie	počet opakování	potomstvo	populace
1A1	2x	1M24	3x	4	1A1-1M24	ROZ
1A1	2x	1M25	3x	2	1A1-1M25	ROZ
1A1	2x	1M26	3x	1	1A1-1M26	ROZ
1K17	2x	1M25	3x	3	1K17-1M25	ROZ
1I12	2x	1J15	5x	2	1I12-1J15	ROZ
247	2x	1J6	3x	1	247-1J6	BEL/ROZ
222	2x	1J6	3x	1	222-1J6	BEL/ROZ
1E5	2x	1E5	2x	kontrola (1)	1E5-1E5	ROZ
238	2x	238	2x	kontrola (1)	238-238	BEL
Hybridizace 2: oddělení archegonií a antheridií a přiložení k sobě dvou různých gametofytů o jiné ploidií						
gametofyt (samčí)	ploidie	gametofyt (samičí)	ploidie	počet opakování	potomstvo	populace
1J6	3x	214	2x	1	1J6-214	ROZ/BEL
214	2x	1J6	3x	1	214-1J6	BEL/ROZ
1J2	5x	1J6	3x	1	1J2-1J6	ROZ
1J6	3x	1J2	5x	1	1J6-1J2	ROZ
214	2x	1J10	5x	1	214-1J10	BEL/ROZ
1J6	3x	232	2x	1	1J6-232	ROZ/BEL
Hybridizace 3: společný výsev dvou ploidií						
gametofyt	ploidie	gametofyt	ploidie	počet opakování	potomstvo	populace
47	2x	419	3x	1	47-419	NOV
48	2x	421	3x	1	48-421	NOV
48	2x	511	3x	1	48-511	NOV/OHB

Hybridizace 4: přenos spermatozoidů na umělém médiu						
gametofyt	ploidie	gametofyt	ploidie	počet opakování	potomstvo	populace
427	2x	534	3x	6	427-534	NOV/OHB



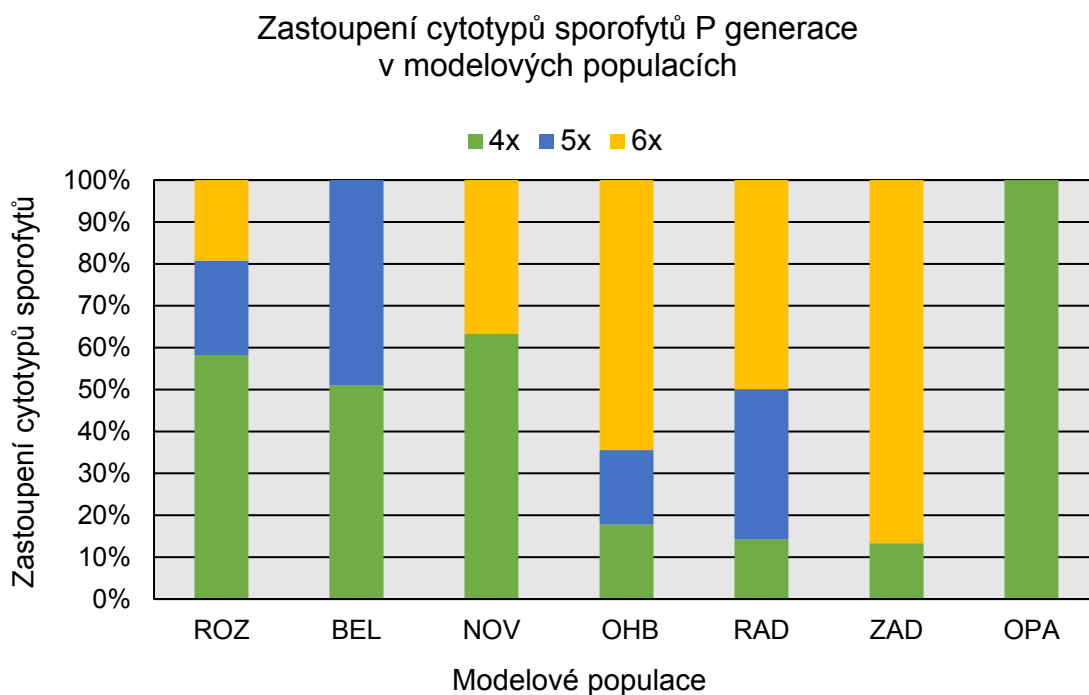
Obr. 11: Způsob provedení prvních dvou typů experimentálních hybridizací, a) Hybridizace 1, b) Hybridizace 2 a c) princip rozříznutí gametofytu na samičí část (ARCH – archegonia) a samčí část (ANT – antheridia). Pro ilustraci můžeme modrý gametofyt označit jako 2x (diploidní) a červený jako 3x (triploidní). Měřítka v obrázku c) odpovídá 1 mm. Upraveno podle Hoshizaki & Moran, 2001.

4. Výsledky

4.1. Průtoková cytometrie

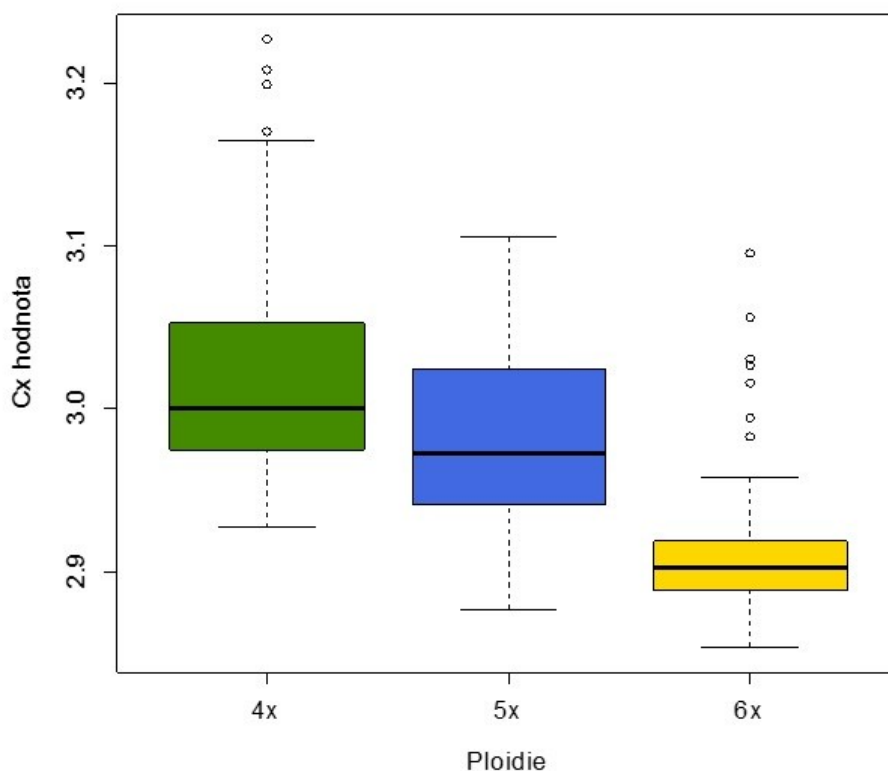
4.1.1. Sporofyty P generace

Celkem bylo sebráno 365 rostlin (dále označovány jako sporofyty P generace) ze 7 populací v České a Slovenské republice, které byly podrobeny cytometrické analýze pro zjištění ploidní úrovně. Kromě populace Oparno byly všechny populace smíšené, tři z nich (Roztoky u Křivoklátu, Oheb, Radzim) měly zastoupeny všechny tři běžně se vyskytující ploidie (tj. tetraploidní, pentaploidní a hexaploidní cytotyp, obr. 15). U populace Bělá pod Pradědem chyběl hexaploidní cytotyp, ačkoliv se tam vyskytují pentaploidy. Oktoploidní cytotyp nebyl nalezen na žádné lokalitě, ani v populaci Nové Město nad Metují, odkud jsou uváděni jedinci z cytogeografické studie Hanušové *et al.*, in prep. Procentuální zastoupení jednotlivých cytotypů sporofytů P generace v modelových populacích je zobrazeno na obr. 12.



Obr. 12: Zastoupení cytotypů sporofytů P generace v modelových populacích. Na ose x jsou uvedené modelové populace (v závorce uveden celkový počet zanalyzovaných jedinců): ROZ – Roztoky u Křivoklátu (182), BEL – Bělá pod Pradědem (49), NOV – Nové Město nad Metují (49), OHB – Oheb (45), RAD – Radzim (14), ZAD – Zád'iel (15), OPA – Oparno (11). Na ose y je zastoupení jednotlivých cytotypů v procentech.

Relativní velikost genomu odpovídá intervalům pro jednotlivé ploidie, u kterých byly spočítány chromozomy (Hanušová *et al.*, in prep.). Průměrná relativní velikost genomu jednotlivých ploidí, počet analyzovaných rostlin, standardní odchylka a variační koeficient (v průtokové cytometrii označován jako CV hodnota) jsou uvedeny v tab. 6. Variační koeficienty vzorků nepřesahovaly hodnotu 5,6 % (průměr 2,33 %) a standardu 4,02 % (průměr 2,06 %). Dále byla relativní velikosti genomu vydělena ploidí a byla získána tzv. C_x -hodnota (C_x -value), která udává monoploidní velikost genomu (Doležel *et al.*, 2007). Relativní velikost genomu pentaploidu s hodnotou mezi tetraploidem a hexaploidem naznačuje, že se pravděpodobně může jednat o jejich hybrid (obr. 13).

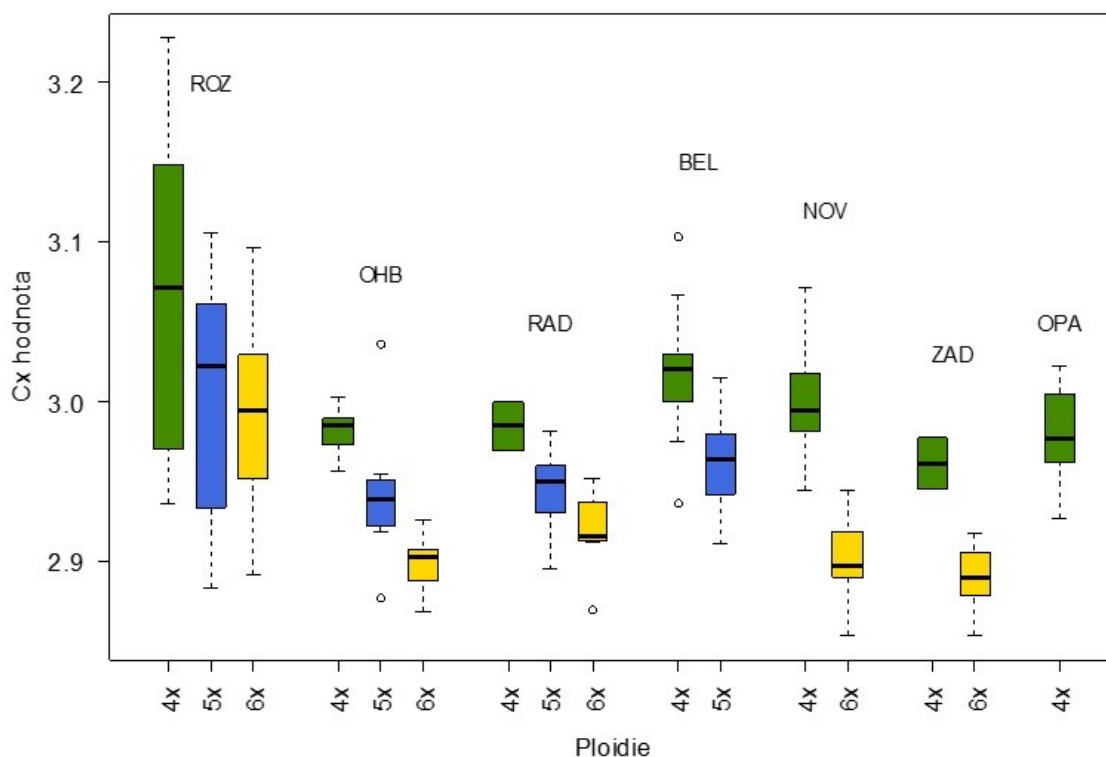


Obr. 13: C_x -hodnota u jednotlivých cytotypů sporofytů P generace. Na ose x jsou jednotlivé ploidie sporofytů P generace. Na ose y je C_x -hodnota (monoploidní velikost genomu, viz text). Černá úsečka – medián, hranice boxplotu – první (Q1) a třetí (Q3) kvartil, dolní úsečka – minimum, horní úsečka – maximum, prázdná kolečka – odlehlé hodnoty.

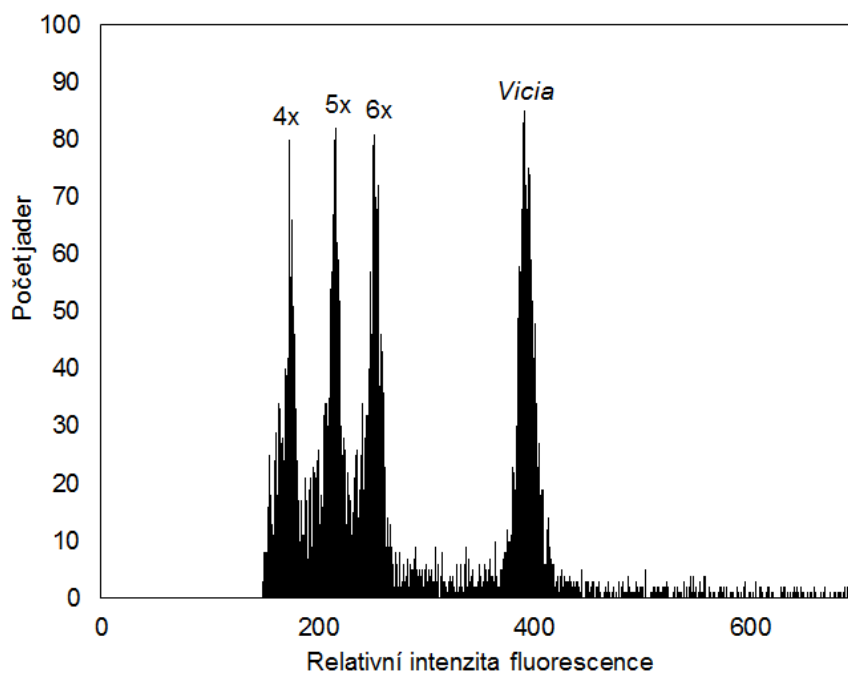
Pokud se podíváme detailněji na hodnoty u jednotlivých modelových populacích (obr. 14), pak si můžeme povšimnout vyšší C_x -hodnoty u tetraploidů (průměr 3,06; ANOVA, $p=5,81 \times 10^{-8}$), pentaploidů (průměr 3,02; ANOVA, $p=5,48 \times 10^{-7}$) a hexaploidů (průměr 2,96; ANOVA, $p=2,06 \times 10^{-9}$) z Roztok u Křivoklátku na rozdíl od ostatních populací.

Tab. 6: Relativní velikost genomu u sporofytů P generace. C_x-hodnota udává monoploidní velikost genomu.

Ploidie	Počet analyzovaných rostlin	Relativní velikost genomu (průměr)	Směrodatná odchylka	C _x -hodnota (průměr)	CV hodnota (průměr)
4x	185	12,09	0,275	3,02	2,62
5x	78	14,91	0,278	2,98	2,12
6x	102	17,47	0,255	2,91	2,08



Obr. 14: C_x-hodnota pro jednotlivé ploidie v modelových populacích. Na ose x jsou uvedené ploidie sporofytů P generace, na ose y je C_x-hodnota (monoploidní velikost genomu). ROZ – Roztoky u Křivoklátu, OHB – Oheb, RAD – Radzim, BEL – Bělá pod Pradědem, NOV – Nové Město nad Metují, ZAD – Zádle, OPA – Oparno. Černá úsečka – medián, hranice boxplotu – první (Q1) a třetí (Q3) kvartil, dolní úsečka – minimum, horní úsečka – maximum, prázdná kolečka – odlehlé hodnoty.



Obr. 15: Simultánní analýza sporofytů tří cytotypů. Na ose x je relativní intenzita fluorescence, na ose y je počet jader. 4x – tetraploid (CV = 1,99 %), 5x – pentaploid (CV = 1,65 %), 6x – hexaploid (CV = 1,68 %), *Vicia* – standard *Vicia faba* cv. 'Inovec', 2C = 26,9 pg (CV = 1,52 %). Hodnota variačního koeficientu (CV) odkazuje na přesnost cytometrické analýzy.

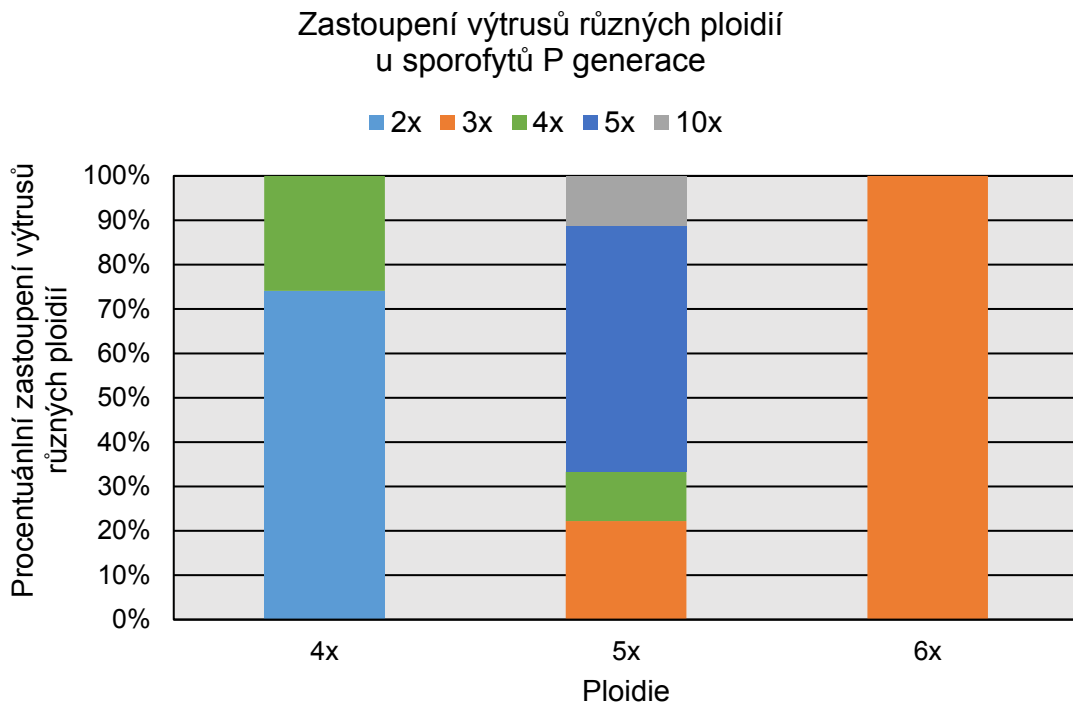
4.1.2. Výtrusy

Celkem byly zanalyzovány výtrusy ze 26 sporofytů P generace (14 tetraploidů, 10 pentaploidů a 2 hexaploidy). U tetraploidů ve velké míře převládaly diploidní výtrusy, ale u 7 analýz z 14 byl jasně patrný tetraploidní pík (obr. 17), který odpovídá neredukovaným tetraploidním výtrusům, což také potvrzují analyzované tetraploidní gametofyty (viz kapitola 4.1.3). Možnost přítomnosti G2 fáze (která by odpovídala tetraploidním výtrusům) a kontaminace sporofytickým pletivem byla vyloučena, protože u zbylých analýz (např. hexaploidů) nebyl přítomen pík o dvojnásobné velikosti. Hexaploidy vytvářejí pouze triploidní výtrusy. U pentaploidů byly potvrzeny neredukované pentaploidní výtrusy (obr. 16). Dále se ukázaly nižší ploidní úrovně – triploidní a u jedné analýzy byly v blízkosti standardu pravděpodobně dekaploidní výtrusy (obr. 18).

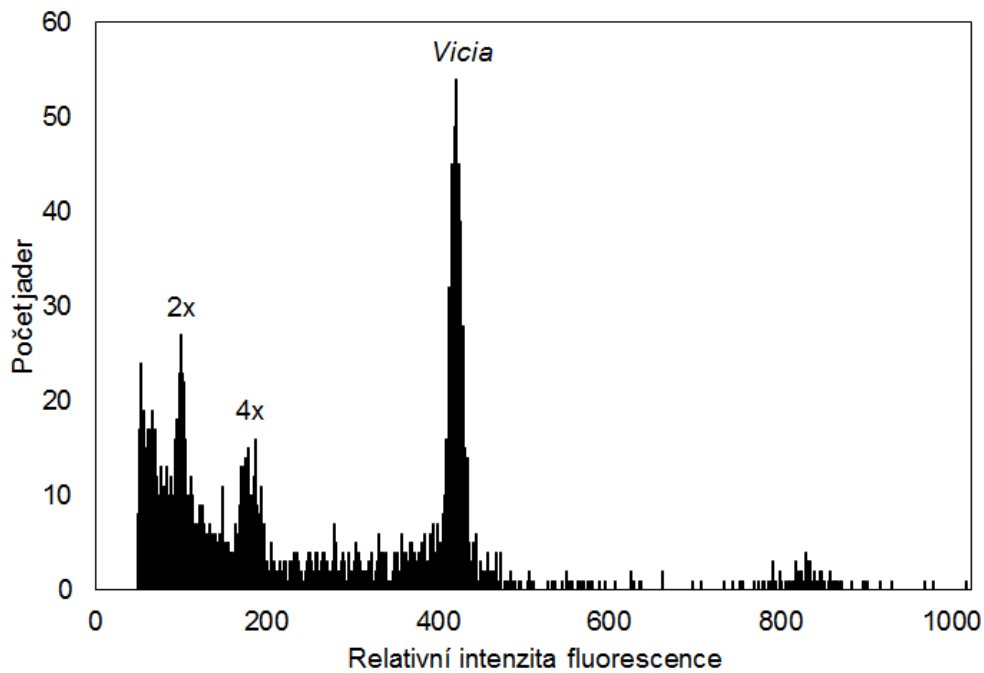
Tato skutečnost byla dále ověřena následnou analýzou s jiným standardem (*Pisum sativum* cv. 'Ctirad', 2C = 9,09 pg, Doležel et al., 2007), který se nekryje s vyššími ploidními (oktoploidy a vyšší). Z této separátní analýzy byly potvrzeny pentaploidní výtrusy, ovšem ke spolehlivému ověření přítomnosti dekaploidních (případně

oktoploidních) výtrusů nedošlo, zejména kvůli nízké kvalitě analýz (průměrná CV hodnota separátní analýzy s jiným standardem – 3,78 %).

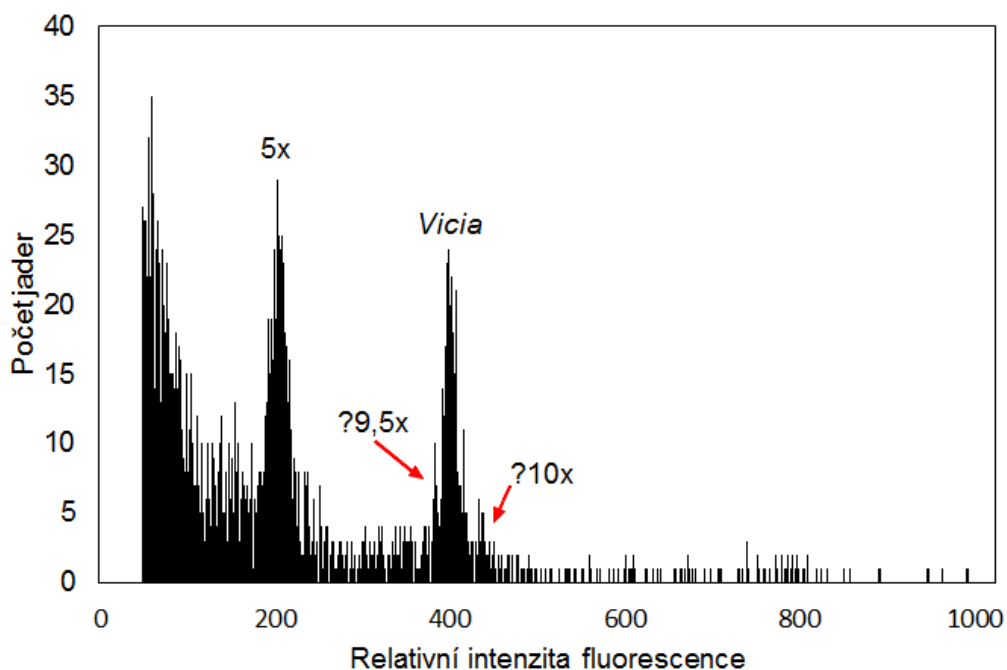
Kvalita analýz, zejména pentaploidů, byla výrazně horší, a to zřejmě díky výtrusům s nevyrovnaným počtem chromozomů, které jsou neživotaschopné a ve výsledném histogramu se projevily jako šum. Průměrná CV hodnota vzorků byla 3,31 % a standardu 1,16 %.



Obr. 16: Zastoupení výtrusů různých ploidií u jednotlivých sporofytů P generace. Na ose x je uvedena ploidie sporofytu P generace, na ose y je procentuální zastoupení výtrusů různých ploidií. Výsledky jsou obdobné jako u analýzy gametofytů (kapitola 4.1.3). U tetraploidního sporofytu je však větší procento tetraploidních výtrusů, u pentaploidního sporofytu nejsou zaznamenány diploidní výtrusy, ale naopak výtrusy o dvojnásobku pentaploidu (DNA dekaploid), což by mohlo odkazovat na čtvrtý typ sporogeneze Döpp-Mantonové (kapitola 2.1.3).



Obr. 17: Histogram analýzy výtrusů tetraploidní rostliny 23 z Bělé pod Pradědem. Na ose x je relativní intenzita fluorescence, na ose y je počet analyzovaných jader. 2x – DNA diploid (CV = 3,07 %), 4x – DNA tetraploid (CV = 3,42 %), *Vicia* – standard *Vicia faba* cv. 'Inovec' (CV = 0,93 %).



Obr. 18: Histogram analýzy výtrusů pentaploidní rostliny 210 z Bělé pod Pradědem. Na ose x je relativní intenzita fluorescence, na ose y je počet analyzovaných jader. 5x – DNA pentaploid (CV = 2,28 %), ?9,5x – pík odpovídající 9,5x výtrusům, ?10x – pík odpovídající dekaploidním výtrusům, *Vicia* – standard *Vicia faba* cv. 'Inovec' (CV = 0,86 %).

4.1.3. Gametofyty

Celkem bylo zanalyzováno 1703 gametofytů (1364 gametofytů od tetraploidního sporofytu, 96 gametofytů od pentaploidního sporofytu a 243 gametofytů od hexaploidního sporofytu). K výsevu výtrusů bylo použito 99 sporofytů P generace (4x – 55 jedinců, 5x – 36 jedinců, 6x – 8 jedinců). U gametofytů nebyly počítány chromozomy, proto v následujícím textu patří označení ploidie (2x, 3x, 4x, 5x apod.) vždy termínu DNA ploidie (tedy bez kalibrace chromozomovými počty).

Variační koeficienty vzorků nepřesahovaly hodnotu 4,11 % (průměr 3,6 %) a standardu 2,13 % (průměr 1,71 %). Výtrusy hexaploidního cytotypu nebyly vysévány ve stejné míře jako u tetraploidního a pentaploidního cytotypu, protože pilotní výsledky nenaznačovaly variabilitu v potomstvu. Hexaploidní cytotyp produkuje pouze triploidní výtrusy, které dávají vzniknout triploidnímu gametofytu a hexaploidnímu sporofytu F₁ generace (viz kapitola 4.1.4). Výtrusy pentaploidního cytotypu se vyznačovaly velmi nízkou klíčivostí v gametofyty, což kromě malého počtu zanalyzovaných gametofytů naznačují i výsledky procenta neživotaschopných výtrusů v kapitole 4.2.1.

Tab. 7: Relativní velikost genomu u gametofytů získaných z experimentální kultivace.

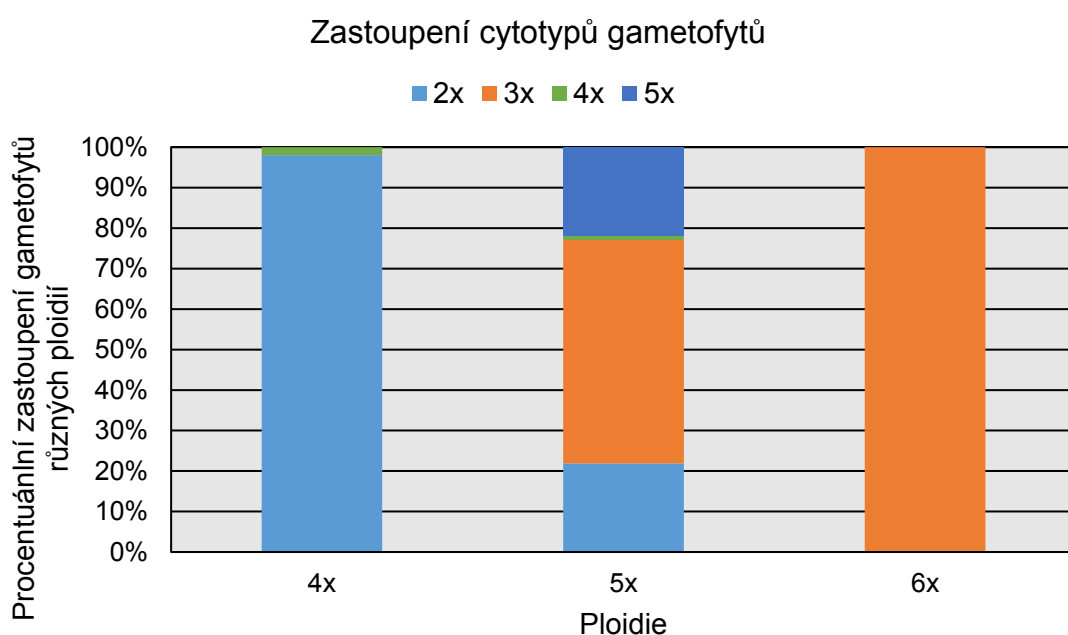
C_x-hodnota udává monoploidní velikost genomu.

Ploidie sporofyt	Ploidie gametofy	Počet analyzovaných gametofytů	Relativní velikost genomu (průměr)	Směrodatná odchylka	C _x -hodnota (průměr)	CV hodnota (průměr)
4x	2x	1337	5,83	0,1304	2,91	3,67
	4x	27	11,66	0,2040	2,91	1,82
5x	2x	21	5,84	0,1804	2,92	3,36
	3x	53	8,66	0,1479	2,88	2,89
	5x	20	14,25	0,3957	2,85	2,26
6x	3x	243	8,54	0,1625	2,84	3,89

Úplně poprvé byla také změřena relativní velikost genomu (DNA ploidie) u gametofytů *Cystopteris fragilis*, vypočtena C_x-hodnota (monoploidní velikost genomu) a tyto výsledky jsou uvedeny v tab. 7. Na obr. 21. si můžeme povšimnout vyšší průměrné C_x-hodnoty v porovnání diploidní gametofyt od tetraploidu (průměr 2,91) a pentaploidu (průměr 2,92), stejně tak triploidu od hexaploidu (průměr 2,84) a pentaploidu (průměr 2,88). Zatímco u diploidních gametofytů nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl (ANOVA, p=0,6043), u triploidních gametofytů už statisticky průkazný je (ANOVA, p=1,063×10⁻⁹). Pokud se C_x hodnota gametofytů rozdělí podle jednotlivých

populací, pak je stále statisticky významný rozdíl mezi populací Roztoky u Křivoklátu a ostatními modelovými populacemi (ANOVA, $p=2,845 \times 10^{-10}$) jako je tomu u sporofytů P generace (viz kapitola 4.1.1). U obou grafů (obr. 21 a obr. 22) se ukazuje trend, že tetraploidní gametofyt od tetraploidního sporofytu P generace (vznik přes neredukovaný výtrus) má stejný průměr monoploidní velikosti genomu (2,91) jako diploidní gametofyt (2,91; ANOVA, $p=0,9834$).

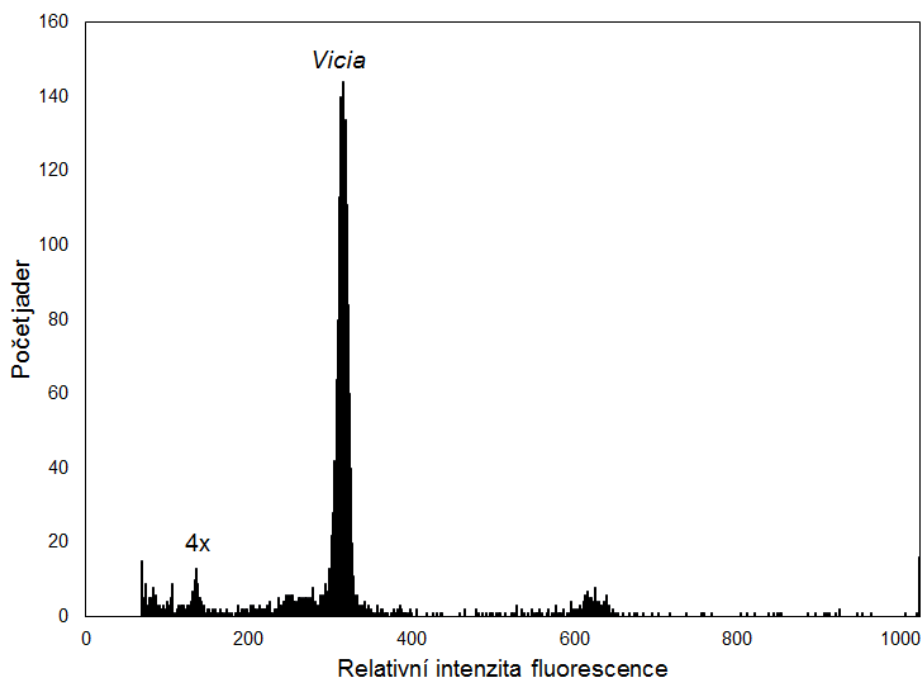
Tetraploidní cytotyp vytváří dva typy výtrusů, které klíčí v životaschopné gametofyty. Zcela majoritní zastoupení mají diploidní gametofyty (98,02 %). Velmi vzácně jsou zachycené i tetraploidní gametofyty (1,97 %, obr. 20).



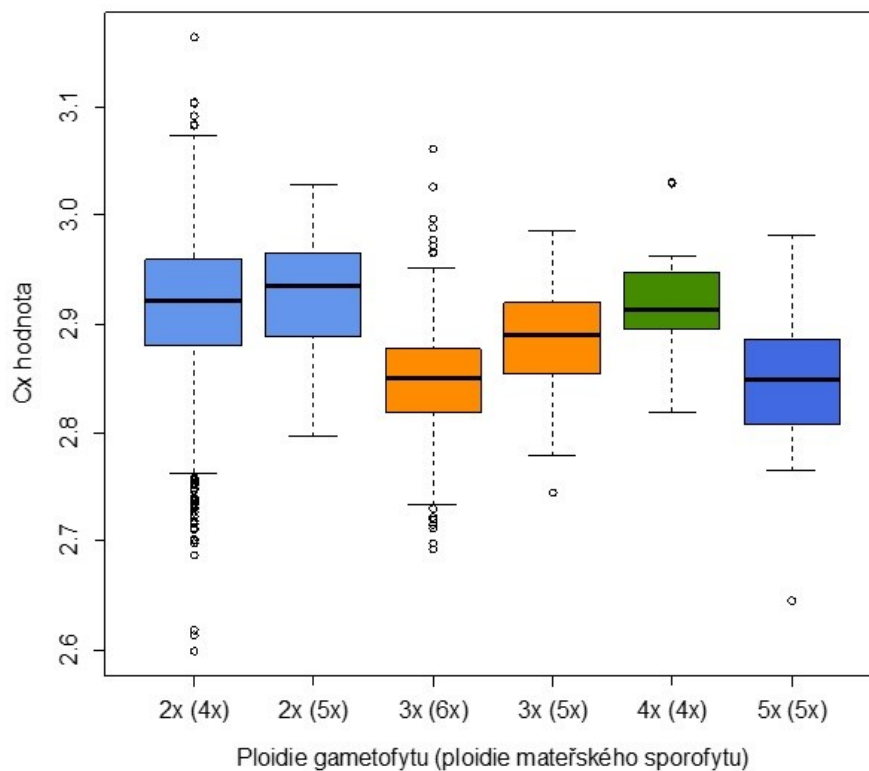
Obr. 19: Zastoupení cytotypů gametofytů u jednotlivých ploidii sporofytů P generace. Na ose x jsou uvedeny jednotlivé ploidie mateřského sporofytu P generace, na ose y je procentuální zastoupení gametofytů různých ploidii. Tetraploidní sporofyt vytváří diploidní a tetraploidní gametofyty, pentaploidní sporofyt má variabilní sporogenezi a hexaploidní sporofyt vytváří pouze triploidní gametofyty.

Ze selektivního výsevu výtrusů od tetraploidního sporofytu P generace vyklíčily v obou frakcích (tj. menší jak $50 \mu\text{m}$ a větší jak $50 \mu\text{m}$) pouze diploidní gametofyty (celkem: 66 gametofytů). Avšak u dvou analýz mohly být přítomny dva tetraploidní gametofyty, které byly zanalyzovány v simultánní analýze spolu se sporofytem F₁ generace (viz kapitola 4.1.4) a na grafu se projevují jako jeden tetraploidní pík. Tyto dva gametofyty a dva z nich vzniklé sporofyty pocházely z Petriho misky, kde byly vysety výtrusy větší jak $50 \mu\text{m}$.

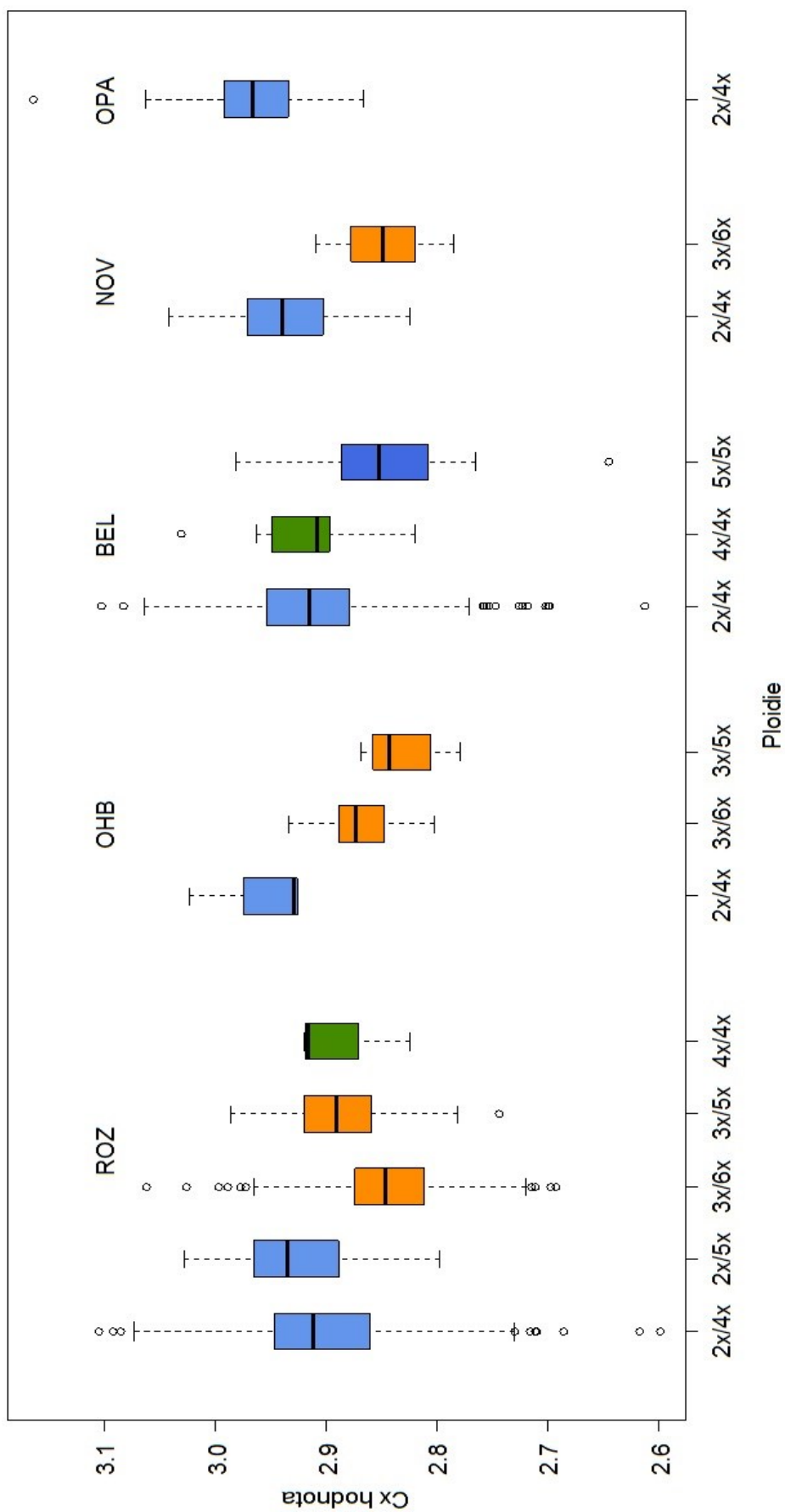
Velmi variabilní potomstvo má pentaploidní cytotyp (obr. 19), u kterého byly podchyceny tyto ploidie: diploidy (21,87 %), triploidy (55,20 %), tetraploidy (2,08 %) a pentaploidy (20,83 %). Pokud porovnáme potomstvo mezi lokalitami, tak nalezneme rozdíly. V populaci Bělá pod Pradědem vytvářejí pentaploidy pouze pentaploidní gametofyty. V Roztokách u Křivokláta jsou pentaploidy téměř sterilní, až na pár životaschopných diploidních (16,36 %) a triploidních gametofytů (83,63 %) a jedné pentaploidní rostliny s nízkým aborčním indexem (kapitola 4.2.1), která produkuje triploidní gametofyty. Rostliny z Ohebu vytvářejí málo životaschopného potomstva, ale zato cytotypově velmi variabilní, např. u rostliny 522 byly potvrzeny tři různé ploidie v potomstvu (2x, 3x a 5x). Procentuální zastoupení ploidii v potomstvu pentaploidů z Ohebu je následující: 2x (47,05 %), 3x (41,17 %), 4x (5,88 %) a 5x (5,88 %).



Obr. 20: Histogram analýzy gametofytu tetraploidní rostliny 23 z Bělé pod Pradědem. Na ose x je relativní intenzita fluorescence, na ose y je počet analyzovaných jader. 4x – DNA tetraploid (CV = 1,49 %), *Vicia* – standard *Vicia faba* cv. 'Inovec' (CV = 1,07 %).



Obr. 21: C_x -hodnota u jednotlivých DNA ploidii gametofytů. Na ose x jsou uvedené DNA ploidie gametofytů (v závorce ploidie mateřského sporofytu P generace), na ose y je uvedená C_x -hodnota. Můžeme si povšimnout vyšší průměrné C_x -hodnoty v porovnání diploidní gametofyt od tetraploidu (průměr 2,91) a pentaploidu (průměr 2,92), stejně tak triploidu od hexaploidu (průměr 2,84) a pentaploidu (průměr 2,88). Zatímco u diploidních gametofytů nebyl nalezen průkazný rozdíl (ANOVA, $p=0,6043$), u triploidních gametofytů už průkazný je (ANOVA, $p=1,063 \times 10^{-9}$).



Obr. 22: C_x -hodnota gametofytů u jednotlivých modelových populací. Na ose x jsou uvedené jednotlivé ploidie gametofytů, za lomítkem je uvedena ploidie sporofytu P generace, ze kterého gametofyt vzniknul. Na ose y je C_x -hodnota (monoploidní velikost genomu). Zkratky jednotlivých populací: ROZ – Roztoky u Křivokláta, OHB – Oheb, BEL – Bělá pod Pradědem, NOV – Nové Město nad Metují, OPA – Oparno. Z populace Oheb nebyl do grafu zahrnut diploidní a pentaploidní gametofyt, protože se jednalo jen o pár jedinců.

4.1.4. Sporofyty F₁ generace

V případě přítomnosti nově vznikajícího sporofytu (označen jako sporofyt F₁ generace) byl společně zanalyzován s gametofytem v simultánní analýze pro potvrzení reprodukční strategie. Sporofyty vzniklé při experimentální hybridizaci jsou hodnoceny v samostatné kapitole 4.3.

Zanalyzováno bylo 292 sporofytů F₁ generace (tab. 8). Průměrná CV hodnota vzorků byla 2,08 % a standardu 1,32 %. Triploidní gametofyty daly díky gametofytickému samooplození vzniknout hexaploidnímu sporofytu, diploidní gametofyty pak tetraploidnímu sporofytu. Ač byly všechny gametofyty pěstovány v co nejideálnějších podmínkách (zejména dostatečná vlhkost, viz kapitola 3.3), u 12,32 % případu se objevila fakultativní apomixie, tedy případ toho, kdy normálně pohlavně se rozmnožující gametofyt dá vzniknout novému sporofytu bez předchozího splynutí spermatozoidu s vaječnou buňkou (tj. haploidní partenogeneze v terminologii užívané u krytosemenných rostlin, Cruden and Lloyd, 1995). Takto vzniklý sporofyt má stejnou ploidii jako gametofyt, v případě diploidního gametofytu je to diploidní sporofyt. Sporofyty vzniklé fakultativní apomixií byly ve většině případů malé a brzy začaly žloutnout a odumírat. U triploidních gametofytů nebyla fakultativní apomixie zaznamenána.

Tab. 8: Sporofyty F₁ generace vzniklé z jednotlivých gametofytů. „?“ – k těmto reprodukčním způsobům nejsou k dispozici data. Pohlavní rozmnožování zde ve všech případech znamená gametofytické samooplození (*intragametophytic selfing*), tj. oplození v rámci jednoho gametofytu.

Sporofyt P	Gametofyt	Sporofyt F ₁	Počet analýz	Reprodukční způsob
4x	2x	2x	36	Fakultativní apomixie
	2x	4x	205	Pohlavní rozmnožování
	4x	4x	17	Obligátní apomixie
5x	2x	? (4x)	0	?
	3x	6x	7	Pohlavní rozmnožování
	4x	?	0	?
	5x	? (5x)	0	Obligátní apomixie
6x	3x	6x	27	Pohlavní rozmnožování

Při simultánní analýze gametofytu a sporofytu F₁ generace od tetraploidního sporofytu byl v 17 případech zaznamenán pouze jeden tetraploidní pík. Stejně tak při selektivním výsevu výtrusů (metodika viz kapitola 3.3) byl při simultánní analýze

gametofytu a sporofytu F_1 generace přítomen u dvou analýz jeden tetraploidní pík (z celkového počtu 32 analýz sporofytů F_1 generace). Mohlo by se jednat o tetraploidní gametofyty, které dají obligátní apomixií vzniknout tetraploidnímu sporofytu.

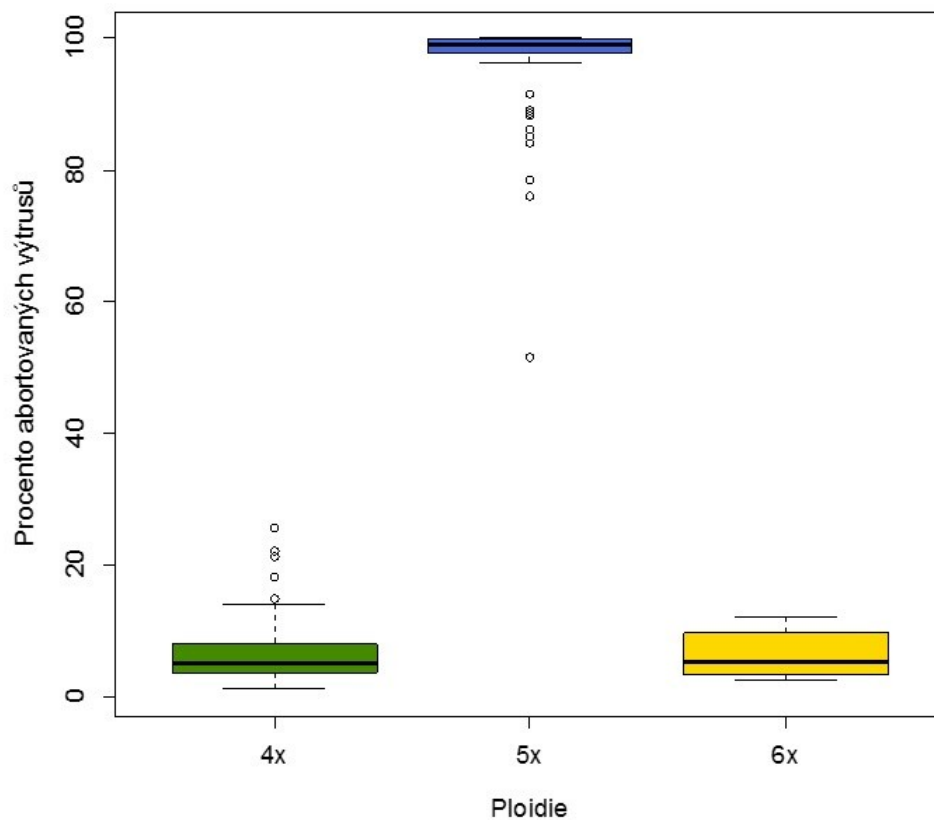
Od pentaploidního gametofytu se nepodařilo získat sporofyt F_1 generace, ač byl u některých gametofytů při pilotní studii pozorován pentaploidní sporofyt (Ekrt, pers. comm.).

4.2. Mikroskopické zhodnocení výtrusů

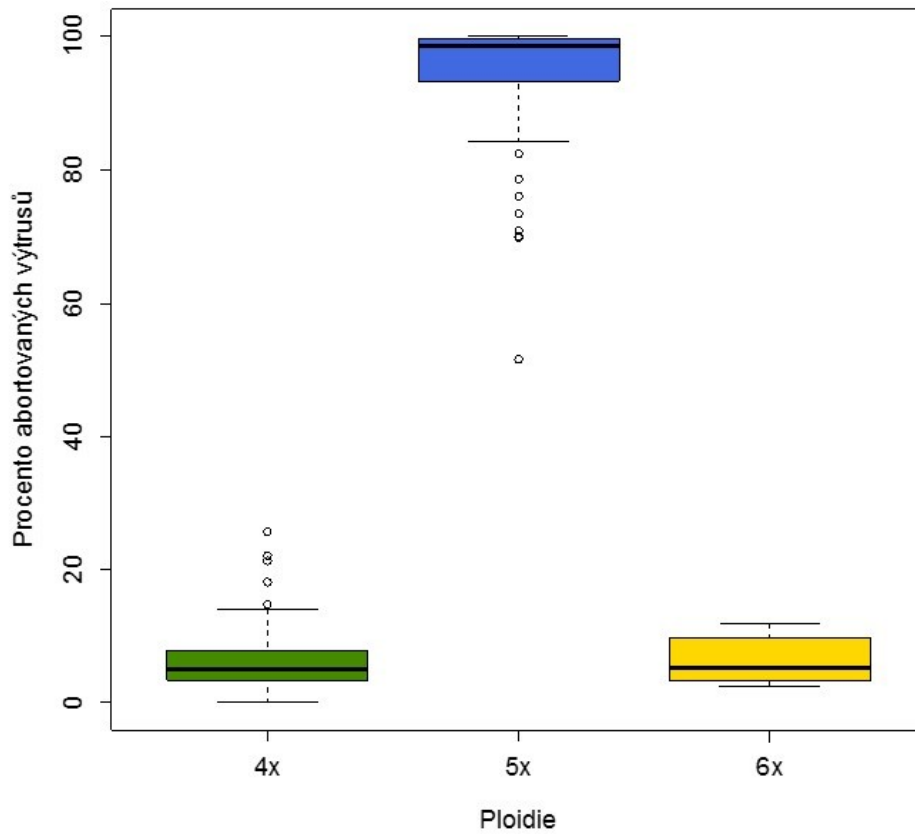
4.2.1. Viabilita výtrusů

Viabilita (životaschopnost) výtrusů byla hodnocena u 111 rostlin (36 tetraploidů, 60 pentaploidů a 15 hexaploidů). Nízké procento abortovaných (neživotaschopných) výtrusů vykazovaly tetraploidy (průměr 7,26 %, obr. 27) a hexaploidy (průměr 6,29 %, obr. 28). Naopak pentaploidy vykazovaly vysoké procento neživotaschopných výtrusů (v průměru 96,20 %, obr. 23). Tento dataset z modelových populací byl dále obohacen o všechny pentaploidy (celkem 12 jedinců) z předchozí cytogeografické studie (Hanušová *et al.*, in prep., viz obr. 24 a příloha 1). Průměr abortovaných výtrusů klesl z 96,20 % na 94,34 % v porovnání se základním datovým souborem (obr. 23).

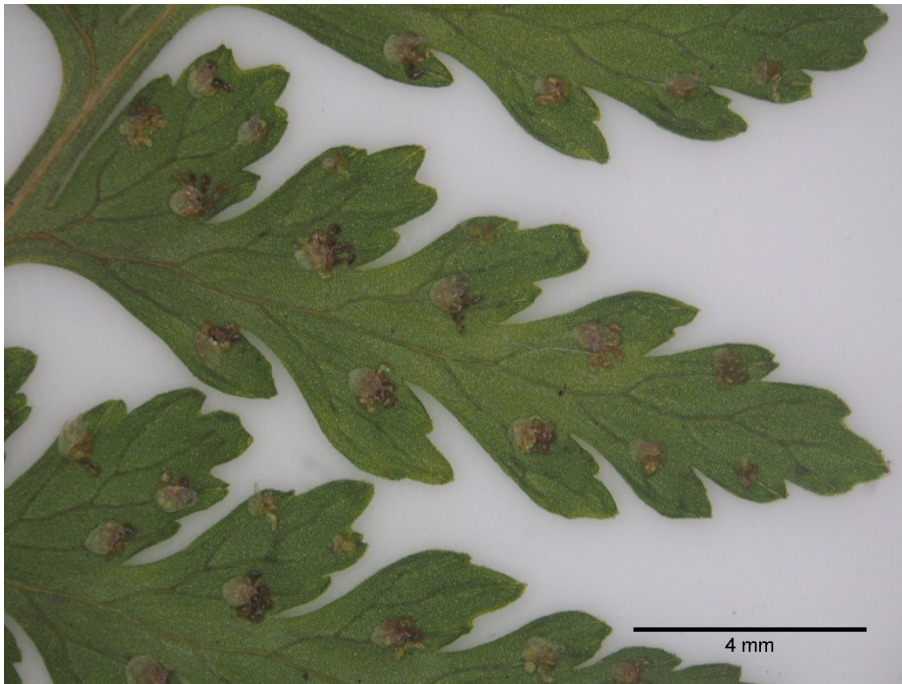
Dále byly hodnoceny populace odděleně (obr. 29). Téměř kompletně neživotaschopné výtrusy měly populace z Radzimu (průměr 99,9 %) a z Ohebu (průměr 99,1 %). Na druhou stranu, částečnou fertilitu jedinců z Ohebu potvrzují vyklíčené gametofyty (viz kapitola 4.1.3). Nejvyšší viabilitu výtrusů mají rostliny z Bělé pod Pradědem (průměr 94,66 %), které ve velké míře produkují neredukované výtrusy (diplospory, viz kapitola 4.2.2). Tyto apomiktické rostliny z Bělé pod Pradědem mají vyvinutější výtrusnice (obr. 26) na rozdíl od téměř sterilních rostlin z Roztok u Křivoklátu (obr. 25). V populaci Roztoky u Křivoklátu byl zaznamenán pentaploidní jedinec s velmi vysokou fertilitou (51,6 % neživotaschopných výtrusů). V procentu abortovaných výtrusů nebyl mezi lokalitami nalezen rozdíl (ANOVA, 4x – $p=0,8363$; 5x – $p=0,429$; 6x – $p=0,645$). O schopnosti výtrusů klíčit v gametofyty svědčí i výsledky v kapitole 4.1.3.



Obr. 23: Procento abortovaných výtrusů jednotlivých cytotypů na základním datovém souboru (111 jedinců, každý jedinec 1000 výtrusů). Na ose x jsou ploidie sporofytů P generace, na ose y je procento abortovaných (neživotoschopných) výtrusů. Černá úsečka – medián, hranice boxplotu – první (Q1) a třetí (Q3) kvartil, dolní úsečka – minimum, horní úsečka – maximum, prázdná kolečka – odlehlé hodnoty.



Obr. 24: Procento abortovaných výtrusů jednotlivých cytotypů na rozšířeném datovém souboru (123 jedinců, každý jedinec 1000 výtrusů). Na ose x jsou ploidie sporofytů P generace, na ose y je procento abortovaných (neživotascopných) výtrusů. Černá úsečka – medián, hranice boxplotu – první (Q1) a třetí (Q3) kvartil, dolní úsečka – minimum, horní úsečka – maximum, prázdná kolečka – odlehlé hodnoty.



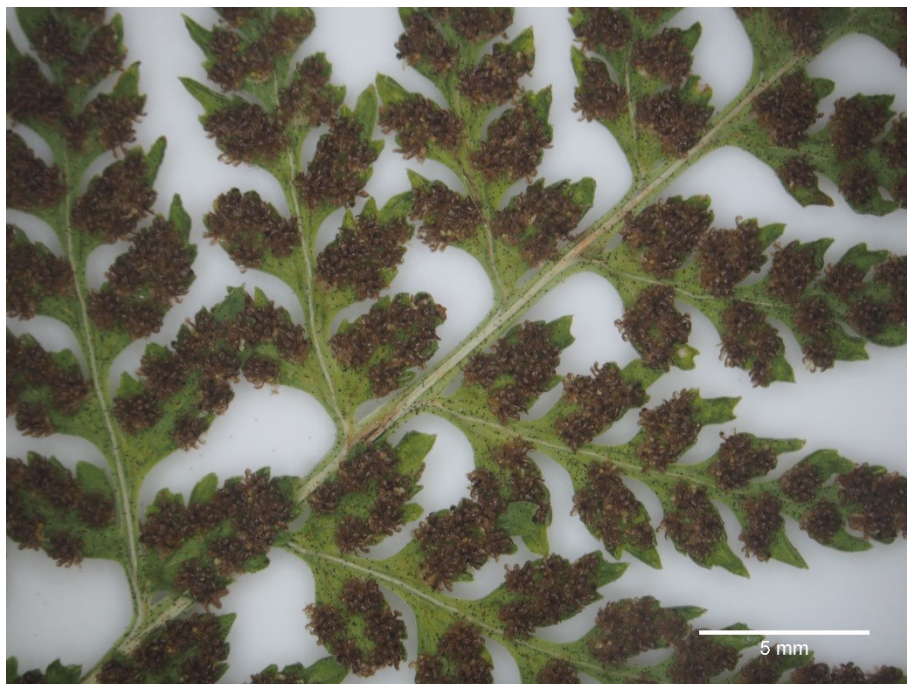
Obr. 25: Pohled na spodní stranu trofosporofylu pentaploidní rostliny z Roztok u Křivoklátu. Kupky výtrusnic a samotné výtrusnice jsou malé, špatně vyvinuté, tato rostlina má aborční index blížící se 100 %.



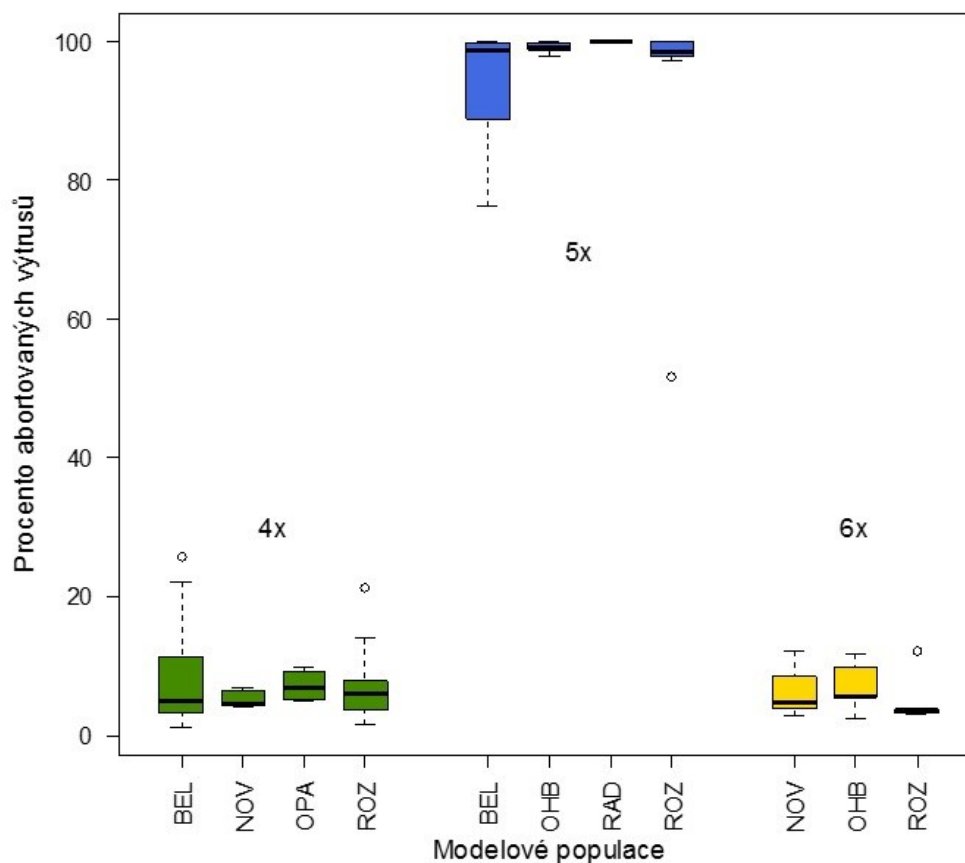
Obr. 26: Kupky výtrusnic a výtrusnice u apomiktické pentaploidní rostliny z Bělé pod Pradědem. V porovnání s obr. 25 je patrné, že apomiktický puchýřník má vyvinutější výtrusnice, které vytvářejí neredukované výtrusy.



Obr. 27: Kupky výtrusnic a výtrusnice u tetraploidní rostliny.



Obr. 28: Spodní strana listu s výtrusnicemi u hexaploidu. Ty jsou větší než u tetraploidu, protože i z měření velikosti výtrusů (kapitola 4.2.2) mají hexaploidy o něco větší velikost výtrusů než tetraploidy.

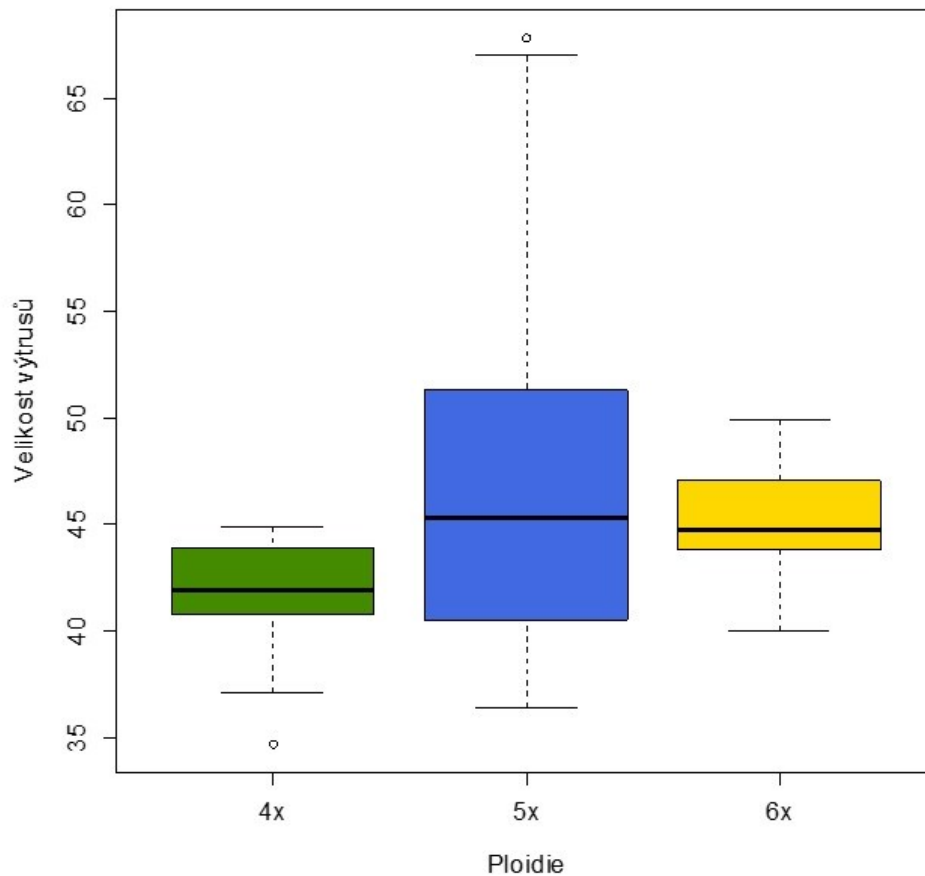


Obr. 29: Procento abortovaných výtrusů sporofytů P generace v modelových populacích. Na ose x jsou jednotlivé populace: ROZ – Roztoky u Křivoklátu, OHB – Oheb, RAD – Radzim, BEL – Bělá pod Pradědem, NOV – Nové Město nad Metují, ZAD – Zádíel, OPA – Oparno, na ose y je procento abortovaných výtrusů V grafu jsou uvedeny ploidie (4x – tetraploid, 5x – pentaploid, 6x – hexaploid) sporofytů P generace. Černá úsečka – medián, hranice boxplotu – první (Q1) a třetí (Q3) kvartil, dolní úsečka – minimum, horní úsečka – maximum, prázdná kolečka – odlehlé hodnoty.

4.2.2. Velikost výtrusů

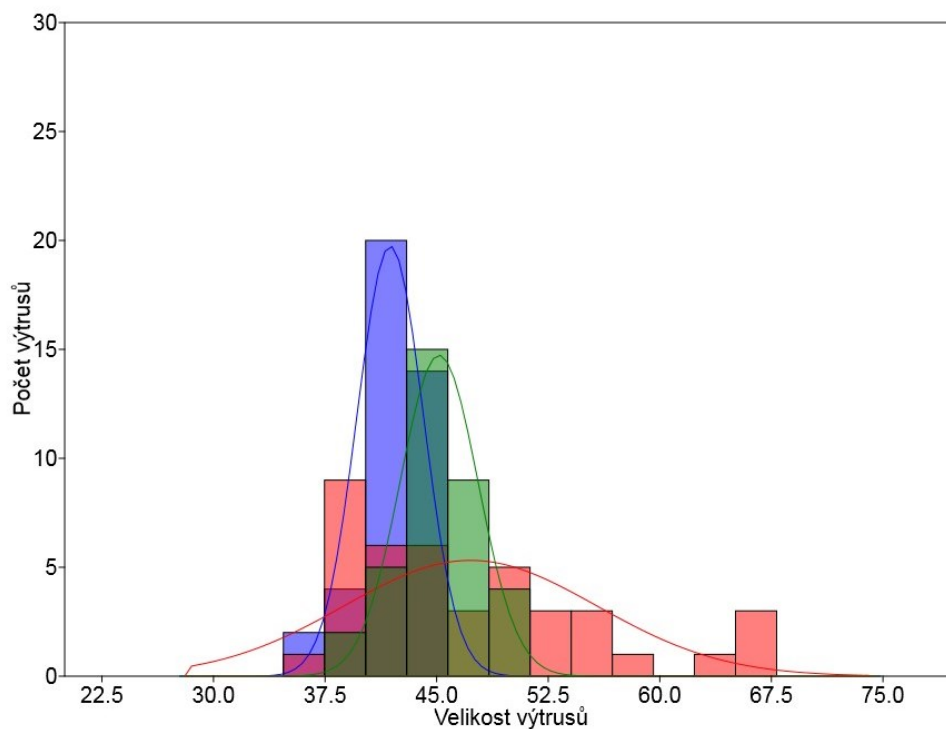
Velikost výtrusů byla měřena na vzorku 116 rostlin. U každé rostliny byl změřeno 20 výtrusů a z tohoto počtu byl vypočítán průměr, který byl zahrnut do celkové analýzy. Kromě rostlin z modelových populací byly použity rostliny z cytogeografické studie (Hanušová *et al.*, in prep.) jejichž seznam je v příloze 1. Průměrná velikost výtrusů je u tetraploidů 41,88 μm , pentaploidů 47,27 μm a hexaploidů 45,16 μm (obr. 32). Větší velikost výtrusů pentaploidů je způsobená produkcí diplospor, které mají větší velikost než výtrusy hexaploidů. Maximální naměřená průměrná hodnota u pentaploidů je 67,85 μm . Ač nám statistické porovnání průměrů říká, že se liší (ANOVA, $p=8,76 \times 10^{-5}$), výsledné boxploty (obr. 30) a histogramy (obr. 31) ukazují na variabilní velikost u všech

tří cytotypů se značnými překryvy velikostí. Při korelaci velikosti výtrusů a relativní velikosti genomu (Pearsonův korelační koeficient) vychází korelační koeficient 0,03051, což naznačuje, že se jedná o dvě nezávislé veličiny.



Obr. 30: Průměrná velikost výtrusů jednotlivých cytotypů sporofytů P generace. Na ose x jsou uvedené ploidie sporofytu P generace, na ose y je velikost výtrusů v μm . Černá úsečka – medián, hranice boxplotu – první (Q1) a třetí (Q3) kvartil, dolní úsečka – minimum, horní úsečka – maximum, prázdná kolečka – odlehlé hodnoty.

Pokud se podíváme na jednotlivá měření výtrusů, pak nalezneme mnohem širší rozpětí, zejména u pentaploidů, kde největší naměřená hodnota byla $99,02 \mu\text{m}$. U tetraploidů se nám měřením velikostí nepovedlo prokázat, že jsou přítomny neredukované tetraploidní výtrusy, ač by nám k tomu mohla naznačovat jednotlivá měření (maximum u tetraploidů bylo $63,72 \mu\text{m}$) a přímé pozorování pod mikroskopem, kdy některé výtrusy vykazovaly znaky typické pro neredukované výtrusy (obr. 33), zde zejména kulovitý nebo elipsovité tvar (Wagner *et al.*, 1986). Hlavním znakem je však jejich větší velikost, kterou pozorujeme u pentaploidů (viz obr. 34).



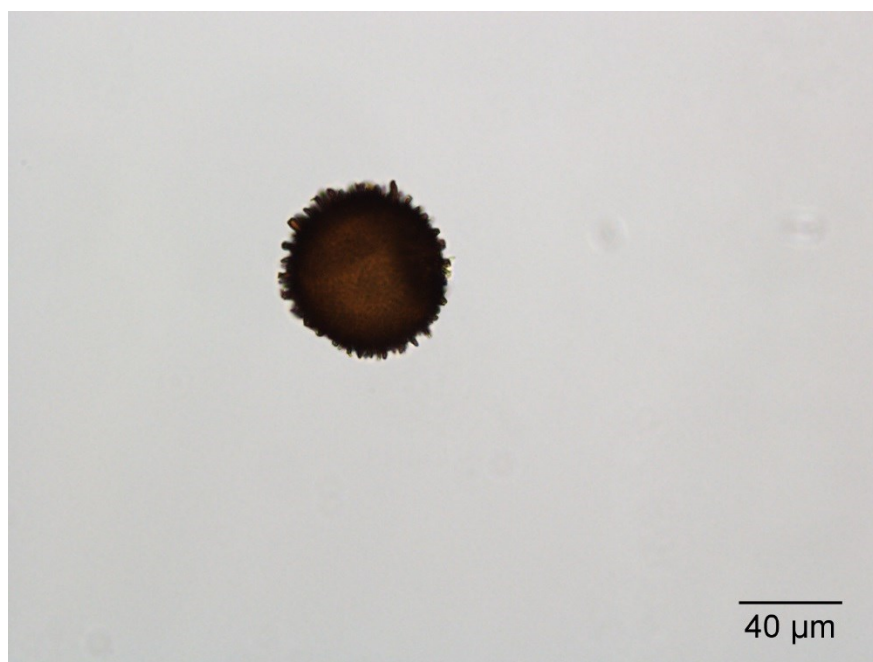
Obr. 31: Distribuce velikosti výtrusů. Na ose x je velikost výtrusů (v μm), na ose y je počet (frekvence) výtrusů. Na histogram je namapována pravděpodobnostní distribuce. Modrou barvou jsou zde znázorněny tetraploidy, červenou pentaploidy a zelenou hexaploidy (ploidy se týkají sporofytů P generace). Na grafu pozorujeme vzájemný překryv velikostí u tetraploidů a hexaploidů a velmi variabilní velikost u pentaploidů, stejně jako neredukované výtrusy v pravé části grafu (od 52,8 do 67,5 μm).



Obr. 32: Velikost výtrusů u jednotlivých cytotypů. A – tetraploid (42,25 μm), B – pentaploid (66,99 μm), C – hexaploid (49,04 μm).



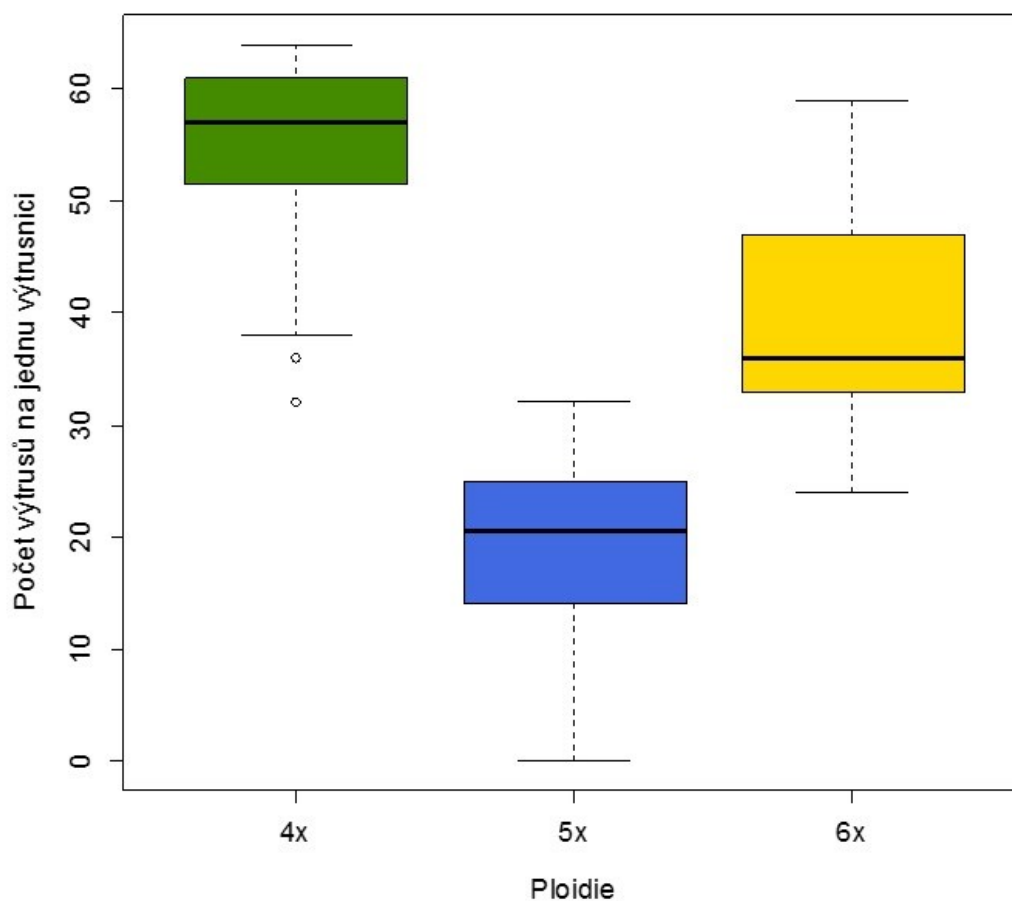
Obr. 33: Fotografie výtrusů tetraploidní rostliny 1S2-7 (Roztoky u Křivoklátku) z optického mikroskopu. 1 – pravděpodobné diploidní výtrusy (a – 41,20 μm, b – 41,24 μm), 2 – tvarově pravděpodobné diplospory (c – 40,67 μm, d – 33,04 μm), ač jsou velikostně menší než výtrusy označené „a“ a „b“, tvarem se podobají neredukovaným výtrusům u pentaploidů (viz obr. 34).



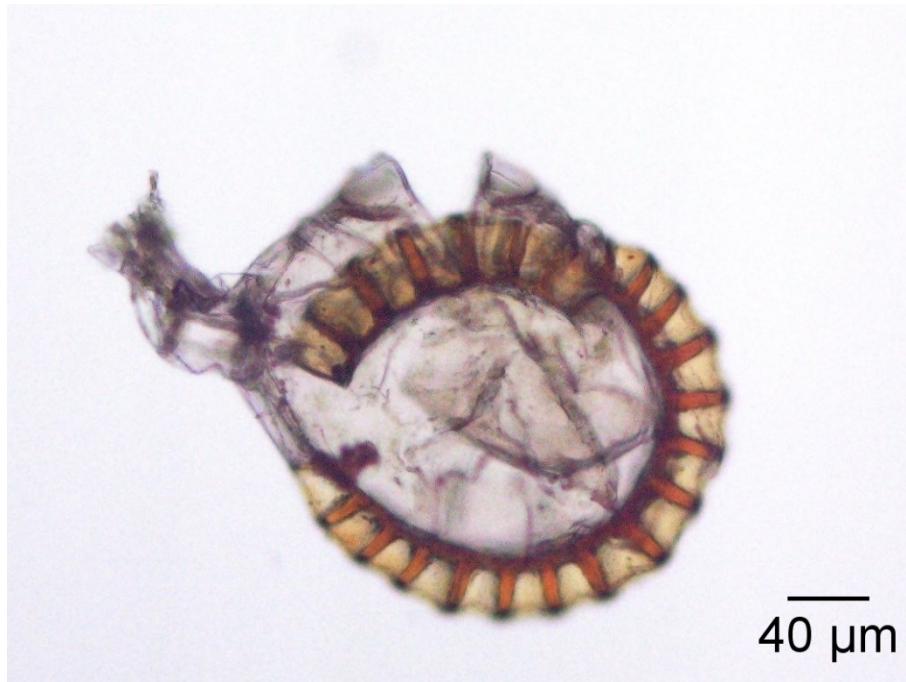
Obr. 34: Pravděpodobná diplospora pentaploidní rostliny o velikosti 60,63 μm.

4.2.3. Počet výtrusů na jednu výtrusnici

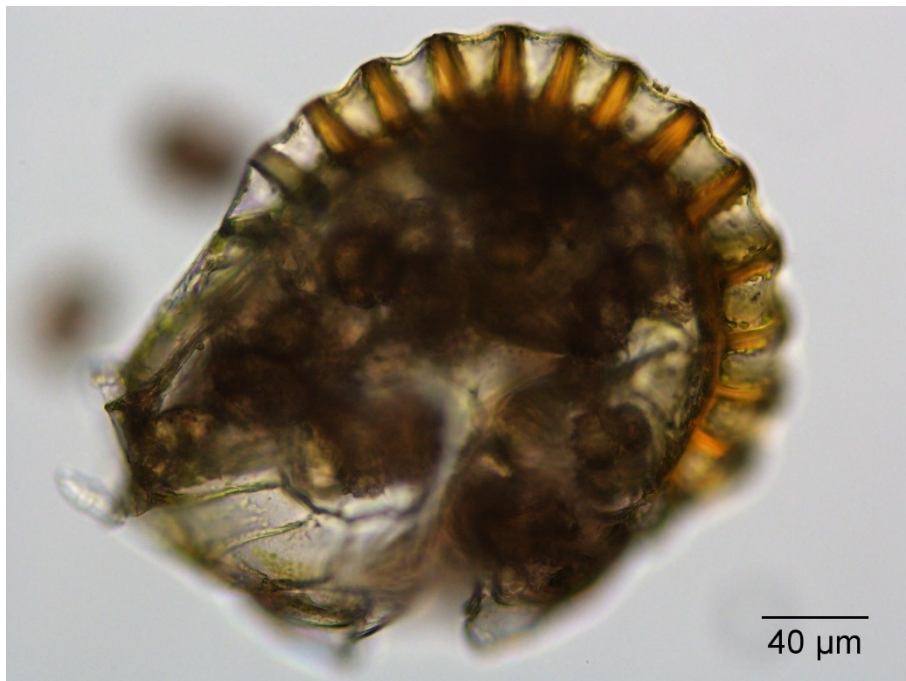
Celkem byl spočítán obsah 129 výtrusnic (obr. 37) od 20 rostlin (tetraploidů – 6 jedinců, pentaploidů – 12 jedinců, hexaploidů – 2 jedinci). Průměrný počet výtrusů na jednu výtrusnici byl 55 u tetraploidů, 19 u pentaploidů a 40 u hexaploidů. Celkový počet u tetraploidů a hexaploidů se blížil teoretickým předpokladům o 64 výtrusech na jednu výtrusnici, u pentaploidů byl počet výrazně nižší než 32 (teoretický počet pro apomiktické taxony, viz kapitola 2.1.3 a obr. 35). Dále byla u pentaploidů pozorována variabilní velikost výtrusů a samozřejmě i velké procento abortovaných výtrusů, jak již bylo ukázáno v kapitole 4.2.1. Příklady počtů u jednotlivých výtrusnic jsou uvedené v příloze 4. Některé výtrusnice byly u pentaploidů prázdné (obr. 36).



Obr. 35: Počet výtrusů na jednu výtrusnici u jednotlivých cytotypů. Na ose x jsou uvedené ploidie sporofytů P generace, na ose y je počet výtrusů na jednu výtrusnici. Černá úsečka – medián, hranice boxplotu – první (Q1) a třetí (Q3) kvartil, dolní úsečka – minimum, horní úsečka – maximum, prázdná kolečka – odlehle hodnoty.



Obr. 36: Prázdňá leptosporangiátní výtrusnice puchýřníku křehkého.

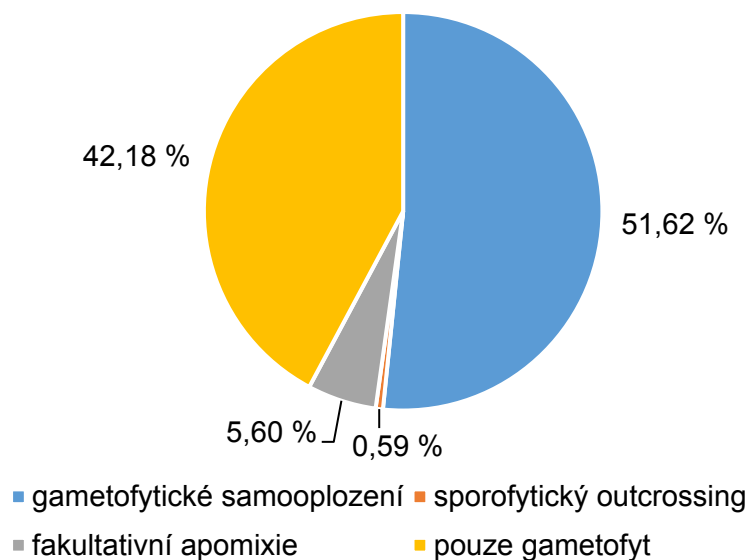


Obr. 37: Výtrusnice tetraploidní rostliny z Bělé pod Pradědem.

4.3. Experimentální hybridizace

Z experimentální hybridizace bylo celkem změřeno 196 sporofytů F₁ generace. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v grafu na obr. 38. Průměrná hodnota variačního koeficientu vzorků byla 2,53 % a standardu 1,53 %. V celých 42,18 % případech nevznikl sporofyt vůbec a životní cyklus byl zastaven ve fázi gametofytu (143 gametofytů), ačkoliv ostatní gametofyty na Petriho misce měly sporofyty vytvořené. Takto to bylo zejména u hybridizace provedené oddělováním archegonií a antheridií na gametofytu a gametofytů pěstovaných na umělém médiu (metodika viz kapitola 3.6). Takto hybridizované gametofyty nevytvořily sporofyty F₁ generace a postupně odumřely.

V 5,6 % případech opět došlo k fakultativní apomixii (haploidní partenogenezi v terminologii krytosemenných rostlin, Cruden and Lloyd, 1995), kdy nový sporofyt vznikl z pletiva gametofytu, ač u něj mohlo dojít k normální pohlavní reprodukci. Pouze u 2 sporofytů ze 196 (0,59 %) proběhl sporofytický outcrossing mezi diploidním a triploidním gametofytem za vzniku pentaploidního sporofytu. Ve zbytku případů (51,62 %) převažovalo gametofytické samooplození (oplození v rámci jednoho gametofytu), stejně tak jako u Petriho misek, které nebyly podrobeny experimentální hybridizaci (kapitola 4.1.4).



Obr. 38: Výšečový diagram znázorňující výsledky experimentální hybridizace gametofytů. Z grafu je jasně patrné, že převládá gametofytické samooplození, tj. oplození v rámci jednoho gametofytu. Naopak sporofytický outcrossing, křížení mezi dvěma gametofyty (v tomto případě různých ploidií), je vzácné a povedlo se pouze ve 2 případech ze 196.

5. Diskuze

Předkládaná diplomová práce navazuje svými výsledky na předchozí cytogeografickou (Hanušová et al., in prep.) a morfometrickou studii (Hanušová *et al.*, unpubl.) komplexu *Cystopteris fragilis*, se snahou o doplnění novými poznatky k utvoření uceleného díla shrnujícího probíhající mikroevoluční procesy u puchýřníku křehkého na území střední Evropy. Kombinace průtokové cytometrie všech generací životního cyklu kapradin (sporofyt P generace, výtrusy, gametofyt a sporofyt F₁ generace) a tradičních pteridologických biosystematických metod (např. zhodnocení životaschopnosti výtrusů) umožnila získat komplexní pohled na reprodukční strategii a mikroevoluční procesy probíhající zejména v ploidně smíšených populacích.

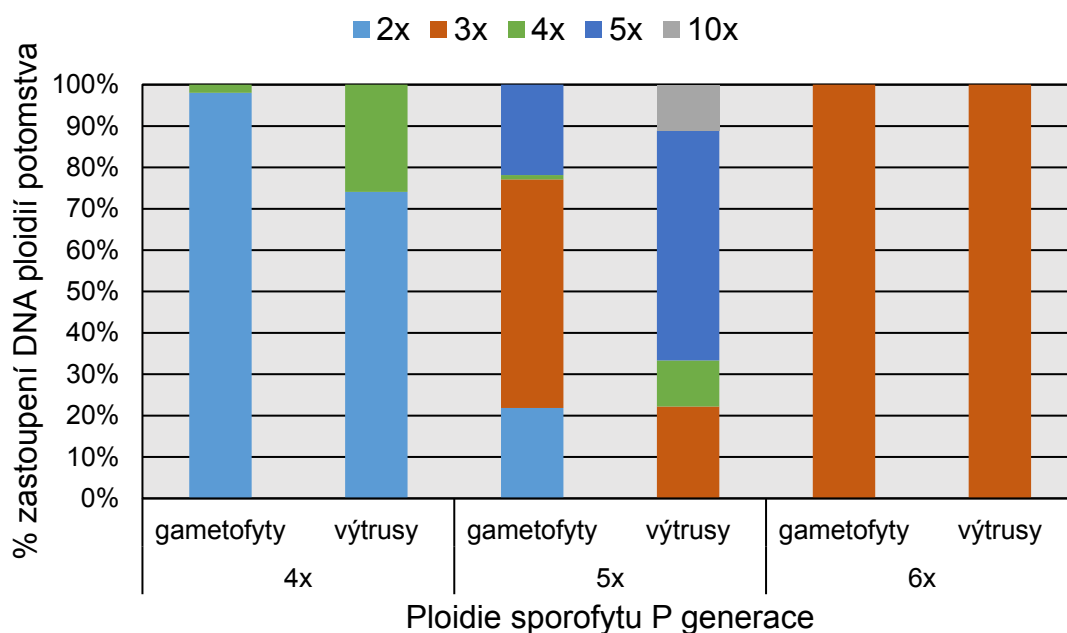
K celkovému zhodnocení byly využity úplně nové metody, které se doposud v biosystematice kapradin nevyužívaly nebo využívaly jen v omezené míře. Jedná se zejména o průtokovou cytometrii výtrusů, jejíž metodika byla pro detekci reprodukčních strategií publikována teprve před dvěma lety (Kuo *et al.*, 2016) a experimentální hybridizaci mezi gametofyty, která byla ve studiu mikroevolučních procesů využívána jen zřídka (Hickok *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 2006). Zejména heteroploidní hybridizace (tj. křížení mezi různými ploidiemi) nebyla až na výjimky doposud prováděna (Sleep, 2014). Pravděpodobným faktorem je zapojení průtokové cytometrie až v posledních 15 letech, která umožňuje velmi snadno a rychle detekovat ploidiu rostliny určené pro hybridizační experimenty (Doležel *et al.*, 2007). Do té doby se experimentální křížení provádělo zejména mezi blízce příbuznými druhy (Haufler & Ranker, 1985).

V průběhu vypracovávání této práce byl publikován článek zabývající se reprodukční strategií u *Cystopteris fragilis* na Mongolském Altaji (Kawakami *et al.*, 2016). Předkládaná diplomová práce má od výše uvedené studie mnohem větší počet modelových populací (jedna vs. sedm), analyzovaných vzorků (13 gametofytů vs. 96 gametofytů od pentaploidu, zanalyzované další ploidy) a širší spektrum užívaných biosystematických metod, které mohou poskytnout komplexní pohled na celou problematiku smíšených populací.

5.1. Reprodukční strategie puchýřníku křehkého

Reprodukční strategie byla u puchýřníku křehkého studována užitím průtokové cytometrie a porovnáním DNA ploidy mezi jednotlivými fázemi životního cyklu, zejména mezi sporofytem P generace a gametofytem (Ekrt & Koutecký, 2015) nebo

sporofytem P generace a výtrusy (Kuo *et al.*, 2016), často se však jednalo o kombinaci výše uvedených, společně s nově vznikajícím F₁ sporofytem. Tato metodika umožnila zanalyzovat velké množství gametofytů a detekovat i vzácné ploidie, což by při použití tradičních technik, jako je přímé pozorování gametangií spolu s vývojem nového sporofytu (Guo & Liu, 2013) a počítání chromozomů (Hernández *et al.*, 2015), bylo časově náročné a nemohlo by být uskutečněno v takové míře. Ovšem i průtoková cytometrie má své nevýhody, a to zejména u analýzy výtrusů, kdy je nemožné současně nahlédnout do následující generace, protože analýzou dojde k jejich usmrcení.



Obr. 39: Porovnání výsledků průtokové cytometrie mezi gametofyty a výtrusy u jednotlivých cytotypů sporofytů P generace (na ose x). Na ose y je procentuální zastoupení DNA ploidii potomstva (gametofyty nebo výtrusy) jednotlivých sporofytů. Výrazné rozdíly jsou vidět v zastoupení potomstva tetraploidního a pentaploidního sporofytu P generace. U tetraploidního sporofytu je větší zastoupení tetraploidních výtrusů než tetraploidních gametofytů, u pentaploidního sporofytu jsou přítomny i jiné ploidie (variabilní sporogeneze je viditelná v obou případech, více viz v textu níže).

Tetraploidní sporofyt P generace vytváří dva typy výtrusů, resp. gametofytů – nejběžnější diploidní a velmi vzácně i tetraploidní. Pokud porovnáme výsledky mezi analýzou výtrusů a analýzou gametofytů (viz obr. 39), pak nalezneme výrazný rozdíl v zastoupení neredukovaných výtrusů. Zatímco při analýze výtrusů bylo 25,92 % výtrusů neredukovaných, tak při analýze gametofytů to bylo pouze 1,97 % neredukovaných gametofytů. Je možné, že tetraploidní výtrusy jsou velmi málo životaschopné, a proto

jsou tetraploidní gametofyty vzácné. Prvnímu údaji by odpovídala skutečnost, že tetraploidy mohou tvořit 20-40 % neredukovaných výtrusů (Schneller & Krattinger, 2010). Navíc tato procenta u analýzy výtrusů ukazují pouze u kolika analýz byl přítomen tetraploidní pík odpovídající neredukovaným výtrusům, nikoliv reálné zastoupení tetraploidních a diploidních výtrusů, neboť v případě průtokové cytometrie výtrusů byly zanalyzovány stovky výtrusů najednou (Kuo *et al.*, 2016).

Následná simultánní analýza gametofytu a sporofytu F_1 generace ukázala v 19 případech jeden tetraploidní pík, což by mohlo znamenat rozmnožování pomocí obligátní apomixie nebo stresové podmínky v laboratorní kultuře, a tím pádem fakultativní apomixii (haploidní partenogenezi). Tak si opravdovým reprodukčním způsobem u tetraploidních gametofytů nemůžeme být jisti.

Ač je obligátní apomixie u kapradin vázána převážně na liché ploidní úrovni, může se vyskytovat i u tetraploidů. Příkladem může být tetraploidní hybrid rodu *Phegopteris* (bukovinec), který se rozmnožuje obligátní apomixií (Driscoll *et al.*, 2003). A navíc tetraploidní *C. fragilis* je pravděpodobným hybridem mezi diploidním *C. reevesiana* a neznámým diploidem, označovaným jako *C. „hemifragilis“* (Haufler & Windham, 1991). Ve prospěch fakultativní apomixie způsobené laboratorními podmínkami by hrála skutečnost, že existují oktoploidní sporofyty, které by v přírodě vznikaly pohlavně, splynutím neredukovaného spermatozoidu s neredukovanou vaječnou buňkou (Vida & Mohay, 1980). Oktoploidy se však vyskytují velmi vzácně (pouze 2 jedinci z České republiky z celkového počtu cca 6000 vzorků z téměř celého světa, Hanušová *et al.*, in prep.). Jejich vznik není dosud znám a při intenzivním sběru jsme je na dané lokalitě (Nové Město nad Metují) znovu nenašli (viz kapitola 4.1.1). Pravděpodobně by mohly vznikat splynutím neredukovaných gamet od tetraploidů (Ekrt pers. comm.) nebo somatickou autopolyploidizací u tetraploidů (Vida & Mohay, 1980). Předkládaná studie nenašla žádný nově vzniklý oktoploidní sporofyt F_1 generace při experimentální hybridizaci mezi tetraploidními gametofyty.

Na druhou stranu, vznik neredukovaných gamet (neredukovaných spermatozoidů a vaječných buněk) a vůbec celý proces polyploidizace u kapradin je stále na počátcích svého výzkumu (Gastony, 1986), ač byla na základě chování chromozomů při meióze potvrzena právě v případě tetraploidního bukovince, kdy se na vzniku apomiktického hybridu měl podílet neredukovaný triploidní spermatozoid (Driscoll *et al.*, 2003). Z většiny neredukovaných výtrusů a gametofytů vznikne nový sporofyt apogamií (tedy druhým procesem apomiktického rozmnožování kapradin, přímým vývojem sporofytu

z pletiva gametofytu, viz kapitola 2.1.3). U *Cystopteris fragilis* by mohlo jít o tetraploidy F_1 generace, které vznikly z redukovaných výtrusů (např. diploidních) pocházejících od pentaploidního sporofytu P generace a mohl by u nich převažovat trend ve větší produkci neredukovaných výtrusů než u tetraploidů F_1 generace pocházejících od tetraploidů P generace. Proti této teorii však mluví předkládaná data, kde tetraploidy s produkcí neredukovaných výtrusů pochází převážně z lokality Bělá pod Pradědem, kde jsou pouze apomiktické pentaploidy. Tyto tetraploidy se tam tedy musely dostat v minulosti z jiné lokality, kde jsou pentaploidy s variabilní sporogenezi produkujících i redukované výtrusy. To není tak nepravděpodobné, protože kapradiny se díky svými lehkých výtrusům snadno šíří krajinou (Mehltreter *et al.*, 2010).

Pentaploidní sporofyt P generace má variabilní sporogenezi – produkuje více výtrusů různých ploidii, ale tato situace není homogenní u všech populací. Podobné je to u triploidního druhu *Dryopteris pacifica*, který produkuje diploidní a triploidní výtrusy, oba však dávají vzniknout novému sporofytu obligátní apogamií (Lin *et al.*, 1992). U *Cystopteris fragilis* se však některé gametofyty nižších ploidii (triploidy, u diploidů chybí analýzy sporofytů F_1 generace) chovají pohlavně, takže by mohlo jít o kombinaci pohlavního a apomiktického rozmnožování, což bylo dlouhou dobu považováno za nemožné u kapradin (Gastony & Windham, 1989). Až teprve v poslední době se ukazuje, že apomiktické kapradiny jsou schopné produkovat jak redukované, tak neredukované výtrusy, a kombinují možnost pohlavního a nepohlavního rozmnožování na jedné rostlině (Pinter, 1995; Nakato *et al.*, 2012; Ekrt & Koutecký, 2015).

V případě analýzy výtrusů se na výsledném histogramu objevily píky, které pravděpodobně odpovídají DNA dekaploidním výtrusům, avšak u vyklíčených výtrusů nebyl dekaploidní gametofyt detekován (obr. 39). Takto vysoká ploidie byla odhalena v případě studie na Mongolském Altaji (Kawakami *et al.*, 2016). DNA dekaploidní výtrus může z pentaploidu vznikat díky čtvrtému typu sporogeneze Döpp-Mantonové, kdy dvě mitotická dělení končí v anafázi a mají dvojnásobný počet chromozomů oproti sporofytu P generace (Döpp, 1939; Manton, 1950; Raghavan, 1989). Proti životaschopnosti těchto výtrusů svědčí fakt, že z 96 gametofytů nebyl žádný dekaploidní a cytogeografická studie ve vzorku 6000 jedinců nenašla jediný dekaploidní sporofyt (Hanušová *et al.*, in prep.). V případě studie Kawakami *et al.*, 2016 mohlo k lepšímu klíčení dekaploidních výtrusů napomáhat umělé médium obsahující vysoký obsah živin (zejména sacharózu), které dokonce může donutit normálně se pohlavně rozmnožující gametofyty přepnout na apomiktický způsob rozmnožování (Fernández *et al.*, 1999; Ranker & Houston, 2002).

Ve studii Kawakami *et al.*, 2016 nejsou z celkového počtu 13 gametofytů přítomny žádné pentaploidy. Předkládaná diplomová práce má zanalyzováno 21 pentaploidních gametofytů a 10 analýz s pentaploidními výtrusy, které naznačují neredukované výtrusy u pentaploidů a jeho následné rozmnožování obligátní apomixií. Do dnešní doby je čeleď Cystopteridaceae uváděna bez apomiktických rodů a druhů (Raghavan, 1989; Liu *et al.*, 2012), ač se o apomixii zmiňuje studie z roku 1985 (Haufler *et al.*, 1985) u triploidního *C. protrusa*, kde byla pozorována apomiktická sporogeneze dle schématu Braithwaite. První studie, která naznačuje apomixii u puchýřníku křehkého (Lawton, 1936) však pracuje s tetraploidy, fakultativní apomixií a morfologickými znaky, které jsou pozorovatelné při vzniku nového sporofytu z pletiva gametofytu. Hlavní příčinou neodhalení apomixie do současné doby je zřejmě velmi malé zaměření na pentaploidní cytotyp *C. fragilis* s. str. Až teprve v roce 2010 byly u něj pozorovány výtrusy, které byly větší než u hexaploidů (Kawakami *et al.*, 2010) a později byly prohlášeny za apomiktické dekaploidy (Kawakami *et al.*, 2016).

5.2. Sporogeneze

5.2.1. Životaschopnost výtrusů

Metodika zjišťování životaschopnosti výtrusů má své určité limity. Pokud je výtrus označen pozorovatelem jako životaschopný, nemusí nutně znamenat, že doopravdy vyklíčí v gametofyt a naopak. To, že výtrus vypadá neživotaschopný, nemusí ještě znamenat, že by nemohl vyklíčit. A i právě z tohoto důvodu se počítá s celkovým vzorkem 1000 výtrusů na jednu rostlinu, aby byly co nejpřesnější výsledky (Hornych & Ekrt, 2017). Jinou možností by bylo počítat podíl vyklíčených gametofytů z celkového počtu vyšetřovaných výtrusů (Camloh, 1993; Pangua *et al.*, 2003), avšak to je mnohem méně přesné. S malými propagulemi jako jsou výtrusy se velmi špatně manipuluje mimo mikroskop.

Výsledky procenta abortovaných výtrusů u tetraploidů (průměr 7,26 %) a hexaploidů (6,29 %) odpovídají obecným trendům udávaným v literatuře, kdy mohou být abortované výtrusy zastoupeny až z 20 % z celkového počtu výtrusů u normálně pohlavně se množících rostlin (Wagner *et al.*, 1986). U šesti druhů rodu *Dryopteris* ze severního Španělska byl abortivní index nižší jak 10 % (Quintanilla & Escudero, 2006), což jsou podobné výsledky jako u tetraploidů a hexaploidů puchýřníku křehkého. Abortované výtrusy mohou také být důsledkem environmentálního stresu (např. nadměrného slunečního záření) při sporogenezi (Arosa *et al.*, 2009).

Avšak u hybridů mohou být výtrusy 100 % abortované v důsledku poruchy mitózy a meiózy. Stejně tak apomikty mají větší zastoupení neživotaschopných výtrusů (odpovídá sporogenezi I. a II. typu Döpp–Mantonové, viz kapitola 2.1.3). Pentaploidy mají aborční index v průměru 96,20 %, což naznačuje částečnou fertilitu. Podobně je tomu i v případě apomiktického hybridu *Dryopteris × critica*, který má aborční index od 84–94 % (Ekrt & Koutecký, 2015). Podobné rozpětí mají pentaploidní apomiktické rostliny z populace Bělá pod Pradědem (SAI od 76,1 % do 100 %). Populace z Roztok u Křivokláta je méně fertillní (SAI od 97,2 % do 100 %) s jednou rostlinou, která má fertilitu vyšší (51,6 % neživotaschopných výtrusů). Ještě nižší počet abortovaných výtrusů byl zaznamenán u apomiktické rostliny *Cornopteris christenseniana*, kde se jednalo o pouhých 20 % neživotaschopných výtrusů (Park & Kato, 2003). Na druhou stranu, i přes takto vysoký index neživotaschopnosti, je puchýřník křehký schopný vyprodukovat pár životaschopných výtrusů, které dají vzniknout potomstvu.

5.2.2. Lze pomocí velikosti výtrusů odhalit diplospory?

Velikost výtrusů je jedním z nejčastěji používaných znaků k určování ploidní úrovně u kapradin (Mickel & Tejero-Díez, 2004) a zakládá se na předpokladu, že polyploidy mají větší objem buněk než jejich diploidní příbuzný (Otto & Whitton, 2000). První, kdo odvodil polyploidní řadu u puchýřníku na základě velikosti výtrusů byl autor jeho monografie (Blasdell, 1963), ale už několik let předtím byl na základě velikosti výtrusů od sebe oddělen tetraploidní *C. alpina* a hexaploidní *C. fragilis* (Manton, 1950). Jedna z prvních studií, která se věnuje pentaploidnímu cytotypu ukazuje, že pentaploid produkuje mnohem větší výtrusy než hexaploid, což nasvědčuje na vznik neredukovaných výtrusů a obligátní apomixii (Kawakami *et al.*, 2010).

Toto tvrzení potvrzují naše výsledky, kdy má pentaploid širokou škálu velikostí životaschopných výtrusů a na úplném konci i enormně velké diplospory (největší naměřená velikost jednotlivého výtrusu 99,02 μm ve srovnání s průměrnou hodnotou výtrusů u pentaploidů – 47,27 μm). Teoreticky by tyto extrémní hodnoty mohly patřit výtrusům s vyšší ploidii (např. 10n – dekaploid, Kawakami *et al.*, 2016), viz kapitola 4.1.2. Tetraploidy se částečně překrývají velikostně s hexaploidy a nevydělila se žádná frakce výtrusů, která by odpovídala tetraploidním výtrusům (obr. 31). Pod mikroskopem však byly pozorovány pravděpodobně tvarové diplospory (viz obr. 33 v kapitole 4.2.2), avšak ty jsou velikostně menší jak typické diploidní výtrusy.

Pokud se podíváme na teorii velikosti výtrusů související s ploidií rostliny, tak by triploidní výtrusy měly být 1,5× větší než diploidní, tetraploidní výtrusy zase 2× větší jak diploidní. Pokud výtrus zjednodušíme tak, že se jedná o kouli o určitém poloměru a objemu, pak z naměřených dat od diploidních a triploidních výtrusů zjistíme, že triploidní výtrusy jsou ve skutečnosti 1,26× větší než diploidní (teoreticky 1,5×). Pentaploidní diplospory jsou 1,36× větší než diploidní výtrusy (teoreticky 2,5×). Tetraploidní výtrusy se mohou velikostně krýt s největšími diploidními výtrusy, případně s triploidními výtrusy hexaploidů. Z velikosti výtrusů lze jen v některých případech říci, o jakou ploidiu se jedná, např. v případě dvou velikostně rozdílných výtrusů u jednoho druhu (Ekrt & Koutecký, 2015). V případě puchýřníku křehkého, kde může být celkem 4-5 různě ploidiích výtrusů, je to složité a velikost výtrusů nevede k jednoznačné determinaci cytotypu a ploidiu výtrusu (Vida, 1974), a to zejména díky variabilní sporogenezi. Na tento stejný trend poukazuje studie na komplexu *Asplenium monanthes*, která nenašla korelaci mezi obsahem DNA a velikostí výtrusů (Dyer *et al.*, 2013).

V tab. 9 jsou uvedeny publikované údaje z literatury vztahující se k velikosti výtrusů s porovnáním vlastního měření. Ač Kawakami *et al.*, 2010 publikuje větší velikost výtrusů u pentaploidů, nedokládá to měřením velikosti výtrusů. Pravděpodobně prvními publikovanými údaji budou pentaploidy z naší studie (Hanušová *et al.*, in prep., Ptáček *et al.*, unpubl.).

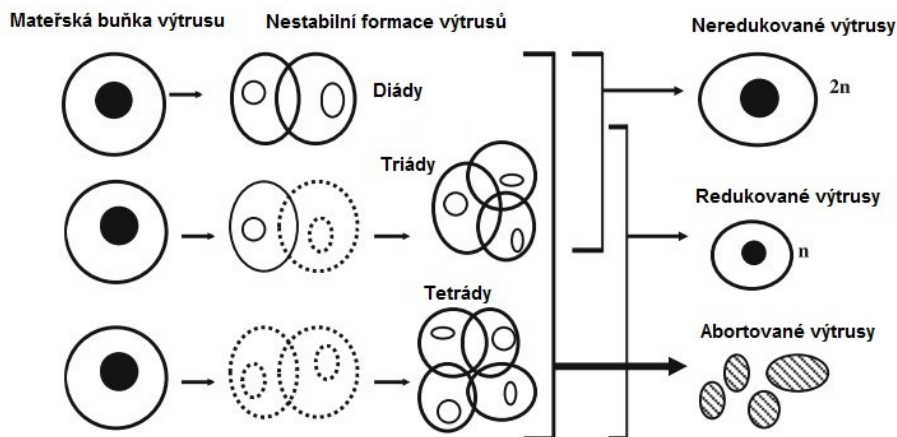
Tab. 9: Tabulka porovnávající rozpětí velikosti výtrusů jednotlivých ploidií z vlastního měření a údaji v literatuře. 1 – vlastní měření; 2 – Mickel & Tejero-Díez, 2004; 3 – Dostál, 1984; 4 – Jermy & Harper, 1971; 5 – teoretická průměrná velikost výtrusů. NA – velikost výtrusů není uvedena. Velikost výtrusů pentaploidů nebyla v literatuře doposud zaznamenána.

Zdroj	Velikost výtrusů v μm			
	4x	5x	6x	8x
1	34,7–41,9–44,9	36,4–45,3–67,8	40,04–44,7–49,9	NA
2	37–45	NA	46–53	NA
3	(27–)33–42–48	NA	(28–)36–48(–54)	(33–)39–54(–60)
4	32–42	NA	38–48	43–53
5	41,88	104,7	62,82	83,76

5.2.3. Počet výtrusů na jednu výtrusnici

Teoretické předpoklady říkají, že normálně pohlavně se rozmnožující leptosporangiální kapradiny mají 64 výtrusů v 16 tetrádách na jednu výtrusnici a apomikty 32 výtrusů v osmi tetrádách (Döpp, 1939; Manton, 1950) nebo 16 diádách (Braithwaite, 1964), podle toho, o jaký druh sporogeneze se jedná (viz kapitola 2.1.3). Ovšem existují kapradiny

s 32 výtrusy ve výtrusnici rozmnožující se pohlavně, např. rody *Cheilanthes* (Huang *et al.*, 2009) a *Lindsaea* (Lin *et al.*, 1990).



Obr. 40: Tvorba tří typů výtrusů v jedné výtrusnici. Z mateřské buňky výtrusu se díky nestabilní formaci výtrusů vytvářejí tři výsledné produkty. Diády výtrusů vznikají chybějícím druhým mitotickým dělením. U triád se mitoticky dělí pouze jedna mateřská buňka. Tetrády vznikají dvěma mitotickými děleními. Pokud u diád a triád nedojde k meiotickému dělení, vznikají neredukované výtrusy (diplospory). Pokud proběhne redukční dělení a výtrusy mají správný počet chromozomů, vznikají normální redukované výtrusy. Při nevyváženém počtu chromozomů dochází ke vzniku neživotaschopných (abortovaných) výtrusů. $2n$ – diploid, n – haploid. Tomuto schématu by odpovídala sporogeneze u pentaploidního cytotypu puchýrníku křehkého. Upraveno dle Nakato *et al.*, 2012.

Počet výtrusů na jednu výtrusnici se počtu 64 výtrusů blížil u tetraploidního cytotypu *C. fragilis*. Průměr byl 50 výtrusů na výtrusnici, což by také mohlo naznačovat přítomnost neredukovaných výtrusů. U hexaploidů byla průměrná hodnota 40 výtrusů na výtrusnici. Tento nízký počet by mohl být způsoben o něco větší velikostí výtrusů u hexaploidů (viz kapitola 4.2.2), kdy se nemusely do jedné výtrusnice vejít v počtu 64. Na druhou stranu, podle všeobecného trendu by se měla se zvyšující ploidní úrovní zvětšit i výtrusnice (Otto & Whitton, 2000), avšak to pravděpodobně platí jenom pro průduchy kapradin (Barrington *et al.*, 1986). Podobné pattern bylo zaznamenáno v případě diploidní pohlavně se rozmnožující kapradiny *Phegopteris decursive-pinnata* (Nakato *et al.*, 2012), u které se místo tetrád (normální dvě mitotická dělení), vytvářejí diády (chybějící druhé mitotické dělení) nebo triády (druhé mitotické dělení pouze u jedné mateřské buňky, viz obr. 40). Svou roli v tom může hrát i metodika přípravy preparátu, na nichž se mohou výtrusy překrývat, případně pokud byly výtrusnice naloženy teprve

v počátečním vývoji nebo už v pozdní fázi, kdy se mohly začít uvolňovat výtrusy (Raghavan, 1989).

Pentaploidní sporofyt měl v průměru pouze 19 výtrusů na jednu výtrusnici a pravděpodobně kombinuje minimálně dva typy sporogeneze Döpp–Mantonové (Döpp, 1939; Manton, 1950) ve svém životním cyklu. Pravděpodobně převažujícím bude sporogeneze III. typu, která vede k 32 neživotaschopným výtrusům. Minoritně zastoupena bude sporogeneze II. typu končící 32 neredukovanými výtrusy na výtrusnici. Nelze ovšem ani vyloučit tvorbu výtrusů pomocí I. typu (64 abortovaných výtrusů) a IV. typu (vznik 16 výtrusů o dvojnásobné velikosti genomu). Na tuto smíšenou meiózu (kombinující pohlavní a apomiktické rozmnožování) poukazují některé studie, např. komplexu *Asplenium monanthes* (Dyer *et al.*, 2012) nebo *Dryopteris × critica* (Ekrat & Koutecký, 2015). Právě díky této smíšené meióze neodpovídají počty výtrusů teoretickým předpokladům o 64/32 výtrusech na jednu výtrusnici. Část mateřských buněk výtrusů projde posledním mitotickým dělením (je redukována) a část tímto mitotickým dělením neprojde (je neredukována) a mohou se vytvářet abortované výtrusy (Nakato *et al.*, 2012). Takto nízký průměrný počet výtrusů byl podobně pozorován u apomiktické kapradiny *Cheilanthes hirsuta*, který vytvářel pouze 16 výtrusů na jednu výtrusnici (Huang *et al.*, 2009).

5.3. Dynamika smíšených populací

Ve střední Evropě jsou smíšené populace puchýřníku křehkého velmi častou záležitostí (40 % populací je smíšených, Hanušová *et al.*, in prep.). Dvě největší smíšené populace použité v této studii jsou Roztoky u Křivoklátu a Bělá pod Pradědem. Obě jsou značně početné a odhadem se může jednat o 200 (Bělá pod Pradědem) až 500 jedinců (Roztoky u Křivoklátu; náhodný výběr rostlin byl změřen průtokovou cytometrií).

Právě populace Roztoky u Křivoklátu je svým prostorovým rozložením cytotypů unikátní. Nejprve začínají pouze tetraploidní jedinci ve stínu vzrostlých stromů. Později se přidávají hexaploidy, a nakonec i pentaploidy, které dominují na části svahu exponované slunečnímu záření. Tyto pentaploidy vytvářejí rozsáhlé polykormony, kterými se vegetativně rozmnožují. Ovšem tato vlastnost není vyhrazená pouze pentaploidům, ale byla cytometricky ověřena i u zbývajících ploidii (obr. 41). Pokud se podíváme na výsledky (kapitola 4.1.1) C_x hodnot u jednotlivých populací, pak Roztoky u Křivoklátu mají statisticky průkazně vyšší medián než zbývajících populace. C_x hodnota hexaploidů z Roztok u Křivoklátu odpovídá C_x hodnotám tetraploidů z ostatních

populací, stejně jako C_x -hodnoty gametofytů. To by mohlo částečně naznačovat unikátnost této modelové lokality oproti zbývajícím a mohlo by to snižovat pravděpodobnost, resp. význam, potenciální homoploidní, tak heteroploidní hybridizace mezi populacemi.

V populaci Bělá pod Pradědem byly nalezeny unikátně pouze dvě ploidie – tetraploidy a pentaploidy. Hexaploidy buď nejsou přítomny nebo nebyly podchyceny v náhodném výběru rostlin. Navíc se jedná o apomiktické pentaploidy, mající vysokou fertilitu a pravděpodobně se nějakou dobu šíří díky apomiktickému rozmnožování. Pentaploidy z Roztok u Křivokláta jsou téměř sterilní až na pár životaschopných pohlavně vzniklých výtrusů, avšak rozmnožující se převážně vegetativní cestou tvorbou polykormonů. Jejich původ by mohl být hybridní, z heteroploidní hybridizace mezi tetraploidy a hexaploidy. Na přechodu mezi populací Roztoky u Křivokláta a Bělá pod Pradědem by mohla být populace rostlin z Ohebu, kde jsou rostliny se smíšeným typem reprodukce, tzn. produkcí velmi



Obr. 41: Hexaploidní rostlina rozmnožující se vegetativně pomocí oddenku. Vegetativní rozmnožování puchýřníku není vyhrazeno pouze pentaploidním sterilním rostlinám, ale bylo potvrzeno i u zbývajících ploidí.

variabilního potomstva. Tyto výsledky by mohly naznačovat evoluční cestu od neustáleného hybridu (Roztoky u Křivokláta, nízká fertilita) přes mezistupeň (Oheb, smíšená reprodukce) až po konečnou fázi ustáleného pentaploidního hybridu (Bělá pod Pradědem, apomixie). Tento apomiktický hybrid mohl vzniknout v dávné době a dodnes se šíří spolu s oběma cytotypy díky apomixii a společně vytvářejí ploidně smíšené populace.

5.3.1. Hybridizace u puchýřníku křehkého

Podle výsledků experimentální hybridizace by měla být heteroploidní hybridizace v přírodě vzácná. Pouze 2 ze 196 sporofytů vznikly křížením diploidního a triploidního gametofytu za vzniku pentaploidního sporofytu F_1 generace. Tuto vzácnost by mohly potvrdit smíšené populace tetraploidů a hexaploidů, ve kterých se nenachází pentaploidy (např. modelová populace Nové Město nad Metují).

Z výše uvedeného vyplývá, že ani hybridizace mezi gametofyty pocházejících z geneticky odlišných sporofytů P generace (např. tetraploidů produkujících diploidní výtrusy a tetraploidů vytvářejících také neredukované, tetraploidní výtrusy) nevedla ke sporofytickému outcrossingu. Z tohoto experimentálního křížení nebyl pozorován jiný sporofyt než tetraploidní. Právě možnost hybridizace mezi diploidním a tetraploidním gametofytem by mohla vést k hexaploidnímu cytotypu (Haufler & Windham, 1991), případně hybridizace dvou tetraploidních gametofytů k oktoploidnímu cytotypu (Vida, 1974). Podle zjištěných výsledků tak velmi vzácné tetraploidní gametofyty dají pravděpodobně vzniknout tetraploidnímu sporofytu obligátní apomixií. Hexaploidní cytotyp musel vzniknout v dávné době, pravděpodobně přes triploidního předka a od té doby se šíří společně s tetraploidem (Hanušová *et al.*, in prep.).

Ve většině případů vede studium gametofytů v umělých podmínkách ke stejným výsledkům jako v případě studia v přírodě (Ranker & Houston, 2002), avšak v přírodě jsou abiotické a biotické podmínky, které mohou usnadňovat hybridizaci (tab. 10).

Tab. 10: Rozdíly mezi laboratorní kulturou a populací gametofytů v přírodě. Díky všem přítomným mechanismům v přírodní populaci může snadněji docházet k heteroploidní hybridizaci než v laboratorních podmínkách. Zejména k tomu může napomáhat narušení populace gametofytů a klimatické parametry, které usnadní hybridizaci mezi dvěma gametofyty. Upraveno dle Haufler & Ranker, 1985.

	Laboratorní kultura	Přírodní populace
Klima	konstantní	variabilní
Narušení populace	chybí	přítomny
Biotické vztahy	chybí	přítomny
Hustota populace	kontrolovaná	nekontrolovaná

Na druhou stranu, pokud jsou gametofyty vysety na husto, velmi blízko sebe, převažují samčí gametofyty nad samičími. Pokud jsou gametofyty izolovány, pak vytvářejí pouze archegonia (jsou samičí). Antheridia se pak vytvářejí v populacích, které měly gametofyty s archegonií (Schneller *et al.*, 1990). Toto ovlivnění chování gametofytů je pravděpodobně způsobeno hormony antheridiogeny, které by měly napomáhat sporofytickému outcrossingu (Jiménez *et al.*, 2008). Ovlivnění hybridizace mezi druhy kvůli antheridiogenům je dlouhou dobu známá věc mezi severoamerickými puchýřníky *C. bulbifera* a *C. protrusa*, viz kapitola 2.4 (Haufler & Ranker, 1985). Většina studií podporuje u polyploidních oboupohlavných kapradin gametofytické samooplození, zatímco diploidy se rozmnožují sporofytickým outcrossingem (Wubs *et al.*, 2010).

To však nepodporuje studie zabývající se alotetraploidním *Dryopteris corleyi*, která poukazuje na to, že záleží na překryvu jednopohlavných a oboupohlavných gametofytů v populaci a jednopohlavnost gametofytů tak předurčuje ke sporofytickému outcrossingu (Jiménez *et al.*, 2008). Experimentální hybridizace u šesti druhů rodu *Polystichum* navíc odhalila snadnější fungování tetraploidu při křížení, pokud funguje jako samičí gametofyt a samčí spermatozoidy jsou diploidního druhu (Sleep, 2014). Kapradiny mají labilní determinaci pohlaví, tzn. že záleží na vnějších podmínkách, zdali se vyvinou oboupohlavné, samčí nebo samičí gametofyty (Korpelainen, 1998), což může v laboratorních podmínkách předurčovat spíše ke gametofytickému samooplození (Ranker & Houston, 2002). U *Dryopteris filix-max* se pomocí gametofytického samooplození rozmnožuje v laboratorní kultuře 95–100 % gametofytů (Korpelainen, 1996).

Pro celkové komplexní zhodnocení *Cystopteris fragilis* agg. v navazujících studiích by v první řadě bylo vhodné uzavřít celý jeho životní cyklus, zejména co se týče částí s výskytem tetraploidních a pentaploidních gametofytů a dopěstování sporofytu F₁ generace do dospělosti se zhodnocením sporogeneze. Jednou z metodických výzev bude i provedení experimentální hybridizace mezi ploidně různorodými gametofyty za pomoci antheridiogenů. V neposlední řadě by bylo důležité porovnání modelově smíšených populací mezi Evropou a Severní Amerikou, kde se vyskytují i diploidní zástupci.

6. Závěr

Cílem diplomové práce bylo zodpovědět na základní tři okruhy otázek uvedených v úvodu, a to pomocí kombinace několika metodických přístupů, které měly objasnit probíhající mikroevoluční procesy u puchýřníku křehkého (*Cystopteris fragilis*) v modelově smíšených populacích.

1) Jaké je zastoupení ploidii mezi mateřskou rostlinou a gametofytem vzniklým z jejich výtrusů?

Právě ploidně smíšené populace generují variabilitu ve sporogenezi. Zejména se jedná o tetraploidní a pentaploidní cytotyp, naopak hexaploidní cytotyp vytváří uniformní potomstvo a variabilita u něj nebyla pozorována. Tetraploid vytváří ve většině případů diploidní gametofyty, ale velmi vzácně se mohou objevit i tetraploidní gametofyty (v 1,97 % případů) vzniklé z neredukovaných výtrusů. Tyto gametofyty se pak pravděpodobně dále rozmnožují pomocí obligátní apomixie. Neredukované výtrusy u tetraploidů nelze identifikovat pomocí měření jejich velikosti a mohou se velikostně překrývat s hexaploidy. Pentaploid vytváří díky variabilní sporogenezi cytotypově různorodé potomstvo (čemuž odpovídají i výsledky měření velikosti výtrusů, které jsou velikostně různorodé) a velmi záleží na dané populaci. Pokud se jedná o neustáleného hybridu mezi tetraploidem a hexaploidem, pak je téměř sterilní (v průměru 96,61 až 99,9 % neživotaschopných výtrusů v závislosti na studované populaci) a vzácně může dávat vzniknout diploidním a triploidním výtrusům, které se rozmnožují pohlavně, případně výtrusům jiných ploidii (např. tetraploidním). Po krátké stabilizaci se přidává produkce pentaploidních neredukovaných výtrusů (diplospor), které se rozmnožují pomocí obligátní apomixie. U pravděpodobně ustáleného hybridu se reprodukce odehrává výhradně na úrovni apomixie přes neredukované výtrusy a s tím souvisí i zvýšená fertilita apomiktických jedinců (od 76,1 do 99,62 % neživotaschopných výtrusů).

2) Jaká je reprodukční strategie jednotlivých cytotypů, zejména hybridního pentaploidu?

Díky průtokové cytometrii všech životních fází kapradin (tj. sporofyty P generace, výtrusy, gametofyty a sporofyty F₁ generace) byla u *C. fragilis* potvrzena kombinace pohlavního a obligátně apomiktického rozmnožování v závislosti na tom, o jaký gametofyt se jedná, a potvrzena tak další apomiktická čeleď kapradin – Cystopteridaceae (puchýřníkovité).

3) Jaká je frekvence heteroploidní hybridizace v modelově smíšených populacích?

K interakci mezi jednotlivými cytotypy (heteroploidní hybridizaci) dochází vzácně u diploidních a triploidních gametofytů, v laboratorních podmínkách se jednalo pouze o 0,59 % případů. V rámci předkládané práce se nepodařilo objasnit pomocí laboratorních kultivací a experimentální hybridizace vznik hexaploidního a oktoploidního cytotypu a případná role neredukovaných gamet (spermatozoidů a vaječných buněk) v evoluci kapradin, nicméně výskyt neredukovaných výtrusů byl u tetraploidů a pentaploidů prokázán.

7. Seznam citované literatury

- Albert VA, Barbazuk WB, Der JP, Leebens-Mack J, Ma H, Palmer JD, Rounsley S, Sankoff D, Schuster SC, Soltis DE. 2013. The *Amborella* genome and the evolution of flowering plants. *Science* **342**: 1241089.
- Arosa ML, Quintanilla LG, Ramos JA, Ceia R, Sampaio H. 2009. Spore maturation and release of two evergreen Macaronesian ferns, *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans*, along an altitudinal gradient. *American Fern Journal* **99**: 260–272.
- Barrington DS, Haufler CH, Werth CR. 1989. Hybridization, Reticulation, and Species Concepts in the Ferns. *American Fern Journal* **79**: 55–64.
- Barrington DS, Paris CA, Ranker TA. 1986. Systematic Inferences from Spore and Stomate Size in the Ferns. *American Fern Journal* **76**: 149–159.
- Baslerová M, Dvořáková J. 1962. *Algarum, Hepaticarum Muscurumque in cultiris collectio*. Praha: NCSAV.
- Bhellum BL, Razdan B. 2012. *Cystopteris fragilis* f. *kashmiriensis* Bhellum and Razdan—A new forma from India. *International Journal of Scientific and Research Publications* **2**: 4–7.
- Blasdell RF. 1963. A Monographic Study of the Fern Genus *Cystopteris*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* **21**: 1–102.
- Braithwaite AF. 1964. A new type of apogamy in ferns. *New Phytologist* **63**: 293–305.
- Bureš P, Wang Y-F, Tichý L, Bartoš J. 2003. *Polypodium x mantoniae* and new localities of *P. interjectum* in the Czech Republic confirmed using flow cytometry. *Preslia* **75**: 293–310.
- Camloh M. 1993. Spore Germination and Early Gametophyte Development of *Platyserium bifurcatum*. *American Fern Journal* **83**: 79–85.
- Clark J, Hidalgo O, Pellicer J, Liu H, Marquardt J, Robert Y, Christenhusz M, Zhang S, Gibby M, Leitch IJ, et al. 2016. Genome evolution of ferns: Evidence for relative stasis of genome size across the fern phylogeny. *New Phytologist* **210**: 1072–1082.
- Conant DS, Cooper-Driver G. 1980. Autogamous allohomoploidy in *Alsophila* and *Nephelea* (Cyatheaceae): a new hypothesis for speciation in homoploid homosporous ferns. *American Journal of Botany* **67**: 1269–1288.
- Cruden RW, Lloyd RM. 1995. Embryophytes have equivalent sexual phenotypes and breeding systems: why not a common terminology to describe them? *American Journal of Botany* **82**: 816–825.
- Dafni A. 1992. *Pollination Ecology: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.
- Danihelka J, Chrtek Jr J, Kaplan Z. 2012. Checklist of vascular plants of the Czech Republic. *Preslia* **84**: 647–811.
- Doležel J, Greilhuber J, Suda J. 2007. *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Doležel J, Sgorbati S, Lucretti S. 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia plantarum* **85**: 625–631.
- Döpp W. 1939. Cytologische und genetische Untersuchungen innerhalb der Gattung *Dryopteris*. *Planta* **29**: 481–533.
- Dostál J. 1984. *Cystopteris*. In: Kramer KU, Hegi G, eds. *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Band I, Teil 1. Pteridophyta. Berlin, Hamburg, Germany: Verlag

- Paul Parey, 192–201.
- Driscoll HE, Barrington DS, Gilman A V. 2003.** A reexamination of the apogamous tetraploid *Phegopteris* (Thelypteridaceae) from northeastern North America. *Rhodora* **105**: 309–321.
- Dyer AF, Parks JC, Lindsay S. 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 RJ, Pellicer J, Savolainen V, Leitch IJ, Schneider H. 2013.** Genome size expansion and the relationship between nuclear DNA content and spore size in the *Asplenium monanthes* fern complex (Aspleniaceae). *BMC Plant Biology* **13**: 219.
- Dyer RJ, Savolainen V, Schneider H. 2012.** Apomixis and reticulate evolution in the *Asplenium monanthes* fern complex. *Annals of Botany* **110**: 1515–1529.
- Ekrt L, Koutecký P. 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.
- Ekrt L, Trávníček P, Jarolímová V, Vít P, Urfus T. 2009.** Genome size and morphology of the *Dryopteris affinis* group in Central Europe. *Preslia* **81**: 261–280.
- Fernández H, Bertrand a. M, Sánchez-Tamés R. 1999.** Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **56**: 211–214.
- Gamperle E, Schneller JJ. 2002.** Phenotypic and isozyme variation in *Cystopteris fragilis* (Pteridophyta) along an altitudinal gradient in Switzerland. *Flora* **197**: 203–213.
- Gastony GJ. 1986.** Electrophoretic Evidence for the Origin of Fern Species by Unreduced Spores. *American Journal of Botany* **73**: 1563–1569.
- Gastony GJ, Windham MD. 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.
- Guo Z-Y, Liu H-M. 2013.** Gametophyte Morphology and Development of Three Species of *Cyrtogonellum* Ching (Dryopteridaceae). *American Fern Journal* **103**: 153–165.
- Hadinec J, Lustyk P. 2012.** Additamenta ad floram Reipublicae Bohemicae. X. *Zprávy České botanické společnosti* **47**: 43–158.
- Hagenah DJ. 1961.** Spore studies in the genus *Cystopteris*. I. The distribution of *Cystopteris* with non-spiny spores in North America. *Rhodora* **63**: 181–193.
- Hall C, Farrar D, Ranker T, Gardescu S, Connolly V, Marks P, Geber M, Sahli H, Moeller D, Haufler C, et al. 2006.** Reproductive biology of three fern species may contribute to differential colonization success in post-agricultural forests. *American Journal of Botany* **93**: 1289–1294.
- Hammer H, Harper D, Ryan P. 2001.** PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**: 9.
- Hanušová K, Ekrt L, Vít P, Kolář F, Urfus T. 2014.** Continuous morphological variation correlated with genome size indicates frequent introgressive hybridization among *Diphasiastrum* species (Lycopodiaceae) in Central Europe. *PLOS One* **9**: e99552.
- Haufler CH, Moran RC, Windham MD. 1993.** *Cystopteris*. In: Haufler CH, Moran RC, Windham MD, eds. *Flora of North America North of Mexico*, Vol. 2. New York: Oxford University Press, 263–270.

- Haufler CH, Pryer KM, Schuettpelz E, Sessa EB, Farrar DR, Moran R, Schneller JJ, Watkins JE, Windham MD. 2016.** Sex and the single gametophyte: Revising the homosporous vascular plant life cycle in light of contemporary research. *BioScience* **66**: 928–937.
- Haufler CH, Ranker TA. 1985.** Differential Antheridiogen Response and Evolutionary Mechanisms in *Cystopteris*. *American Journal of Botany* **72**: 659–665.
- Haufler CH, Soltis DE. 1984.** Obligate Outcrossing in a Homosporous Fern: Field Confirmation of a Laboratory Prediction. *American Journal of Botany* **71**: 878–881.
- Haufler CH, Soltis DE. 1986.** Genetic evidence suggests that homosporous ferns with high chromosome numbers are diploid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**: 4389–4393.
- Haufler CH, Windham MD. 1991.** New species of North American *Cystopteris* and *Polypodium*, with Comments on Their Reticulate Relationships. *American Fern Journal* **81**: 7–23.
- Haufler CH, Windham MD, Britton DM, Robinson SJ. 1985.** Triploidy and its evolutionary significance in *Cystopteris protrusa*. *Canadian Journal of Botany* **63**: 1855–1863.
- Haufler CH, Windham MD, Ranker TA. 1990.** Biosystematic Analysis of the *Cystopteris tennesseensis* (Dryopteridaceae) Complex. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77**: 314–329.
- Hernández MA, Andrada AR, Páez V de los A, Martínez OG. 2015.** Ploidy level and obligate apogamy in two populations of *Argyrochosma nivea* var. *tenera* (Pteridaceae). *Hoehnea* **42**: 233–237.
- Hickok LG, Warne TR, Fribourg RS. 1995.** The Biology of the Fern *Ceratopteris* and Its Use as a Model system. *International Journal of Plant Sciences* **156**: 332–345.
- Hörandl E, Hojsgaard D. 2012.** The evolution of apomixis in angiosperms: a reappraisal. *Plant Biosystems* **146**: 681–693.
- Hornych O, Ekrt L. 2017.** Spore abortion index (SAI) as a promising tool of evaluation of spore fitness in ferns: an insight into sexual and apomictic species. *Plant Systematics and Evolution* **303**: 497–507.
- Hoshizaki BJ, Moran RC. 2001.** *Fern Grower's Manual*. Portland, Oregon: Timber Press.
- Huang Y-M, Hsu S-Y, Hsieh T-H, Chou H-M, Chiou W-L. 2011.** Three *Pteris* species (Pteridaceae: Pteridophyta) reproduce by apogamy. *Botanical Studies* **52**: 79–87.
- Huang YM, Hsu SY, Huang MH, Chiou WL. 2009.** Reproductive biology of three cheilanthoid ferns in Taiwan. *The International Journal of Plant Reproductive Biology* **1**: 109–116.
- Husband BC, Ozimec B, Martin SL, Pollock L. 2008.** Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: current trends and insights from synthetic polyploids. *International Journal of Plant Sciences* **169**: 195–206.
- Chao Y-S, Liu H-Y, Chiang Y-C, Chiou W-L. 2012.** Polyploidy and speciation in *Pteris* (Pteridaceae). *Journal of Botany* **2012**: 1–6.
- Chrtek J. 1988.** *Cystopteris* Bernh. In: Hejný S, Slavík B, eds. *Květena ČSR 1*. Praha: Academia, 256–259.
- Jermy AC. 1993.** *Cystopteris*. In: Tutin TG, Burges NA, Chater AO, Edmondson JR, Heywood VH, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, eds. *Flora Europaea*, Vol 1, 2nd Ed. Cambridge University Press, 24–25.
- Jiménez A, Quintanilla LG, Pajarón S, Pangua E. 2008.** Reproductive and competitive interactions among gametophytes of the allotetraploid fern *Dryopteris corleyi* and

- its two diploid parents. *Annals of Botany* **102**: 353–359.
- Kaur S. 1963.** The gametophyte of *Cystopteris fragilis*. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* **58**: 148–152.
- Kawakami SM, Kawakami S, Damdinsuren O, Kato J, Smirnov S V, Kondo K. 2016.** Decaploid gametophyte formation from spores of a pentaploid *Cystopteris fragilis* (Cystopteridaceae) collected in Mongolian Altai. *The Fern Gazette* **20**: 149–155.
- Kawakami SM, Kawakami S, Kato J, Kondo K, Smirnov S V., Damdinsuren O. 2010.** Cytological study of a fern *Cystopteris fragilis* in Mongolian Altai. *Chromosome Botany* **5**: 1–3.
- Kawakami SM, Kawakami S, Kondo K, Shmakov A. 2011.** Cytological studies of Russian Altai ferns and the haploid sporophyte formation. *Chromosome Botany* **6**: 21–23.
- Khandelwal S. 1990.** Chromosome evolution in the genus *Ophioglossum* L. *Botanical Journal of the Linnean Society* **102**: 205–217.
- Klekowski EJ jr. 1973.** Sexual and Subsexual Systems in Homosporous Pteridophytes: A New Hypothesis. *American Journal of Botany* **60**: 535–544.
- Knobloch IW, Gibby M, Fraser-Jenkins C. 1984.** Recent Advances in Our Knowledge of Pteridophyte Hybrids. *Taxon* **33**: 256–270.
- Korpelainen H. 1996.** Intragametophytic selfing does not reduce reproduction in *Dryopteris filix-max*. *Sexual Plant Reproduction* **9**: 117–122.
- Korpelainen H. 1998.** Labile sex expression in plants. *Biological Reviews* **73**: 157–180.
- Kubát K. 2002.** Woodsiaceae. In: Kubát K, Hrouda L, Chrtek Jr J, Kaplan Z, Kirschner J, Štěpánek J, eds. Klíč ke květeně České republiky. Praha: Academia, 87–89.
- Kuo L, Huang Y, Chang J, Chiou W, Huang Y. 2016.** Evaluating the spore genome sizes of ferns and lycophytes: a flow cytometry approach. *New Phytologist*.
- Lawton E. 1936.** Regeneration and Induced Polyploidy in *Osmunda regalis* and *Cystopteris fragilis*. *American Journal of Botany* **23**: 107–114.
- Lin S-J, Kato M, Iwatsuki K. 1990.** Sporogenesis, reproductive mode, and cytotaxonomy of some species of *Sphenomeris*, *Lindsaea*, and *Tapeinidium* (Lindsaeaceae). *American Fern Journal* **80**: 97–109.
- Lin S-J, Kato M, Iwatsuki K. 1992.** Diploid and triploid offspring of triploid agamosporous fern *Dryopteris pacifica*. *Journal of Plant Research* **105**: 443–452.
- Liu H-M, Dyer RJ, Guo Z-Y, Meng Z, Li J-H, Schneider H. 2012.** The evolutionary dynamics of apomixis in ferns: a case study from polystichoid ferns. *Journal of Botany* **2012**: 1–11.
- Lloyd RM. 1973.** Facultative Apomixis and Polyploidy in *Matteuccia orientalis*. *American Fern Journal* **63**: 43–48.
- Lloyd RM. 1974.** Reproductive Biology and Evolution in the Pteridophyta. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **61**: 318–331.
- Lovis JD. 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*. England: Cambridge University Press.
- Mason AS, Pires JC. 2015.** Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism? *Trends in Genetics* **31**: 5–10.
- Masuyama S, Watano Y. 1990.** Trends for inbreeding in polyploid pteridophytes. *Plant Species Biology* **5**: 13–17.
- Mehrtreter K, Walker LR, Sharpe JM. 2010.** *Fern Ecology*. New York: Cambridge University Press.
- Mickel JT, Tejero-Díez JD. 2004.** Three New Species of Ferns (Woodsiaceae and

- Polypodiaceae) from Mexico. *Brittonia* **56**: 115–120.
- Nakato N, Ootsuki R, Murakami N, Masuyama S. 2012.** Two types of partial fertility in a diploid population of the fern *Thelypteris decursive-pinnata* (Thelypteridaceae). *Journal of Plant Research* **125**: 465–474.
- Otto SP, Whitton J. 2000.** Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* **34**: 401–437.
- Pajarón S, Prada C, Pangua E, Herrero A. 1996.** Contribución al estudio de la biología reproductiva en el complejo *Cystopteris fragilis*. *Memorie della Accademia Lunigianese di Scienze* **66**: 51–60.
- Paler MH, Barrington DS. 1995.** The Hybrid *Cystopteris fragilis* x *C. tenuis* (Dryopteridaceae) and the Relationship Between Its Tetraploid Progenitors. *Systematic Botany* **20**: 528–545.
- Pangua E, Quintanilla LG, Sancho A, Pajarón S. 2003.** A Comparative Study of the Gametophytic Generation in the *Polystichum aculeatum* Group (Pteridophyta). *International Journal of Plant Sciences* **164**: 295–303.
- Paris CA. 1989.** Cryptic Species, Species Delimitation, and Taxonomic Practice in the Homosporous ferns. *American Fern Journal* **79**: 40–54.
- Park C-H, Kato M. 2003.** Apomixis in the interspecific triploid hybrid fern *Cornopteris christenseniana* (Woodsiaceae). *Journal of Plant Research* **116**: 93–103.
- Parks JC, Dyer AF, Lindsay S. 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.
- Pinter I. 1995.** Progeny studies of the fern hybrid *Polystichum* x *bicknellii* (Dryopteridaceae: Pteridophyta). *Fern Gazette* **15**: 25–40.
- PPG I. 2016.** A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *Journal of Systematics and Evolution* **9999**: 1–40.
- Quintanilla LG, Escudero A. 2006.** Spore fitness components do not differ between diploid and allotetraploid species of *Dryopteris* (Dryopteridaceae). *Annals of Botany* **98**: 609–618.
- R Core Team. 2017.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.
- Raghavan V. 1989.** *Developmental biology of fern gametophytes* (PW Barlow, D Bray, PB Green, and JMW Slack, Eds.). New York: Cambridge University Press.
- Ranker TA, Haufler CH. 2008.** *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ranker TA, Houston HA. 2002.** Is Gametophyte Sexuality in the Laboratory a Good Predictor of Sexuality in Nature? *American Fern Journal* **92**: 112–118.
- Rothfels CJ, Johnson AK, Windham MD, Pryer KM. 2014.** Low-copy nuclear data confirm rampant allopolyploidy in the Cystopteridaceae (Polypodiales). *Taxon* **63**: 1026–1036.
- Rothfels CJ, Sundue MA, Kuo L-Y, Larsson A, Kato M, Schuettpelz E, Pryer KM. 2012.** A revised family-level classification for eupolypod II ferns (Polypodiidae: Polypodiales). *Taxon* **61**: 515–533.
- Rothfels CJ, Windham MD, Pryer KM. 2013.** A Plastid Phylogeny of the Cosmopolitan Fern Family Cystopteridaceae (Polypodiopsida). *Systematic Botany* **38**: 295–306.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012.** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**: 671.
- Schneller JJ, Haufler CH, Ranker TA. 1990.** Antheridiogen and Natural Gametophyte Populations. *American Fern Journal* **80**: 143–152.

- Schneller J, Krattinger K. 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.
- Schneller JJ, Rasbach H. 1984.** Hybrids and polyploidy in the genus *Athyrium* (Pteridophyta) in Europe. *Botanica Helvetica* **94**: 81–99.
- Sleep A. 2014.** Hybridization in *Polystichum* (Dryopteridaceae: Pteridophyta). *The Fern Gazette* **19**: 319–341.
- Soltis PS, Marchant DB, Van de Peer Y, Soltis DE. 2015.** Polyploidy and genome evolution in plants. *Current opinion in genetics & development* **35**: 119–125.
- Soltis DE, Soltis PS. 1987.** Polyploidy and Breeding Systems in Homosporous Pteridophyta: A Reevaluation. *The American Naturalist* **130**: 219–232.
- Testo WL, Watkins JE, Barrington DS. 2015.** Dynamics of asymmetrical hybridization in North American wood ferns: Reconciling patterns of inheritance with gametophyte reproductive biology. *New Phytologist* **206**: 785–795.
- Tryon AF, Lugardon B. 1991.** *Spores of the Pteridophyta: surface, wall structure, and diversity based on electron microscope studies*. New York: Springer Verlag.
- Vida G. 1970.** The nature of polyploidy in *Asplenium ruta-muraria* L. and *A. lepidum* C. Presl. *Caryologia* **23**: 525–547.
- Vida G. 1974.** Genome analysis of the European *Cystopteris fragilis* complex: 1. Tetraploid taxa. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae* **20**: 181–192.
- Vida G, Mohay J. 1980.** Cytophotometric DNA studies in polyploid series of the fern genus *Cystopteris* Bernh. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae* **26**: 455–461.
- Vogel JC, Rumsey FJ, Schneller JJ, Barret JA, Gibby M. 1999.** Where are the glacial refugia in Europe? Evidence from pteridophytes. *Biological Journal of the Linnean Society* **66**: 23–37.
- Wagner WH, Wagner FS, Taylor WC. 1986.** Detecting Abortive Spores in Herbarium Specimens of Sterile Hybrids. *American Fern Journal* **76**: 129–140.
- Walker TG. 1958.** Hybridization in Some Species of *Pteris* L. *Evolution* **12**: 82–92.
- Werth CR, Windham MD. 1991.** A Model for Divergent, Allopatric Speciation of Polyploid Pteridophytes Resulting from Silencing of Duplicate-Gene Expression. *The American Naturalist* **137**: 515–526.
- Windham MD, Yatskievych G. 2003.** Chromosome studies of cheilanthoid ferns (Pteridaceae: Cheilanthoideae) from the western United States and Mexico. *American Journal of Botany* **90**: 1788–1800.
- Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB, Rieseberg LH. 2009.** The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 13875–13879.
- Wubs ERJ, de Groot GA, During HJ, Vogel JC, Grundmann M, Bremer P, Schneider H. 2010.** Mixed mating system in the fern *Asplenium scolopendrium*: implications for colonization potential. *Annals of Botany* **106**: 583–590.
- Zhang KM, Liu BD, Fang YM, Shi L, Tang SJ. 2011.** Studies on the Gametophytes of Eight Chinese Species of *Dryopteris* (Dryopteridaceae). *American Fern Journal* **101**: 12–24.

8. Přílohy

Příloha 1: Seznam lokalit a rostlin z předchozí studie (Hanušová *et al.*, in prep.), které byly použity k měření velikosti výtrusů. Všechny položky budou uloženy v herbářových sbírkách Univerzity Karlovy (PRC).

stát	lokality	souřadnice	nadmořská výška (m. n. m.)	ploidie (počet jedinců)	průměrná velikost výtrusů (μm)
Česká republika	Smržovka	46°37'39.5"N 13°38'45.5"E	595	4x (1) 5x (1) 6x (2)	43,93 64,70 47,96
Česká republika	Jeseníky Tabulové kameny	50°05'12.1"N 17°13'51.3"E	1450	4x (2)	44,04
Česká republika	Josefův důl	50°46'52.5"N 15°14'09.4"E	584	6x (2)	44,23
Česká republika	Jeseníky Hamrová	50°12'21.3"N 17°14'05.7"E	549	6x (2)	46,96
Česká republika	Jeseníky Mladkov	50°05'34.3"N 16°37'37.1"E	366	6x (2)	45,15
Česká republika	Bečov nad Teplou	50°03'01.3"N 12°49'30.7"E	560	4x (2)	42,08
Česká republika	Chodová Planá	49°53'35.9"N 12°43'34.6"E	525	4x (2)	42
Česká republika	Mnichov	50°02'12.1"N 12°46'23.2"E	695	6x (1)	44,67
Česká republika	Mukařov	50°38'44.4"N 14°18'03"E	355	4x (1)	38,59
Česká republika	Česká Kamenice	50°47'55"N 14°24'59.8"E	375	4x (2)	41,8
Česká republika	Líska (Česká Kamenice)	50°49'05"N 14°26'57.6"E	421	6x (2)	46,4
Česká republika	Oheb	49°49'58.6"N 15°39'12.3"E	530	5x (1)	43,40

stát	lokality	souřadnice	nadmořská výška (m. n. m.)	ploidie (počet jedinců)	průměrná velikost výtrusů (μm)
Česká republika	Jeseníky	50°02'28.5"N 17°11'59.3"E	1352	5x (2)	49,05
Francie	Gédre	42°52'28.4"N 00°01'11.5"E	1020	6x (2)	47,58
Francie	Ferette	47°29'42"N 07°19'2.9"E	462	6x (2)	41,8
Francie	Puy Griou	45°03'06.9"N 02°42'23.3"E	1100	4x (2) 5x (4)	42,1 40,11
Itálie	Aosta	45°43'17.3"N 07°19'04.9"E	717	6x (2)	44,62
Makedonie	Galičica	40°58'03.4"N 20°48'53.1"E	1352	6x (1)	47,40
Makedonie	Ribnica	41°43'12.4"N 20°37'30"E	1220	4x (2)	44,41
Německo	Bad Schandau	50°55'25.1"N 14°09'14.2"E	160	4x (2)	44,35
Norsko	Malmoya	59°51'52.7"N 10°45'08.3"E	40	4x (1)	38,46
Norsko	Bomlo	46°13'05.6"N 24°47'27.1"E	2	4x (1)	43,24
Norsko	Skuleskogen	63°06'28.7"N 18°30'02.6"E	200	4x (1)	41,09
Norsko	Dovrefjell	62°17'44.8"N 09°35'43.7"E	905	4x (2)	41,26
Norsko	Folgefonna	60°02'40.8"N 06°27'46"E	330	4x (2)	42,35
Norsko	Rondane	61°48'18.8"N 09°34'53.8"E	428	4x (3) 6x (3)	41,83 46,65
Polsko	Pobiedna	50°56'11.3"N	451	6x (1)	49,85

stát	lokalita	souřadnice	nadmořská výška (m. n. m.)	ploidie (počet jedinců)	průměrná velikost výtrusů (μm)
		15°17'41.6"E			
Rakousko	Bleiberg Notsch	46°37'39.5"N 13°38'45.5"E	940	6x (1)	49,93
Rakousko	Petzen	46°30'38"N 14°47'27.1"E	1858	6x (2)	44,52
Rakousko	Hochobir	46°30'09"N 14°46'07"E	1657	6x (1)	43,92
Rakousko	Bellever	46°13'05.6"N 24°47'27.1"E	NA	5x (2)	50,15
Rumunsko	Scărița Belioara	46°29'32"N 23°23'06"E	1113	6x (1)	45,12
Rumunsko	Sighisoara	46°13'05.6"N 24°47'27.1"E	910	6x (1)	40,21
Slovinsko	Vršic	46°25'51.7"N 13°44'53.7"E	1665	6x (3)	42,14
Slovinsko	Predel	46°25'14.6"N 13°35'12.3"E	1151	6x (3)	44,24
Srbsko	Suva Planina	43°09'18.6"N 22°07'06.6"E	464	4x (2)	42,62
Španělsko	San Millán de la Cogolla	42°17'05.8"N 02°54'57.9"E	1503	4x (1)	37,16
Španělsko	Hoya de la Mora	37°04'27.8"N 03°23'04.3"E	2684	4x (2)	41,39
Španělsko	Ezcaray	42°16'54.8"N 02°57'38.7"E	1453	4x (4)	41,2

Příloha 2: Počet sporofytů P generace použitých v dílčích studiích.

označení	lokality	průtoková cytometrie	výsev výtrusů	průtoková cytometrie výtrusů	SAI	velikost výtrusů	počet výtrusů na jednu výtrusnici	experimentální hybridizace
ROZ	Roztoky u Křivoklátu	182	50	9	37	18	4	14
BEL	Bělá pod Pradědem	49	24	14	44	16	5	7
NOV	Nové Město nad Metují	49	7	0	8	0	3	9
OHB	Oheb	45	10	3	15	6	8	3
RAD	Velký Radzim	14	4	0	3	0	0	0
ZAD	Záďiel	15	0	0	0	0	0	0
OPA	Oparno	11	5	0	4	0	0	0
Celkem:		365	99	26	111	40	20	33

Příloha 3: SAI (*spore abortion index*) – % neživotaschopných výtrusů u jednotlivých jedinců. Označení lokalit: ROZ – Roztoky u Křivoklátu, RAD – Radzim, OPA – Oparno, OHB – Oheb, NOV – Nové Město nad Metují, BEL – Bělá pod Pradědem.

číslo	rostlina	ploidie	lokalita	vyvinuté	abortované	SAI (%)
1	1E1	4x	ROZ	966	34	3,4
2	1C3	4x	ROZ	941	59	5,9
3	1H1	4x	ROZ	918	82	8,2
4	1I2	4x	ROZ	787	213	21,3
5	1I3	4x	ROZ	985	15	1,5
6	1I4	4x	ROZ	986	16	1,6
7	1J2	4x	ROZ	936	64	6,4
8	1J7	4x	ROZ	860	140	14
9	1L3	4x	ROZ	924	76	7,6
10	1S1-1	4x	ROZ	921	39	3,9
11	1S1-7	4x	ROZ	955	45	4,5
12	1J3	5x	ROZ	7	993	99,3
13	1J6	5x	ROZ	484	516	51,6
14	1J10	5x	ROZ	17	983	98,3
15	1J11	5x	ROZ	22	978	97,8
16	1J13	5x	ROZ	17	983	98,3
17	1J14	5x	ROZ	26	974	97,4
18	1J15_R1	5x	ROZ	0	1000	100
19	1J15_R2	5x	ROZ	28	972	97,2
20	1J16	5x	ROZ	0	1000	100
21	1J19	5x	ROZ	0	1000	100
22	1K10	5x	ROZ	26	976	97,6
23	1K19_R1	5x	ROZ	21	979	97,9
24	1K19_R2	5x	ROZ	16	984	98,4
25	1K9	5x	ROZ	0	1000	100
26	1M27	5x	ROZ	13	987	98,7
27	1S2-4	5x	ROZ	0	1000	100
28	1S2-5	5x	ROZ	14	986	98,6
29	1S2-6	5x	ROZ	1	999	99,9
30	1S2-7	5x	ROZ	0	1000	100
31	1S2-8	5x	ROZ	15	985	98,5
32	1S2-9	5x	ROZ	6	994	99,4
33	1K18	6x	ROZ	971	29	2,9
34	1M23	6x	ROZ	880	120	12
35	1M24	6x	ROZ	962	31	3,1
36	1M25	6x	ROZ	967	33	3,3
37	1M26	6x	ROZ	963	37	3,7
38	312	5x	RAD	0	1000	100
39	36	5x	RAD	3	997	99,7
40	33	5x	RAD	0	1000	100

číslo	rostlina	ploidie	lokalita	vyvinuté	abortované	SAI (%)
41	73	4x	OPA	946	54	5,4
42	74	4x	OPA	951	49	4,9
43	76	4x	OPA	902	98	9,8
44	78	4x	OPA	917	83	8,3
45	512	5x	OHB	3	997	99,7
46	522	5x	OHB	11	989	98,9
47	523	5x	OHB	7	993	99,3
48	529	5x	OHB	10	990	99
49	530	5x	OHB	22	978	97,8
50	532	5x	OHB	15	985	98,5
51	533	5x	OHB	0	1000	100
52	537	5x	OHB	4	996	99,6
53	527	6x	OHB	944	56	5,6
54	534	6x	OHB	907	93	9,3
55	53	6x	OHB	884	116	11,6
56	59	6x	OHB	947	53	5,3
57	57	6x	OHB	946	54	5,4
58	511	6x	OHB	976	24	2,4
59	527	6x	OHB	897	103	10,3
60	47	4x	NOV	961	39	3,9
61	48	4x	NOV	936	64	6,4
62	422	4x	NOV	932	68	6,8
63	427	4x	NOV	956	44	4,4
64	438	4x	NOV	959	41	4,1
65	419	6x	NOV	953	47	4,7
66	421	6x	NOV	973	27	2,7
67	421	6x	NOV	879	121	12,1
68	23	4x	BEL	952	48	4,8
69	25	4x	BEL	852	148	14,8
70	26	4x	BEL	743	257	25,7
71	28	4x	BEL	922	78	7,8
72	29	4x	BEL	779	221	22,1
73	214	4x	BEL	971	29	2,9
74	217	4x	BEL	967	33	3,3
75	220	4x	BEL	946	54	5,4
76	221	4x	BEL	988	12	1,2
77	232	4x	BEL	819	181	18,1
78	234	4x	BEL	962	38	3,8
79	238	4x	BEL	967	33	3,3
80	239	4x	BEL	970	30	3
81	240	4x	BEL	932	68	6,8
82	247	4x	BEL	950	50	5
83	246	4x	BEL	989	11	1,1
84	210	5x	BEL	139	861	86,1

číslo	rostlina	ploidie	lokalita	vyvinuté	abortované	SAI (%)
85	211	5x	BEL	214	786	78,6
86	212	5x	BEL	159	841	84,1
87	218	5x	BEL	118	882	88,2
88	223	5x	BEL	84	916	91,6
89	224	5x	BEL	114	886	88,6
90	225	5x	BEL	9	991	99,1
91	226	5x	BEL	2	998	99,8
92	227	5x	BEL	9	991	99,1
93	228	5x	BEL	2	998	99,8
94	229	5x	BEL	109	891	89,1
95	231	5x	BEL	36	964	96,4
96	236	5x	BEL	149	851	85,1
97	241	5x	BEL	7	993	99,3
98	242	5x	BEL	0	1000	100
99	243	5x	BEL	2	998	99,8
100	244	5x	BEL	3	997	99,7
101	245	5x	BEL	239	761	76,1
102	248	5x	BEL	8	992	99,2
103	249	5x	BEL	0	1000	100
104	Bělá 2	5x	BEL	18	982	98,2
105	Bělá 3	5x	BEL	16	984	98,4
106	Bělá 4	5x	BEL	4	996	99,6
107	Bělá 5	5x	BEL	8	992	99,2
108	Bělá 6	5x	BEL	18	982	98,2
109	Bělá 7	5x	BEL	0	1000	100
110	Bělá 8	5x	BEL	6	994	99,4
111	Bělá 9	5x	BEL	20	980	98

Příloha 4: Počet výtrusů na jednu výtrusnici u jednotlivých rostlin. Označení lokalit: ROZ – Roztoky u Křivoklátu, OHB – Oheb, NOV – Nové Město nad Metují, BEL – Bělá pod Pradědem.

výtrusnice č.	rostlina	ploidie	lokalita	celkem
1	1113	4x	ROZ	62
2	1113	4x	ROZ	55
3	1113	4x	ROZ	56
4	1113	4x	ROZ	59
5	1113	4x	ROZ	42
6	1113	4x	ROZ	59
7	112	4x	ROZ	51
8	112	4x	ROZ	64
9	112	4x	ROZ	60
10	234	4x	BEL	61
11	234	4x	BEL	36
12	234	4x	BEL	55
13	234	4x	BEL	64
14	234	4x	BEL	62
15	234	4x	BEL	59
16	234	4x	BEL	56
17	234	4x	BEL	57
18	234	4x	BEL	58
19	234	4x	BEL	60
20	416	4x	NOV	46
21	416	4x	NOV	38
22	416	4x	NOV	44
23	416	4x	NOV	52
24	416	4x	NOV	53
25	445	4x	NOV	64
26	445	4x	NOV	32
27	445	4x	NOV	49
28	445	4x	NOV	53
29	445	4x	NOV	58
30	445	4x	NOV	61
31	446	4x	NOV	50
32	446	4x	NOV	64
33	446	4x	NOV	64
34	446	4x	NOV	56
35	446	4x	NOV	57
36	446	4x	NOV	63
37	223	5x	BEL	25
38	223	5x	BEL	9
39	223	5x	BEL	32
40	223	5x	BEL	12

výtrusnice č.	rostlina	ploidie	lokalita	celkem
41	223	5x	BEL	13
42	223	5x	BEL	28
43	223	5x	BEL	14
44	248	5x	BEL	0
45	248	5x	BEL	12
46	248	5x	BEL	8
47	248	5x	BEL	0
48	248	5x	BEL	22
49	248	5x	BEL	11
50	248	5x	BEL	24
51	1K8	5x	ROZ	7
52	1K8	5x	ROZ	0
53	1K8	5x	ROZ	12
54	230	5x	BEL	24
55	230	5x	BEL	19
56	230	5x	BEL	14
57	230	5x	BEL	21
58	230	5x	BEL	32
59	230	5x	BEL	26
60	230	5x	BEL	28
61	229	5x	BEL	10
62	229	5x	BEL	21
63	229	5x	BEL	26
64	229	5x	BEL	22
65	229	5x	BEL	11
66	229	5x	BEL	27
67	229	5x	BEL	18
68	530	5x	OHB	12
69	530	5x	OHB	15
70	530	5x	OHB	17
71	530	5x	OHB	10
72	530	5x	OHB	14
73	530	5x	OHB	21
74	530	5x	OHB	10
75	533	5x	OHB	25
76	533	5x	OHB	14
77	533	5x	OHB	19
78	533	5x	OHB	23
79	533	5x	OHB	20
80	533	5x	OHB	32
81	533	5x	OHB	23
82	512	5x	OHB	14
83	512	5x	OHB	17
84	512	5x	OHB	13

výtrusnice č.	rostlina	ploidie	lokalita	celkem
85	512	5x	OHB	16
86	512	5x	OHB	22
87	512	5x	OHB	26
88	512	5x	OHB	18
89	522	5x	OHB	25
90	522	5x	OHB	14
91	522	5x	OHB	28
92	522	5x	OHB	30
93	522	5x	OHB	22
94	522	5x	OHB	29
95	522	5x	OHB	25
96	529	5x	OHB	20
97	529	5x	OHB	24
98	529	5x	OHB	25
99	529	5x	OHB	23
100	529	5x	OHB	24
101	529	5x	OHB	18
102	529	5x	OHB	26
103	537	5x	OHB	18
104	537	5x	OHB	24
105	537	5x	OHB	27
106	537	5x	OHB	30
107	537	5x	OHB	19
108	537	5x	OHB	25
109	537	5x	OHB	16
110	532	5x	OHB	15
111	532	5x	OHB	9
112	532	5x	OHB	16
113	532	5x	OHB	22
114	532	5x	OHB	32
115	532	5x	OHB	22
116	532	5x	OHB	27
117	1J4	6x	ROZ	36
118	1J4	6x	ROZ	36
119	1J4	6x	ROZ	54
120	1J4	6x	ROZ	57
121	1J4	6x	ROZ	32
122	1J4	6x	ROZ	36
123	544	6x	OHB	59
124	544	6x	OHB	30
125	544	6x	OHB	45
126	544	6x	OHB	24
127	544	6x	OHB	33
128	544	6x	OHB	47

výtrusnice č.	rostlina	ploidie	lokalita	celkem
129	544	6x	OHB	35

Příloha 5: Popularizační článek na téma reprodukčních systémů u kapradin v časopise Živa.

Jan Ptáček, Tomáš Urfus, Libor Ekrt: Tajnosnubnost aneb Pohled „pod zástěru“ na reprodukční strategie cévnatých výtrusných rostlin. 282-285. Živa 6/2017.

Jan Ptáček, Tomáš Urfus, Libor Ekrt

Tajnosnubnost aneb Pohled „pod zástěru“ na reprodukční strategie cévnatých výtrusných rostlin

Se základním principem životního cyklu, tedy rodozměnou cévnatých výtrusných rostlin – plavuní (*Lycopodiopsida*) a kapradorostů (*Monilophyta*), se pravděpodobně setkal ve škole téměř každý. Specifické střídání pohlavní a nepohlavní fáze, které jsou na sobě prostorově a nutričně naprosto nezávislé, představuje zcela unikátní mechanismus ve srovnání s ostatními cévnatými rostlinami. Jako vývojově primitivnější rostliny mnohdy boří zažitá dogmata typická pro jiné cévnaté – např. že jednotlivá vývojová stadia mohou být u kapradin nezávislá na počtu chromozomů (ploidní sádce), nebo že stadia typicky diploidní mohou být polyploidní a naopak. Následující článek nabízí podrobnější pohled na způsob reprodukce u výtrusných rostlin, jejichž tajnosnubnost nemusí být pojímána pouze jako suchopárný výčet jednotlivých fází rodozměny, ale jako velmi zajímavý děj odhalující aspekty jak ze života dinosaurů nebo spíše trilobitů rostlinné říše, tak přízpusobivých modernistů.

Životní cyklus cévnatých výtrusných rostlin

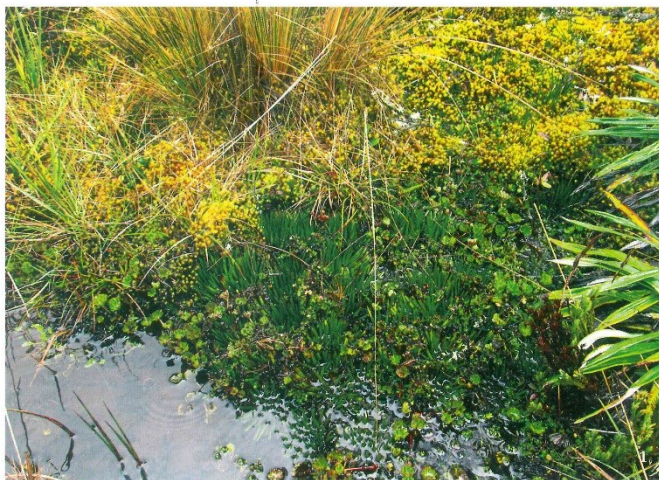
V rodozměně kapradorostů a plavuní se střídají dvě morfologicky a cytogeneticky jednoznačně odlišitelné fáze – drobná pohlavní (gametofytická), která je zpravidla haploidní, a nepohlavní (sporofytická), zpravidla diploidní; obě generace žijí samostatně a volně. V průběhu evoluce cévnatých rostlin existuje jednoznačný trend v postupném převládání sporofytu nad pohlavní gametofytickou fází.

Náš pteridologický příběh (pteridologie je vědní obor zabývající se kapradorosty) zde začíná ve výtrusnicích (obr. 2), které se nacházejí nejčastěji na spodní straně listů

mezi okrajem a střední žilkou (u většiny kapradin) nebo ve výtrusnicovém klasu (strobilu, např. u přesliček a plavuní). Podle různé historie vzniku je tradičně dělíme do dvou morfologicky odlišných typů. Starší typ výtrusnice – eusporangiátní – vzniká z většího počtu iniciálních buněk, je vícevrstevná, obsahuje velké množství výtrusů a nevytváří speciální struktury. Vyskytuje se u plavuní a všech prastarých linií kapradin, jako jsou přesličkovité (*Equisetaceae*), hadilkovité (*Ophioglossaceae*), nahoprutkovité (*Psilotaceae*) a tropické maraciovité (*Marattiaceae*), jejichž nejznámějším a velmi často pěstovaným zástupcem v botanických zahradách je mohutná obrová

nadměrná (*Angiopteris evecta*, její listy mohou měřit až 8 m). Modernější a odvozenější typ výtrusnice – leptosporangiátní (obr. 3) – vzniká z jedné iniciální buňky a je tudíž jednovrstevná. Ve výtrusnicích se nacházejí sporogenní buňky, které čtyřmi po sobě následujícími mitotickými děleními dávají vzniknout mateřské buňce spory (sporocytu). Z jedné sporogenní buňky se tak zakládá 16 mateřských buněk. Ty podléhají meiotickému dělení a z buněk s plnou sadou chromozomů se stane 64 haploidních výtrusů (obr. 5a). Pokud by nás zajímalo, kolik taková kapradina vyprodukuje za rok výtrusů, můžeme se dobrat následujících čísel. Např. běžný druh středoevropských lesů kaprad ostěnkátá (*Dryopteris carthusiana*) má průměrně 7 listů a každý může nést přibližně 116 tisíc výtrusnic. Po vynásobení počtem výtrusů dojdeme k číslu téměř 52 milionů na rostlinu. V extrémních případech mohou některé stromové tropické kapradiny s velkými listy vyprodukovat za rok až neuvěřitelných 30 miliard výtrusů.

Výtrusy leptosporangiátních druhů jsou doslova katapultovány z vlastní kapsle výtrusnice díky specifickým útvarům, jako je obústí (stomium) a zejména prstenec (annulus). V prstenci během zrání výtrusů dochází k vysychání a interakcemi s dalšími fyzikálními a chemickými vlastnostmi vody (kohezní síly, polarita aj.) a při správné konstelaci výše uvedených jevů je obsah výtrusnice vystřelen pomocí prstence do prostoru (obr. 4). Výtrusy kapradin mohou být jednoduše oválné s jednou rýhou uprostřed (monokolpátní) nebo trojboké s třemi rýhami (trikolpátní). V průběhu evoluce kapradorostů se monokolpátní typy koncentrují především ve skupinách moderních, zatímco starší a prehistorické typy kapradin mají výtrusy trikolpátní. Je zajímavé, že přesně opačný trend pozorujeme u pylových zrn krytosemenných rostlin, kdy primitivní linie mají spíše pyl monokolpátní a typy odvozené z kapradin. Na rozdíl od pylu rostlin však výtrusy nemohou způsobovat alergie, jelikož nemají receptivní proteiny na svém povrchu. Z pohledu velikosti mohou kapradiny tvořit velikostně stejnocenné typy výtrusů – izosporické (obr. 7), o velikostech ca 25–50 μm, které se vyskytují u převážné většiny linií kapradorostů. Výjimku představují heterosporické typy s dvěma velikostními frakcemi výtrusů (obrovské samičí megasporý o průměru 1 000 μm a malé samčí mikrosporý ca 20 μm, obr. 8). Z přibližně 300 rodů kapradorostů se heterosporické typy nacházejí pouze u 7, jako je vraneček (*Sela-*



ziva.avcr.cz

282

Živa 6/2017

- 1 Šídlatka (*Isoetes*) – jeden ze 7 heterosporických rodů kapradin, tedy s velkými samičími megasporami a malými samčími mikrosporami. Guamaní, Ekvádor
- 2 Otevřená výtrusnice uspořádané do kupek a umístěné na spodní straně listu puchýřníku křehkého (*Cystopteris fragilis*)
- 3 Prázdňá leptosporangiátní výtrusnice puchýřníku křehkého (jednovrstevná, pocházející z jedné buňky) s jasně patrným prstencem (annulus)
- 4 Proces uvolnění výtrusů z výtrusnice pomocí prstence v interakci s fyzikálními a chemickými silami. Orig. M. Slosson (1906)

ginella), šídlatka (*Isoetes*, obr. 1), azolka (*Azolla*), marsilka (*Marsilea*), míčovka (*Pilularia*, obr. 8), *Regnellidium* a nepukalka (*Salvinia*). Právě nepatrné rozměry výtrusů umožňují účinný dálkový přenos a osídlování nových stanovišť. Není proto divu, že řada druhů výtrusných rostlin může dosahovat kosmopolitního rozšíření. Jedním z příkladů kapradiny, která osídliła všechny kontinenty kromě Antarktidy, je hasivka orličí (*Pteridium aquilinum*).

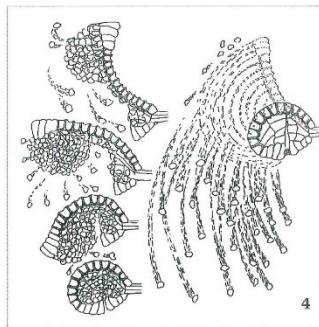
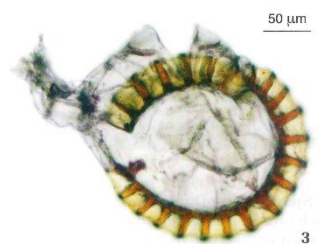
Další kapitolou je klíčení výtrusu a následný vznik gametofytu (prokel, prvoklíček, prothallium, obr. 9), na němž se vytvářejí gamety. Proces klíčení bývá zpravidla dlouhodobá záležitost na 10–20 dní v případě „normálních“ nezelených výtrusů, u výtrusů obsahujících chlorofyl jsou to řádově dny, kdy dochází k jejich klíčení. Výtrusy kapradin na druhou stranu zůstávají velmi dlouho životaschopné a jsou známy případy, kdy došlo k vyklíčení i po 200 letech. Musejí být schopny přežít dálkový přenos a ultrafialové záření ve vyšších vrstvách atmosféry. Jak jsme již uvedli, lze se však setkat i se zelenými výtrusy obsahujícími chlorofyl, které se vyznačují velice krátkou životaschopností (2–6 týdnů) oproti nezeleným výtrusům, a nalezneme je např. u čeledi blánatcovitých (*Hymenophyllaceae*) a onokleovitých (*Onocleaceae*).

Vzniklý gametofyt bývá zpravidla zelený a nadzemní, u některých skupin je však nezelený podzemní (plavuně, hadilkovité, nahoprutkovité), nebo je součástí výtrusu (vranečky, šídlatky, vodní kapradiny, viz obr. 8). Samičí gametangia se nazývají zárodečníky (archegonia) a produkují vaječné buňky, zatímco samčí pelatky (anteridia) vytvářejí bičkaté spermatozoidy. Za vhodných podmínek ve vlhkém prostředí dochází k oplození, kdy se roztočený spermatozoid provrtá k vaječné buňce, vzniká zygota a nový sporofyt. To je základní schéma, které na dalších řádcích rozšíříme o současné znalosti a zkomplikujeme procesy, které z něj vybočují.

Pohlavní rozmnožování

Oboupohlavní gametofyt umožňuje u výtrusných rostlin tři typy pohlavního rozmnožování: samooplození v rámci jednoho gametofytu (gametofytické samooplození, intragametophytic selfing), samooplození dvou gametofytů od stejného rodiče (sporofytické samooplození, intergametophytic selfing) a splynutí dvou gamet od geneticky odlišných rodičů (sporofytický outcrossing, intergametophytic crossing). Oba typy samooplození lze chápat jako analogii samosprášení (autogamie) u krytosemenných rostlin. U heterosporických skupin rostlin samozřejmě nepřichází první příklad u úvalu. U výtrusných rostlin často dochází ke kombinaci výše uvedených typů pohlavní reprodukce a označujeme ji termínem kombinované rozmnožování (mixed mating). Gametofytické samooplození je výhodné při kolonizaci dosud neosídlených stanovišť (zvláště při dálkovém přenosu – long distance dispersal), zatímco sporofytický outcrossing hraje hlavní roli v udržení genetické variability populace.

Předpokládá se, že 44 % kapradin je neopolyploidních – k polyploidizaci neboli znásobení chromozomové sádky u nich



došlo v nedávné minulosti (viz také Živa 2009, 5: 204–208). Právě polyploidizace má velký vliv na reprodukční strategii cévnatých výtrusných rostlin. Polyploidní kapradorosty si mohou dovolit výrazně větší podíl samooplození, jelikož se znásobením počtu chromozomů brání inbrední depresi (stavu, kdy mají jedinci nižší fitness, tedy menší schopnost přežívání a rozmnožování kvůli samooplození), a ta je ohrožuje mnohem méně než jejich diploidní předky. Polyploidie značně ovlivňuje účinnost anteridiogenů (viz níže), velikost a morfologii gametangií a rychlost spermatozoidů.

Jelikož se anteridia a archegonia nacházejí v těsné blízkosti, předpokládá se, že oplození v rámci jednoho gametofytu je běžným jevem. K úspěšné existenci druhů je však zapotřebí patřičná genetická variabilita, zajišťovaná asynchronním dozráváním

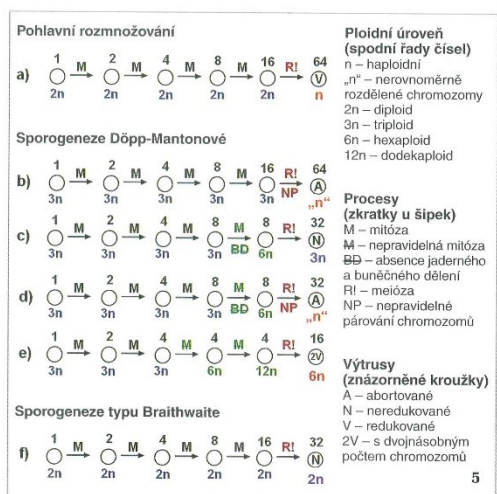
ním gametangií (ve většině případů se nejprve tvoří anteridia, až později archegonia). Izosporické kapradiny se vyznačují unikátní labilní determinací pohlaví, což znamená, že existuje řada faktorů, které mohou mít na vznikající pohlaví vliv a které ho určují. Bylo zjištěno, že jde o světlo, teplotu, půdní vlastnosti a další ekologické faktory. Dále asi nejvýznamnějším faktorem určení pohlaví u kapradin, jež zajišťují u mnoha druhů funkčně jednopohlavně gametofyty, jsou anteridiogeny – fytohormonům podobné látky příbuzné známějším gibberelinům. Anteridiogeny jsou tvořeny plně vyvinutým samičím gametofytem. Jejich vylučování zajišťuje u sousedních gametofytů tvorbu samčích anteridií. Pokud dojde k oplození vaječné buňky, gametofyt přestane produkovat anteridiogeny a sousední samčí gametofyty se až pak mohou stát samičími nebo oboupohlavními. Předpokládá se, že tato regulace existuje u převážné většiny izosporických kapradin.

Anteridiogeny působí jak v rámci jednotlivých druhů, tak mezidruhově, ale dokonce i mezi různými čeleděmi kapradin. Může to být jeden z mechanismů určujících, do jaké míry se mohou jednotlivé druhy v přirodě křížit. Z modelových příkladů a dokladů ovlivnění hybridizace anteridiogeny jmenujeme křížení mezi severoamerickými druhy rodu puchýřník (*Cystopteris*). Zatímco puchýřník cibulkatý (*C. bulbifera*) neodpovídá na hormonální podnět a tvoří archegonia, *C. protrusa* reaguje tvorbou anteridií. To umožňuje křížení obou druhů za vzniku intermediárních hybridů následně stabilizovaných polyploidizací. Výsledkem je nový ustálený hybridogenní druh *C. tennesseensis* s tetraploidním počtem chromozomů (alotetraploid).

Ačkoliv se v archegoniu nachází více vaječných buněk, po oplození vzniká jediná zygota, z níž se stane jediný sporofyt. Není proto náhoda, že se na obrázcích klíčícího sporofytu setkáme vždy pouze s jednou rostlinou.

Apomixie u kapradin

Pohlavní rozmnožování je hlavní cestou, kterou se kapradiny vydaly. Avšak zhruba 3 % druhů využívají apomixii – nepohlavní rozmnožování prostřednictvím výtrusu, kdy nedochází k oplození (naposledy zmíněno v Živě Bohumilem Němcem – 1906, 6: 178–179). Dřívější odhady okolo 10 % jsou zřejmě nadnesené a pravda se bude nacházet mezi těmito hodnotami. Stále však jde o mnohem větší počet, než jaký se udává u krytosemenných rostlin (0,1 %). Bylo dokázáno, že apomixie vznikla u kapradin několikrát nezávisle na sobě. S vysokou frekvencí se vyskytuje u druhově bohatých čeledí, např. kapradovitých (*Dryopteridaceae*) a křídelnicovitých (*Pteridaceae*). Naopak velmi vzácná je u čeledi osladičovitých (*Polypodiaceae*). V naší flóře jsou apomiktické kapradiny zastoupeny u kapradovitých, např. kapradě Borrerovy (*D. borrieri*) nebo k. tuhé (*D. remota*), a kapradiníkovitých (*Thelypteridaceae*) s druhem bukovinec osladičovitý (*Phegopteris connectilis*). Všechny tyto zmíněné druhy jsou triploidní. Detailní pohled na čeledi s výskytem apomiktického



rozmnožování najdete v tabulce na webových stránkách Živy.

Apomixie (v literatuře také někdy uváděná jako apogamie nebo agamosporie) u kapradin zahrnuje dva procesy. První je tzv. diplosporie, kdy dochází k produkci neredukovaných výtrusů (diplospor) kvůli chybám při sporogenezi (viz schéma Döpp-Mantonové dále). Následně se vyvíjí nový sporofyt ze somatických buněk gametofytu, bez předchozího oplození (apomixie, resp. apogamie), z důvodu chybějících archegonií. Anteridia jsou ve většině případů přítomná a mohou sloužit k rozmnožování mezi apomiktickými a pohlavně se množícími druhy. Apomixie u kapradin je přednostně vázaná na druhy polyploidní s hybridogenním původem (tj. na retikulární neboli síťovitou evoluci – vznik nových taxonů mezidruhovým křížením několika základních druhů, přičemž tyto nové vzniklé druhy jsou si ekologicky, morfoloicky a geneticky podobné). Má tendenci vyskytovat se u rostlin lichých ploidních úrovní – převážně u triploidů, ale vzácněji také u tetraploidů nebo pentaploidů. Nežádá se nepohlavně mohou rozmnožovat i diploidní druhy jako např. u rodu křídelnice (*Pteris*) nebo kapradě (obr. 13). První typ je fakultativní (indukovaná) apomixie pohlavně se rozmnožujících rostlin, jež se ocitly ve stresujících podmínkách, jakými může být zejména nedostatek vody a živin nebo silná expozice slunečnímu záření. K této situaci dochází především při nesprávné manipulaci v laboratoři, v přírodě byla zaznamenána jen v ojedinělých případech, a i ty by si zasloužily přehodnotit. (Pozn.: V apomiktické terminologii došlo mezi pteridology a botaniky k zásadnímu rozporu, jelikož pod pojmem fakultativní apomixie se v krytosemenné části botaniky rozumí smíšený reprodukční způsob, tedy apomixie a pohlavní rozmnožování.)

Obligátní apomixie představuje u kapradin běžnější typ. To je významný rozdíl oproti krytosemenným rostlinám, kde se mnohem častěji setkáváme se smíšenou reprodukční strategií. V životním cyklu takto se rozmnožujících kapradin se vysky-

tuje zvláštní typ sporogeneze. Nejčastější je tzv. schéma Döpp-Mantonové, velmi vzácně naopak sporogeneze typu Braithwaite, oba typy nazvané v polovině 20. stol. podle svých objevitelů.

● Sporogenezé Döpp-Mantonové

Schéma Döpp-Mantonové (obr. 5b až 5e) zahrnuje čtyři různé typy sporogeneze, které se liší svým produktem. Stejně jako u pohlavního rozmnožování se začíná sporogenní buňkou, která prochází třemi následnými mitotickými děleními, jež dávají vzniknout 8 buňkám. Jedinou výjimkou je poslední typ (obr. 5e), kdy závěrečná dvě mitotická dělení končí již v anafázi (části mitotického dělení, kdy dochází k rozchodu oddělených chromozomů k opačným pólům jádra). Dva typy apomiktické sporogeneze mají problém s mitózou, jaderným a buněčným dělením (obr. 5c, 5d), která jsou v některých případech kombinovaná s nesprávným párováním chromozomů. Důležitě je zmínit, že pouze u dvou typů apomiktické sporogeneze vznikají životaschopné výtrusy v klasických tetradách, a to o stejné ploidii jako sporofyt, nebo s dvojnásobným počtem chromozomů, než má sporofyt (obr. 5c, 5e). V ostatních případech vznikají neživotaschopné (abortované) výtrusy.

● Sporogenezé typu Braithwaite

Tento typ je oproti schématu Döpp-Mantonové vzácnější, poprvé byl pozorován u sleziníku *Asplenium aethiopicum*. Začíná však stejně. Čtyři mitotická dělení dají vzniknout 16 mateřským buňkám. Při následném meiotickém dělení se bivalenty chromozomů rozpadnou na osamocené univalenty. Znovu se sestavuje jádro a vzniká 32 životaschopných neredukovaných výtrusů uspořádaných unikátně v diádách (obr. 5f).

Z výše uvedeného by se mohlo zdát, že pro stanovení apomiktického rozmnožování u leptosporangiálních kapradin stačí spočítat výtrusy v jedné výtrusnici, neboť teoretická schémata ukazují, že pohlavní rozmnožování vede k 64 redukovaným výtrusům v 16 tetradách, zatímco apomikti-

mají 32 neredukovaných výtrusů v 8 tetradách nebo v 16 diádách. Tyto základní počty jsou směrodatné pro většinu apomiktických druhů leptosporangiálních kapradin, avšak v případě křížení sexuálních a apomiktických druhů se objevují také jiné výsledky. I díky probíhajícímu výzkumu se ukazuje, že počty nemusejí odpovídat teoretickým schématům. Na konci dělení se mohou vytvářet místo diád triády a tetrády. Také se ukazuje, že u kapradin mohou v jedné výtrusnici dokonce probíhat všechny čtyři typy sporogeneze najednou!

● Aposporie

V rámci tohoto okrajového, avšak pozoruhodného typu reprodukce kapradin vzniká gametofyt přímo ze sporofytického pleťva. Podobá se standardně založenému v pohlavním procesu, a co víc, může mít na sobě funkční gametangia. Jelikož takto vzniklý gametofyt nese stejný počet chromozomů jako rodičovský sporofyt, jde o jednu z možných cest polyploidizace kapradin. Tento zvláštní typ apomixie umožňuje nepohlavní rozmnožování kapradin v umělých podmínkách (aposporii lze indukovat). V přírodě byla nalezena jen u několika druhů, např. u jeleního jazyku celolistého (*Asplenium scolopendrium*).

Vegetativní rozmnožování

Jde o způsob reprodukce, který se může odehrávat jak u gametofytu, tak sporofytu. Zatímco u běžnějšího lupenitého proklu se nevyskytuje, u provazovitého (filamentárního) gametofytu lze najít zajímavé útvary – gemiferní soudečkovité buňky, na jejichž konci se uvolňují rohlíčkovité gemy – množilky (mnohobuněčné nepohlavní propagule), které slouží k vegetativnímu rozmnožování. Vzhledem ke schopnosti těchto gametofytů rozmnožovat se svépomocí, mohou vytvářet rozsáhlé kolonie (až mnoho metrů čtverečních), které existují nezávisle na produkci sporofytu i mnoho desítek až stovek let (možná i více). Tyto filamentární gametofyty se vyskytují u čeledi blánatcovitých, stejně



5 Schéma rozličných typů sporogeneze u výtrusných rostlin. Pohlavní rozmnožování (a), jehož výsledkem je 64 redukovaných výtrusů, nepohlavní rozmnožování podle Döpp-Mantonové (b–e) a Braithwaite (f). Horní čísla udávají počet buněk, dolní pak ploidní úroveň. Zkratky nad nebo pod šipkami naznačují probíhající procesy. Orig. J. Ptáček

6 Slezinkovitě (*Aspleniaceae*) patří mezi čeledi s častým výskytem apomixie (nepohlavního rozmnožování kapradin pomocí výtrusů; blíže v textu).

Sleziník červený (*Asplenium trichomanes*), chráněná krajinná oblast Pálava

7 Stejně velké samčí a samičí výtrusy izosporické kapradiny puchýřníku prosvítavého (*C. diaphana*)

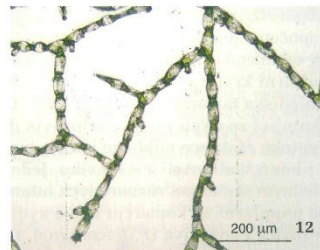
8 Výtrusy heterosporické kapradiny mičovky kulonosné (*Ptilularia globulifera*) – samičí mikrospery (a) a samičí megaspery (b) s endosporickým gametofytem, tedy vyvíjejícím se uvnitř výtrusu (c). Foto L. Ekrť

9 Zelený nadzemní gametofyt (obr. 9) a nově vznikající sporofyt (10) puchýřníku křehkého. Snímky J. Ptáčka, pokud není uvedeno jinak

11 a 12 Provazovitý (filamentární) gametofyt vláskatce tajemného (*Trichomanes speciosum*) v přírodě (obr. 11) a jeho detail pod mikroskopem (12). Snímky: L. Ekrť

13 Detail části čepel kapradě rezavé (*Dryopteris affinis*) z čeledi kapradovitých (*Dryopteridaceae*), u které se předpokládá až 70 % druhů rozmnožujících se pomocí apomixie. Foto L. Ekrť

živá 6/2017



nevytváří sporofyt vůbec a existuje tedy pouze v populacích gametofytů (obr. 11 a 12). Generace sporofytů vyžaduje jiné ekologické podmínky než gametofyty – jde zejména o vyšší vzdušnou vlhkost a zastínění. Mimo to jsou sporofyty citlivé na mraz, proto druh v České republice přežívá v populacích gametofytů, které snesou sušší a chladnější stanoviště.

Vegetativní rozmnožování na úrovni sporofytů představuje běžnou a nedílnou součást života výtrusných rostlin a je analogické podobným reprodukčním strategiím u krytosemenných. Větvičí se podzemní

oddenky (rhizomy) dávají vzniknout klonům (polykormonům) jedné rostliny, stejně jako pupeny nebo cibulky na kořenech a listech. Některé z rostlin to mají i ve svém druhovém názvu – namátkou lze zmínit endemický sleziník *A. bulbiferum* z Nového Zélandu nebo makaronéskou kapradinu woodwardii kořenatou (*Woodwardia radicans*), jež vytváří masivní pupeny na spodní straně listů (Živa 2003, 3: 108–109).

Závěrem

V současné době se výzkumu apomixie věnujeme v rámci jednoho týmu na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze a na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích. Tradičně se tyto skupiny studovaly s využitím detailního pozorování pod mikroskopem, kdy se zjišťovala přítomnost nebo nepřítomnost gametangia a vznik nového sporofytu z pletiva gametofytu. Dalším pomocníkem bylo počítání chromozomů, jelikož apomikticky vzniklý gametofyt jich má stejně množství jako rodičovský sporofyt. Postupně se ke studiu výtrusných reprodukčních strategií začíná kromě molekulárních metod využívat průtoková cytometrie (viz Živa 2005, 1: 46–48) kombinovaná s kultivačními experimenty a mikroskopickým zhodnocením životaschopnosti výtrusů. Dlouhou dobu bylo toto téma stranou zájmu botaniků, až v dnešní době začíná doslova renesancí a lze očekávat, že dojde v blízké budoucnosti k zaplnění mnoha mezer v pteridologickém výzkumu. O některých problematických skupinách se dočtete někdy v příštích číslech Živy.

Článek vznikl za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt č. 912613).

Seznam použité literatury a tabulku s přehledem apomiktických čeledí kapradin najdete na webové stránce Živy.

živá.avcr.cz



285

Příloha 6: Připravovaný článek Hanušové *et al.* odevzdaný do *Journal of Biogeography*, jehož je autor diplomové práce spoluautorem. Jako spoluautor jsem se podílel na dodání části výsledků, které jsou součástí níže uvedeného článku.

Global cytogeography of fragile ferns (*Cystopteris fragilis* complex; Cystopteridaceae): Widespread co-occurrence of multiple ploidy levels and minimal evidence of inter-ploidy genetic exchange suggests an incipient non-adaptive polyploid radiation.

Kristýna Hanušová, Martin Čertner, Tomáš Urfus, Petr Koutecký, Jiří Košnar, Carl J. Rothfels, Vlasta Jarolímová, **Jan Ptáček**, Libor Ekr

Abstract

Polyplodization plays an important role in the evolution of land plants. However, we know relatively little about the ecological factors underlying the establishment and persistence of polyploids, especially in ferns, a lineage in which polyploidy is particularly common. Here we explore the distribution pattern of cytotype diversity in the *Cystopteris fragilis* complex, an emerging polyploid model fern system, in order to elucidate the processes involved in the early establishment of polyploid lineages.