

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Obor: Botanika



Bc. Zuzana Pavlíková

Ekologické a evoluční důsledky polyploidizace

Ecological and evolutionary consequences of polyploidization

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Zuzana Münzbergová, Ph.D.

Praha 2014

Čestné prohlášení

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

V Praze, 14. 8. 2014

Zuzana Pavlíková

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat své školitelce Zuzce Münzbergové za tři roky trpělivého vedení této diplomové práce a možnost vycestovat na stáž do Kanady. Dále bych chtěla poděkovat Tomáši Urfusovi za pomoc s analýzou a interpretací dat z průtokového cytometru a Tomáši Procházkovi za poskytnutí semen rostlin pro pokusy s kolchicinem. Děkuji také lidem z Ústavu experimentální botaniky, především Radce Podlipné, která mi umožnila vyzkoušet si pokusy s kadmíem na rostlinách pěstovaných *in vitro* podmínkách a poskytla mi cenné rady při zpracovávání tohoto tématu, dále Šárce Petrové a Petru Soudkovi, v jejichž laboratoři jsem mohla měřit na AASce. Další poděkování patří laborantkám v Průhonicích, hlavně Verče Olivové, která mi ušetřila spoustu času tím, že se starala o mé pokusné rostliny a pomohla mi se sběrem dat. Dále bych chtěla moc poděkovat Ladce Paštové a paní Jarolímové, které se mnou trpělivě počítaly chromosomy a bez jejichž pomoci, bych je počítala dodnes. Také bych chtěla poděkovat Daně Holé za půjčení mašinky na měření fotosyntézy, pomoc během sběru dat a konzultaci výsledků. Velký dík patří Brianu Husbandovi, Paulu Kronovi a Brianovo studentům, kteří se nám věnovali po celou dobu naší stáže v Kanadě a velmi výrazně přispěli k tomu, že mám z této cesty nezapomenutelné zážitky. Zde bych chtěla speciálně poděkovat Nadaci „Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“, Nadaci Český literární fond a Fondu mobility UK, kteří mi díky poskytnuté finanční částce umožnili cestu do Kanady zrealizovat. Nakonec bych ráda poděkovala své rodině, partnerovi a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

Abstrakt

K odlišení přímých důsledků, které má polyploidizace pro rostliny od vlastností, které se vytvořily u polyploidní linie až v průběhu evoluce, se často využívají uměle syntetizovaní neopolyploidi. K indukci somatické polyploidizace se nejčastěji využívá kolchicin. V této práci byla testována možnost tvorby neopolyploidů kolchicinem u třech vybraných druhů rostlin. Při použití 0,2% roztoku kolchicinu a působení 12 hodin byla úspěšnost vzniku neotetraploidů 9,3 % u druhu *Vicia cracca*, 31,6 % u druhu *Centaurea phrygia* a 33,3 % u druhu *Pimpinella saxifraga*. Při prodloužení doby působení na 18 hodin, při stejné koncentraci kolchicinu, u druhu *Vicia cracca* byla úspěšnost polyploidizace 100 %, ale úmrtnost jedinců ošetřených kolchicinem byla velmi vysoká, téměř 98 % (při působení 12 hodin pouze 43 %). U druhu *Vicia cracca* byla vypěstována 2. generace neopolyploidních rostlin, část jedinců však byla aneuploidních a tyto rostliny se fenotypově nijak nelišily od přirozených tetraploidů. U přirozených diploidů, tetraploidů a indukovaných neopolyploidů byla porovnána velikost průduchů, rychlost klíčení a relativní růstová rychlost. Ve velikosti průduchů se diploidi průkazně lišili od tetraploidů a neotetraploidů, tj. na jejich velikost měla přímý vliv polyploidizace. V rychlosti klíčení se od sebe vzájemně lišily všechny tři skupiny, tj. na tuto vlastnost má pravděpodobně vliv jak polyploidizace, tak následná evoluce polyploidní linie. Naopak v relativní růstové rychlosti se od sebe skupiny nelišily, tj. na tuto vlastnost pravděpodobně nemá vliv ani polyploidizace, ani následná evoluce.

V druhé části práce byla testována hypotéza, zda se tetraploidi dokáží lépe přizpůsobit nepříznivým podmínkám prostředí než diploidi. Konkrétně bylo zjišťováno, jak budou cytotypy reagovat na pěstování na médiu s toxickým kadmíem a jak budou reagovat na stres suchem a zastíněním. Vliv ploidie na akumulaci kadmia v rostlinách se prokázal pouze u listů druhu *Centaurea phrygia*, kdy více Cd přijali diploidi. U druhu *Vicia cracca* vliv ploidie prokázán nebyl. U obou druhů však měla ploidie rostlin vliv na příjem zinku a v obou případech byl více přijímán tetraploidy. Rozdíl mezi cytotypy vystavenými stresu suchem a zastíněním byl zaznamenán pouze u druhu *Centaurea phrygia*. S vodním deficitem i stíněním se lépe vyrovnali tetraploidi. U druhů *Knautia arvensis* a *Vicia cracca* se rozdíly mezi ploidiemi neprojevíly.

Na základě výsledků somatické polyploidizace kolchicinem lze říci, že se sice jedná o rychlou a jednoduchou metodu, jak získat neopolyploidní rostliny, ale je potřeba vzít v potaz jak možný vznik aneuploidů, tak i různé chromosomové přestavby, ke kterým po jeho aplikaci u rostlin dochází. Co se týká reakce diploidů a tetraploidů na stresové podmínky, tak výsledky ukazují to, že vliv ploidie se výrazně mezidruhově liší a tetraploidi nemají nějakou obecnou výhodu oproti diploidům.

KLÍČOVÁ SLOVA: neotetraploidi, kolchicin, aneuploidi, kadmium, zinek, fotosyntéza, stres suchem a zastíněním

Abstract

Artificially synthesized neopolyploids are commonly used to distinguish the direct consequences of polyploidization for plants from those that were formed in polyploid line during subsequent evolution. Colchicine is usually used for induction of somatic polyploids. In this work I tested the possibility of making neopolyploids by using colchicine in three selected plant species. Success of neotetraploids was 9,3 % of the species *Vicia cracca*, 31,6 % of the species *Centaurea phrygia* and 33,3 % of the species *Pimpinella saxifraga* when using a 0,2% solution of colchicine and the effect of 12 hours. When extending the exposure time to 18 hours at the same concentration of colchicine in *Vicia cracca* the success of polyploidization was 100 % but mortality of individuals threated with colchicine was nearly 98 % (when exposed 12 hours it was only 43 %). *Vicia cracca* was grown to the second generation of neopolyploid plants, but part of the individuals was aneuploid and they were not phenotypically different from the natural tetraploids. Natural diploids, tetraploids and neotetraploids were compared in the size of stomata, rate of germination and relative growth rate. The size of stomata of diploids was significantly different from tetraploids and neotetraploids so it is possible to say that polyploidization has a direct impact on their size. The rate of germination differed from each other in all three groups. So this property is likely influenced by polyploidy and subsequent evolution of the polyploid line. On the contrary the relative growth rate of the groups did not differ from each other. This property is probably not affected either by polyploidy nor by subsequent evolution.

In the second part of theses I tested the hypothesis that the tetraploids are able to adapt better to adverse environmental conditions than diploids. Specifically, I investigated how the cytotypes respond to the growing medium with toxic cadmium and how they respond to stress by drought and shading. Effect of ploidy on the accumulation of cadmium in plants was found only in leaves of *Centaurea phrygia* and more cadmium was accumulated in diploids. No ploidy effect was found in *Vicia cracca*. However in both species I observed effect of ploidy on intake of zinc and in both cases there was more zinc in tetraploids. The difference between cytotypes in response to water deficit and shading was observed only in *Centaurea phrygia*. Tetraploids were able to cope better with drought and shading. I found no differences between ploidy level in *Knautia arvensis* and *Vicia cracca* in response to shading and drought.

Based on the results it is possible to say that although somatic polyploidization by using colchicine is quick and easy method to get neopolyploid plants it is necessary to take into consideration possible presence of aneuploids as well as various chromosomal rearrangements, which occur after application of colchicine. Regarding the response of diploids and tetraploids to stress the results show that the effect of ploidy is strongly different between plant species but tetraploids probably don't have a general advantage compared to diploids.

KEY WORDS: neotetraploids, colchicine, aneuploids, cadmium, zinc, photosynthesis, water stress and shading

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Cíle práce.....	14
3	Literární úvod.....	15
3.1	Vliv polyploidie na genom, meiózu a genetickou variabilitu.....	15
3.2	Vznik nové polyploidní linie a její udržení v sympatrické populaci.....	16
3.3	Morfologické a fyziologické rozdíly mezi diploidy a polyploidy.....	18
3.4	Fenotypová plasticita diploidních a polyploidních rostlin.....	21
3.5	Interakce diploidů a polyploidů s jinými trofickými úrovněmi.....	22
3.5.1	Herbivoři a patogeny.....	22
3.5.2	Opylovači.....	23
3.6	Umělá syntéza neopolyploidních rostlin.....	24
3.7	Akumulace kadmia u diploidních a polyploidních rostlin.....	29
3.8	Reakce diploidů a polyploidů na stres suchem a zastíněním.....	31
4	Metodika.....	35
4.1	Neopolyploidní rostliny.....	35
4.1.1	Modelové druhy rostlin.....	35
4.1.2	Syntéza neotetraploidních rostlin.....	35
4.1.3	Ověřování ploidie rostlin na průtokovém cytometru.....	36
4.1.4	Získání 2. generace neopolyploidních rostlin.....	37
4.1.5	Ověřování ploidie 2. generace neopolyploidních rostlin.....	38
4.1.6	Srovnání fenotypu přirozených diploidů, tetraploidů a neotetraploidů.....	39
4.1.6.1	Měření velikosti průduchů.....	39
4.1.6.2	Rychlost klíčení semen a relativní růstová rychlost rostlin.....	40
4.2	Akumulace kadmia u diploidních a tetraploidních rostlin.....	40
4.3	Reakce diploidů a tetraploidů na stres suchem a zastíněním.....	42

4.4	Analýza dat.....	43
5	Výsledky.....	44
5.1	Neopolyploidní rostliny	44
5.1.1	Syntéza neopolyploidních rostlin	44
5.1.1.1	Ploidní chiméry.....	45
5.1.1.2	<i>Vicia cracca</i>	46
5.1.1.3	<i>Centaurea phrygia</i>	49
5.1.1.4	<i>Pimpinella saxifraga</i>	51
5.1.2	Ověření ploidie u 2. generace neotetraploidů.....	52
5.1.3	Srovnání fenotypu přirozených diploidů, tetraploidů a neotetraploidů.....	56
5.1.3.1	Měření velikosti průduchů.....	56
5.1.3.2	Rychlost klíčení a relativní růstová rychlost.....	58
5.2	Akumulace kadmia u diploidních a tetraploidních rostlin.....	59
5.2.1	Interakce mezi akumulací kadmia a zinku u diploidních a tetraploidních rostlin	62
5.3	Reakce diploidů a tetraploidů na stres suchem a zastíněním	67
6	Diskuze	71
6.1	Neopolyploidní rostliny	71
6.1.1	<i>Vicia cracca</i>	71
6.1.1.1	Somatická polyploidizace kolchicinem	71
6.1.1.2	2. generace neopolyploidních rostlin.....	72
6.1.2	<i>Centaurea phrygia</i>	73
6.1.3	<i>Pimpinella saxifraga</i>	74
6.1.4	Výhody a nevýhody somatické polyploidizace kolchicinem.....	74
6.2	Srovnání fenotypu mezi přirozenými diploidy, tetraploidy a neotetraploidy.....	76
6.3	Akumulace kadmia u diploidních a tetraploidních rostlin a interakce mezi příjmem kadmia a zinku	77

6.4	Reakce diploidů a tetraploidů na stres suchem a zastíněním	78
7	Závěr	80
8	Seznam použité literatury.....	82
9	Seznam obrázků.....	93
10	Seznam tabulek	94
11	Seznam grafů	96

1 Úvod

Polyploidie, tj. zdvojení celého genomu se vyskytuje u velkého spektra eukaryot. Tento jev je běžný především u rostlin, ale můžeme jej pozorovat i u některých živočichů (Chen 2007). Odhaduje se, že až 70 % krytosemenných rostlin je polyploidních (Masterson 1994). Ke vzniku polyploidů dochází opakovaně v rámci druhu a pravděpodobnost, že dojde k duplicitě genomu je srovnatelná nebo vyšší v porovnání s pravděpodobností genetické mutace (Husband et al. 2008). Základním předpokladem pro uchycení nové polyploidní linie je překonání *minority cytotype exclusion* (Levin 1975). Následná selekce pak transformuje tyto neopolyploidy na životaschopné a fertilmí genotypy, které jsou schopny nejen přežít v původní sympatrické populaci, ale i kolonizovat nová stanoviště (Husband and Sabara 2003). Polyploidie ovlivňuje celý genom, dá se tedy předpokládat, že se takto drastická změna nějakým způsobem odrazí na fenotypu jedince. Levin (1983) shrnul ve své studii základní důsledky polyploidizace u rostlin. Jedná se např. o přímý vliv na velikost buňky, průběh meiózy, buněčný cyklus, rychlost vývoje jedince či nepřímé účinky na heterozygotnost a adaptivní potenciál druhu. Předpokládá se také, že zdvojení genomu hraje hlavní roli ve vytváření biologické rozmanitosti semenných rostlin (např. Janz and Thompson 2002) a že výrazně ovlivňuje interakce polyploidních jedinců s dalšími trofickými úrovněmi, jako jsou opylovači, herbivoři a patogeny.

V současné době je polyploidie velmi populárním tématem i kvůli tomu, že je zde pestrá škála témat, která lze studovat. Jedná se o komplexní problematiku, která začíná studiem změn na úrovni genů a genové exprese, pokračuje přes fenotypové projevy těchto změn, které se pak v konečném důsledku odráží v evoluční úspěšnosti nových polyploidních linií. Jednou z nevyřešených otázek je, zda jsou polyploidní jedinci schopni snáze odolávat stresovým podmínkám. Tato hypotéza vychází z předpokladu, že polyploidi mají dvojnásobný počet genů oproti diploidům a proto mají šanci generovat mnohem větší spektrum odpovědí na okolní podněty (Song et al. 1995). V této práci je zkoumána možnost vyšší odolnosti tetraploidních rostlin oproti diploidním v reakci na stres suchem a zastíněním. Tyto faktory, tj. nedostatek vody a světla zásadně ovlivňují distribuci rostlin na stanovištích, přičemž jedinci, kteří budou schopni pružněji reagovat na změnu prostředí, budou v konkurenčním boji o zdroje a prostor úspěšnější (Yang et al. 2014). V dosavadních studiích věnujících se reakci diploidů a polyploidů na vodní

deficit a stínění se objevují ne zcela jednoznačné výsledky. V reakci na sucho byly ve většině případů polyploidní rostliny odolnější než ty diploidní (Li et al. 1996, Liu et al. 2011). Ale byly také zaznamenány i případy, kdy se reakce ploidii nelišila, nebo byli odolnější diploidi (Sugiyama 2006). V případě zastínění je zatím k dispozici jen omezený počet studií. Na stín reagovali v některých případech hůře diploidi (Frydrych 1970), v některých polyploidi (Sano 1980), a někdy obě ploidie reagovaly stejně (Petit and Thompson 1997).

S reakcí na stres souvisí i akumulace těžkých kovů v rostlině. Lze předpokládat, že i v tomto případě by tetraploidi mohli mít efektivnější mechanismy obrany proti vstupu těchto toxických látek do organismu (zde je věnována pozornost výhradně kadmium). Předchozí práce na toto téma jsou zaměřeny především na hospodářsky významné plodiny, které ale většinou spadají do skupiny allopolyploidů (např. pšenice). Důvodem bylo zjištění, že kadmium poškozuje nejen těla primárních příjemců, tj. rostlin (např. Fusconi et al. 2006, Alfadul and Al-Fredan 2013), ale protože je transportováno rostlinou až do semen a plodů, tak může významně poškodit i zdraví člověka jako konzumenta těchto intoxikovaných plodin (Alfvén et al. 2000). U allopolyploidů byl obvykle pozorován trend, kdy rostliny s nižší ploidii akumulovaly více kadmia než jedinci s ploidii vyšší (Kraljević - Balalić et al. 2009, Cakmak et al. 2000, Ci et al. 2010). Autotetraploidním rostlinám byla zatím věnována jen minimální pozornost, přestože i v této skupině lze nalézt různé druhy rostlin využívané člověkem. Ojedinělým příkladem je studie u druhu *Matricaria chamomilla* a i v tomto případě diploidní rostliny přijímaly více kadmia než tetraploidi (Grejtovský and Pirč 2000). Z tak malého počtu studií však nelze vyvozovat žádné obecné závěry, a proto druhým tématem této práce je zkoumání rozdílů v příjmu kadmia diploidními a autotetraploidními rostlinami u dvou běžných lučních druhů.

Obecným problémem při studiu efektů polyploidizace je rozlišení vlastností, které vznikly jako přímý důsledek zdvojení genomu, od těch, které polyploidi získali až během následné evoluce. Z toho důvodu se různými látkami syntetizují neopolyploidní rostliny, u nichž lze pozorovat okamžité dopady polyploidizace na genom, morfologii, fyziologii a „chování“ jedinců v různém prostředí. Právě syntéza neopolyploidních rostlin je dalším tématem této práce. V této části je popsána nejen samotná problematika úspěšnosti vytvoření somatických polyploidů, ale i nástrahy spojené

s vypěstováním 2. generace neopolyploidních rostlin, na kterých je vůbec možné provádět experimenty.

V této práci bude věnována pozornost druhům, o nichž se předpokládá, že mají autopolyploidní původ. Autopolyploidi jsou jedinci, kteří vznikli v rámci jednoho druhu zmnožením identických chromosomových sad (Ramsey and Schemske 2002).

2 Cíle práce

Prvním tématem, kterému je v této diplomové práci věnována pozornost, je umělá syntéza neopolyploidních, kde jsem si stanovila následující cíle:

1. Vytvoření somatických neopolyploidů kolchicinem alespoň u jednoho vybraného druhu.
2. Vypěstování 2. generace neopolyploidních rostlin, které by bylo možno porovnávat s přirozenými diploidy a tetraploidy.
3. Rozlišení těch vlastností, které vznikly přímo v důsledku polyploidizace a které se vytvořily až v průběhu evoluce a to podle následující hypotézy:
 - a) Pokud se tetraploidi a neotetraploidi v dané vlastnosti vzájemně neliší, ale odlišují se od diploidů, tak je rozdíl způsoben pouze polyploidizací.
 - b) Pokud se neotetraploidi a diploid v dané vlastnosti vzájemně neliší, ale odlišují se od tetraploidů, tak je to způsobeno pouze evoluční historií.
 - c) Pokud se diploidi, tetraploidi a neotetraploidi vzájemně neliší v dané vlastnosti, tak ani polyploidizace ani evoluce nemá vliv na tuto vlastnost.
 - d) Pokud se diploidi, tetraploidi a neotetraploidi v dané vlastnosti vzájemně liší, tak je daná vlastnost ovlivněna jak polyploidizací, tak i následnou evolucí.
4. Zhodnocení výhod a nevýhod somatické polyploidizace kolchicinem u rostlin.

Druhým tématem, kterému se tato práce věnuje, je otázka, zda jsou tetraploidní rostliny odolnější vůči stresovým podmínkám než diploidy a cíle byly následující:

5. Zjištění, zda se liší akumulace těžkých kovů (konkrétně kadmia) u diploidních a tetraploidních rostlin a zda je tím ovlivněn příjem jiných základních prvků (konkrétně zinku).
6. Porovnání reakcí diploidních a tetraploidních rostlin na pěstování v různých stresových podmínkách (konkrétně v režimu s omezenou závlivkou a v režimu, kde byly rostliny stíněny).

3 Literární úvod

3.1 Vliv polyploidie na genom, meiózu a genetickou variabilitu

Zdvojení sad chromosomů je jedna z nejdrastičtějších změn, které mohou v buňce nastat. Pokud se s ní ale organismus dokáže vyrovnat, tak mu to může přinést mnohé výhody. Hlavními problémy po polyploidizaci jsou především nestabilita genomu a nedostatky v regulaci genové exprese, což může fatálně ovlivnit funkčnost metabolických a signálních drah a vést k smrti polyploidního jedince. V reprodukčním věku pak může docházet k nesprávné segregaci chromosomů při meióze, protože s vyšším počtem chromosomů stoupá riziko, že dojde k nějaké chybě v regulaci tohoto procesu (Cifuentes et al. 2010, Chen 2007). Ramsey a Schemske (2002) potvrdili, že u většiny nově vzniklých autopolyploidů běžně dochází k meiotickým aberacím, což má negativní dopady na jejich plodnost a v důsledku toho i na jejich rané demografické úspěchy. Těsně po polyploidizační události tedy dochází k mnoha radikálním změnám v řízení veškerých procesů odehrávajících se v buňce, které mají tyto problémy úplně vyřešit nebo alespoň zmírnit na přijatelnou mez (Wendel 2000, Levy and Feldman 2004).

Důležitým důsledkem polyploidizace je hlavně výrazně vyšší genetická variabilita jedince díky duplikovaným genům, vyšší heterozygotitě a vyšší alelické diverzitě. Postupně během evoluce dochází ke genové diverzifikaci, kdy je výsledkem regulační a funkční divergence duplikovaných genů a jejich produktů (Soltis and Soltis 2003). Často ale dochází k umlčení nebo eliminaci jedné z kopií genu (Adams and Wendel 2005). Genetickou variabilitu může zvýšit i nastalá aktivace retroelementů, jenž jsou transkripčně aktivní (Levy and Feldman 2004). Výsledná změna exprese genů a regulace pak vede k evoluci fenotypu v různém měřítku a různými cestami a zpravidla k ní dochází velmi rychle po polyploidizační události (Flagel and Wendel 2000). Výskyt těchto procesů ukazuje, že polyploidní genom je velmi plastický a citlivý vůči evolučním změnám (Soltis and Soltis 2003) a během existence stále vykazuje významné změny v reorganizaci jako např. různé epigenetické změny (Otto 2007). Polyploidie jsou, díky uvedeným procesům, obvykle schopni generovat velmi rozmanité odpovědi na změny prostředí v krátkém časovém období, což může přispět k jejich evolučnímu úspěchu a diverzifikaci (Song et al. 1995).

3.2 Vznik nové polyploidní linie a její udržení v sympatrické populaci

Hlavní cesta vzniku nové polyploidní linie v přirozené populaci vede přes neredukované gamety (Kohler et al. 2010). Ve studii Ramsayho (2007) v populaci tetraploidů u druhu *Achillea borealis* vznikala diploidní, tetraploidní v některých případech dokonce oktoploidní pylová zrna, která přispívala ke vzniku nové neohexaploidní linie. Pylová zrna s různou ploidií bylo možné jasně rozlišit na základě velikosti a počtu pórů. Střední populační frekvence tvorby neredukovaného pylu byla 0,030 – 0,538 %, přičemž jedna třetina až jedna polovina zkoumaných jedinců populace se podílela na tvorbě neredukovaných pylových zrn. Pouze osm jedinců populace produkovalo 41 % všech neredukovaných pylových zrn. Neredukovaná pylová zrna byla využita v experimentálním křížení a výsledkem byla životaschopná semena. Tato studie ukazuje, že produkce neredukovaných gamet v populaci je poměrně častá, i když je může vytvářet jen několik málo jedinců v populaci. Problematiku vzniku neredukovaných gamet, frekvenci jejich výskytu v populacích a jejich následné přispění ke vzniku neopolyploidních linií shrnují Bretagnolle and Thompson (1995). Ke vzniku a udržení polyploidní linie často přispívá i nestabilní triploidní meziprodukt. Husband and Burton (2000) zkoumali životaschopnost a fertilitu triploidů oproti diploidům a tetraploidům u druhu *Chamerion angustifolium*. Bylo zjištěno, že triploidi měli méně semen, menší klíčivost semen a nižší viabilitu pylu než diploidi a tetraploidi, ale měli více biomasy než diploidi a přežívali také podobně dobře. Nicméně hodnota jejich celkové fitness byla mnohem menší ve srovnání s diploidy. Celková fitness tetraploidů byla téměř o polovinu nižší než u diploidů, ale mnohem vyšší oproti triploidům. Husband (2004) ukázal, že triploidi tvořily n , $2n$ i $3n$ gamety a významně tak přispívali ke vzniku tetraploidů v sympatrické populaci. Needham and Erikson (1992) pozorovali u druhu *Salpiglossis sinuata*, že triploidi mají obvykle stejnou fitness jako tetraploidi a jsou od nich k nerozeznání i morfologicky. Fertilita triploidů byla ale stejně jako u Husbanda and Burton (2000) mnohem nižší než u diploidů nebo tetraploidů, ale jen výjimečně nulová a často se projevovaly rozdíly ve fertilitě mezi samčími a samičími gametami.

Nová polyploidní linie je na počátku svého vzniku populačně nestabilní, protože se často skládá jen z několika jedinců. Největší překážkou, kterou tak musí překonat je *minority cytotype exclusion* (Levin 1975). Nevýhoda minoritního cytotypu spočívá především v tom, že na kontaktních zónách dochází k intercytotypovému křížení

(Fowler and Levin 1984). Jak bylo popsáno výše, tímto křížením vzniká potomstvo, které je často méně fertillní a životaschopné (triploidní blok), ale přesto přispívá k udržení polyploidní linie. Tento příspěvek je ale samozřejmě menší než kdyby ke křížení cytotypů nedocházelo, takže na kontaktní zóně může být toto křížení pro polyploidy kritické. Husband (2011) ale ve své studii ukázal, že jedinci druhu *Chamerion angustifolium* preferují spíše pyl vlastní ploidie. To znamená, že tetraploidi preferují pro oplození diploidní pyl, nikoliv pyl haploidní, tudíž nedochází ke vzniku triploidů tak často, jak se dříve předpokládalo. Jistý způsob jak se polyloidi mohou vyhnout intercytotypovému křížení na počátku svého vzniku je, že přejdou na samoopylení. Polyploidie totiž často naruší systém auto-inkompatibility (Mable 2004). Husband et al. (2008) ve své studii prokázal, že samoopylení je preferováno na počátku vzniku nové polyploidní formace. Postupně ale vzrůstá inbrední deprese populace a proto autopolyploidi přechází na smíšený systém rozmnožování (samo- a cizosprášení) nebo pouze na cizosprášení. V průběhu evoluce se opakovaně tvoří bariéry, které křížení mezi cytotypy zabraňují, jedná se např. o prostorovou izolaci, asynchronii kvetení, nebo věrnost opylovačů (Husband and Sabara 2003). Tato fenotypová diferenciace mezi ploidiemi je pravděpodobně výsledkem přirozeného výběru, který působí na cytotypy. Přirozená selekce pak může úspěšně snižovat kompetici mezi cytotypy o opylovače nebo o zdroje (Petit et al. 1999). Nuismer and Cuningham (2005) pozorovali u dvou cytotypů v sympatrické populaci u druhu *Heuchera grossulariifolia* přirozenou selekci, která směřovala k postupnému zvětšování květu a květního stvolu jedinců. Tetraploidi kvetli dříve než diploidi a pravděpodobnost intercytotypového křížení se tak významně snížila. Divergence mezi ploidiemi byla tedy řízena selekcí ve prospěch snížení intercytotypového křížení a umožnila tak různě ploidním jedincům společně koexistovat. Mezi ploidiemi byl ale opakovaně dokumentován genový tok, to znamená, že ani v průběhu evoluce nedojde k jejich úplné reprodukční izolaci (Petit et al. 1999). Reprodukční bariéry jsou však významným mechanismem, který velmi výrazně přispívá k diferenciaci cytotypů a k jejich soužití v sympatrické populaci.

Vliv na uchycení nové polyploidní linie má samozřejmě také stanoviště, kde polyploidi vznikají. Předpokládá se, že ve stabilním prostředí budou mít polyploidi nižší relativní fitness a nižší frekvenci výskytu než diploidi, kteří již byli vyselektováni na podmínky daného stanoviště. Naopak v nepříznivém prostředí a/nebo při osídlování nových nik se zvýší relativní fitness i četnost polyploidů díky jejich možnosti flexibilně

reagovat na změny. To následně vede k vyšší pravděpodobnosti uchycení a přetrvání nové polyploidní linie než by tomu bylo ve stabilních podmínkách (Fawcet and Van de Peer 2010). Ideálním místem pro uchycení nové polyploidní linie jsou tak disturbovaná stanoviště (Ramsey 2011). Tuto hypotézu potvrdili ve své studii Kim et al. (2012), kteří srovnávali stanovištní preferenci tetraploidů a neohexaploidů u druhu *Spartina pectinata*. Neohexaploidi kolonizovali často disturbovaná, zatímco tetraploidi málo disturbovaná stanoviště. Polyploidi jsou dobrými kolonizátory z několika důvodů. Bud' tvoří hodně malých semen, nebo méně větších semen, z nichž vyklíčí větší a odolnější semenáčky než mají diploidi, nad nimiž pak v kompetici zvítězí (Maceira and Lumaret 1993). Polyploidi také často hodně investují do vegetativního rozmnožování jako např. polyploidi invazního druhu *Solidago gigantea*, který vytváří rozsáhlý systém odděnků (Schlaepfer and Edwards 2010). Kolonizovat novou niku s extrémními nebo nepřilíš stabilními stanovištními podmínkami však zvládnou jenom ti polyploidní jedinci, kteří dokážou využít duplicitní povahy svého genomu pro svoji úspěšnou adaptaci na lokální podmínky (Fawcet and Van de Peer 2009). Úspěch polyploidních linií tak může být způsoben výraznými změnami klimatických podmínek na Zemi, které se bud' periodicky opakovaly, nebo se jednalo o výjimečnou událost. Druhy, které se nedokázaly změnám přizpůsobit, vymřely a uvolnily tak místo druhům (často právě polyploidním), které se na nové podmínky dokázaly adaptovat (Van de Peer et al. 2009).

3.3 Morfologické a fyziologické rozdíly mezi diploidy a polyploidy

Zdvojení počtu chromosomů vede k mnoha změnám v genové expresi a vede k celkové reorganizaci duplikovaného genomu (Soltis and Soltis 1993, Otto 2007). K četným změnám dochází ihned po polyploidizaci (Flagel and Wendel 2009), jiné vyžadují několik cyklů meiózy nebo k nim dojde až v průběhu dlouhé evoluce polyploidní linie (Chen 2007). Tyto události budou mít významné důsledky pro řízení a funkci celé buňky a dá se tedy očekávat, že jimi bude ovlivněn i vzhled a chování, tedy celkový fenotyp polyploidního jedince.

Polyploidní rostliny v přirozených populacích často vytváří více biomasy než diploidi (např. Maceira et al. 1993, Burton and Husband 2000, Schlaepfer and Edwards 2010). Tento rozdíl byl pozorován také mezi kolchicinem indukovanými tetraploidy a

přirozenými diploidy u druhu *Nicotiana obtusifolia* (Anssour et al. 2009). Stejný trend se objevil i ve srovnání triploidů a diploidů druhu *Butomus umbellatus* (Hroudová and Zákřavský 1993) a také při srovnání vyšších ploidí jako jsou hexaploidi a tetraploidi u druhu *Polygonum aviculare* (Meerts 1992), kde hexaploidi měli dokonce čtyřikrát více biomasy než tetraploidi. Ale Münzbergová (2007) pozorovala u druhu *Aster amellus* jen velmi malý rozdíl v množství biomasy u diploidů a hexaploidů. Polyploidi mívají obvykle vyšší lodyhy a větší listovou plochu (Petit and Thompson 1997), větší délku listů (Kim et al. 2012) nebo počet listů (Münzbergová 2007). Anssour et al. (2009) ale žádné rozdíly ve velikosti nebo tvaru listů u syntetizovaných neotetraploidů (druhy *Nicotiana attenuata* a *Nicotiana obtusifolia*) ve srovnání s diploidy nepozoroval. U druhu *Solidago gigantea* měli dokonce větší listovou plochu diploidi než tetraploidi (Schlapfer and Edwards 2010).

Polyploidi také často vytváří větší květy (Anssour et al. 2009, Nuismer and Cunningham 2005) nebo větší počet květů či klásků v květenství (Kim et al. 2012, Nuismer and Cunningham 2005). Apomikti rodu *Boechera* však neměli ani větší ani četnější množství květů než diploidi (Voigt-Zielinski 2012). Jedinci s vyšší ploidí ve většině případů kvetou dříve (Maceira et al. 1993, Petit and Thompson 1997, Nuismer and Cunningham 2005), ale určitě se nejedná o pravidlo (Meerts 1992, Kim 2012). Se zvyšující se ploidí se zvětšuje velikost pylových zrn (Ramsey 2007). Viabilita pylu byla ve studii Burton and Husbanda (2000) stejná u diploidů a tetraploidů, ale u triploidů byla nižší. U produkce semen se výsledky také liší, v některých případech produkují polyploidi více menších semen (Meerts 1992, Petit and Thompson 1997) a v jiných, méně větších semen (Burton and Husband 2000, Anssour et al. 2009, Bretagnolle and Thompson 2001). Triploidi celkově mívají menší počet semen než diploidi a tetraploidi (Hroudová a Zákřavský 1993). U většiny druhů je rychlost klíčení a růstu vyšší u diploidů než u polyploidů. Vysvětlením může být negativní korelace mezi množstvím jaderné DNA v buňce a délkou buněčného cyklu, tj. rychlostí mitózy a meiózy (Bennett 1972). U druhu *Spartina pectinata* měli tetraploidi vyšší rychlost klíčení než hexaploidi (Kim et al. 2012). Burton a Husband (2000) ale rozdíl v rychlosti klíčení mezi diploidy a tetraploidy druhu *Chamerion angustifolium* neprokázali.

S vyšší ploidií se také zvětšuje velikost průduchů, tj. jejich šířka i délka (Balao et al. 2011), ale klesá jejich počet na jednotku plochy (např. Beck et al. 2003, Kim et al. 2012). Khazaei et al. (2010) ve své studii srovnávali tři druhy pšenice, z nichž každý zastupoval jednu ploidiu (diploidy, tetraploidy a hexaploidy). Největší frekvence průduchů, které měly zároveň nejmenší velikost, byla pozorována u diploidů a naopak hexaploidi měli největší průduchy, ale v průměru na list jich měli nejméně. Se zvyšující se ploidií také klesal poměr počtu průduchů na abaxiální (spodní) a adaxiální (svrchní) straně listu. Tyto rozdíly ukazují na podstatné změny v distribuci průduchů během evolučních procesů, které u pšenice proběhly. Nebyla pozorována žádná korelace mezi velikostí a počtem stomat na jednotku listu a transpirací. Může to být dáno tím, že transpirace je řízena především regulací průduchů, takže není závislá na počtu nebo velikosti průduchů. Anssour et al. (2009) pozorovali, že tetraploidi měli cca 1,5x větší epidermální buňky než diploidi.

U některých cytotypů v rámci jednoho druhu dochází jen k drobným morfologickým a fyziologickým změnám jako např. u druhu *Centaurea stoebe* (Španiel et al. 2008). U většiny druhů lze ale pozorovat patrnou diferenciaci fenotypu, např. druh *Spartina pectinata* (Kim et al. 2012). Vzácněji se pak objevují druhy, mezi jejichž cytotypy dochází ke zcela zásadním rozdílům ve fenotypu a celkové životní strategii. Hroudová and Zákřavský (1993) zkoumali druh *Butomus umbellatus*. Triploidi v přirozených populacích netvořili semena a rozmnožovali se pouze vegetativně oddénkovými pupeny a hlízkami, které vznikaly v květenství. Diploidi se naopak rozmnožovali pouze generativně a absence vegetativního rozmnožování byla kompenzována zvýšenou produkcí generativních propagulí.

Balao et al. (2011) studovali druh *Dianthus broteri*, který tvoří diploidy, tetraploidy, hexaploidy a dodekaploidy (není zde prostorová koexistence). Se stoupající ploidií se některé morfologické znaky rostlin zvětšovaly, jiné se neměnily a u dvou došlo dokonce ke zmenšení. Fenotypy rostlin korelovaly nejen s ploidií, ale také s fylogenetickou příbuzností jednotlivých populací (zřejmě kvůli efektu zakladatele). Ve výsledku tak měla polyploidie větší vliv na evoluci fenotypu jedinců, pokud byl do analýzy zahrnut i efekt populace. Z toho plyne, že každý vztah mezi polyploidií a fenotypem má nějakou souvislost s konkrétní populací. I u druhu *Centaurea stoebe* byly

morfologické tendence směřující k separaci cytotypů patrnější na úrovni populací více než mezi samotnými cytotypy (Španiel et al. 2008).

Výše uvedené rozdíly mezi ploidiemi ukazují, že zmnožení sad chromosomů ovlivňuje velikost orgánů a rychlost nebo průběh některých procesů, tj. způsobuje jejich variabilitu. A tato variabilita může následně vést ke speciaci daného druhu, stanovištní diferenciaci cytotypů nebo může alespoň výrazně přispět k soužití cytotypů v sympatrické populaci.

3.4 Fenotypová plasticita diploidních a polyploidních rostlin

Polyploidní druhy mají často širší ekologickou amplitudu a tím i větší rozsah výskytu než diploidi, ale nemusí to být pravidlem jako např. u druhu *Centaurea stoebe* (Španiel 2008). To že polyploidní rostliny dokážou osídlit více oblastí než diploidi může být způsobeno jejich vyšší fenotypovou plasticitou. K té může výrazně přispět vyšší genetická variabilita polyploidů díky duplikovaným genům a enzymům, vyšší heterozygotitě a alelické diverzitě (Soltis and Soltis 2003). Polyploidi mají také větší diverzitu primárních a sekundárních metabolitů kvůli větší rozmanitosti metabolických drah (Dhawan a Lavania 1996). Předpokládá se, že díky těmto procesům pak mohou polyploidi generovat pestrou škálu odpovědí na změny prostředí v krátkém časovém období (např. Song et al. 1995). Pokud jsou však polyploidi skutečně fenotypově plastičtější než diploidi, tak by měli vykazovat vyšší stabilitu fenotypu napříč různými prostředími (např. Petit and Thompson 1998, Bretagnolle and Thompson 2001, Dhawan a Lavania 1996). Alternativním vysvětlením je možnost, že polyploidní druhy se na různých stanovištích vyskytují jako lokálně adaptované typy (Münzbergová 2007).

Bretagnolle and Thompson (2001) nenalezli žádný průkazný rozdíl ve fenotypové plasticitě mezi diploidy a tetraploidy druhu *Dactylis glomerata*. Mezi ploidiemi nebyl pozorován signifikantní interakční efekt mezi ploidií a prostředím pro zkoumané charakteristiky. Ke stejnému výsledku dospěli i Petit and Thompson (1997) u druhu *Arrhenatherum elatius*. Münzbergová (2007) studovala fenotypovou plasticitu u diploidů a hexaploidů druhu *Aster amellus*. Sledovala, jak odlišné ploidie reagovaly na kompetici s druhem *Bromus erectus*. Výsledky studie neposkytly žádnou podporu pro vyšší fenotypovou plasticitu polyploidů a ani pro alternativu, že by se jednalo o lokálně

adaptované fenotypy. S odlišným výsledkem přišel Meerts (1992), který srovnával fenotypovou plasticitu u tetraploidů a hexaploidů druhu *Polygonum aviculare* v šesti různých prostředích. Fenotypově plastičtějším cytotypem byli hexaploidi, protože vykazovali vyšší průměrné hodnoty napříč všemi prostředími pro většinu zkoumaných vlastností. Zajímavé je, že hexaploidi byli ve zkoumaných vlastnostech „lepší“, pouze v příznivých, ale ne v hodně nepříznivých podmínkách. Tetraploidi inklinovali spíše k r-strategii a hexaploidi spíše ke K-strategii.

Vzhledem k tomu, že vyšší fenotypová plasticita nemusí platit pro všechny druhy, tak je možné, že hlavním důvodem současného distribučního pattern některých diploidů a polyploidů je migrační událost, která proběhla v minulosti a pozorované rozdíly ve stanovištních jsou jednoduše způsobeny rozmístěním stanovišť v krajině (Münzbergová 2007).

3.5 Interakce diploidů a polyploidů s jinými trofickými úrovněmi

3.5.1 Herbivoři a patogeny

Studii věnujících se srovnání vlivu herbivorů na diploidy a polyploidy je poměrně málo. Výsledky ale zatím ukazují, že herbivoři reagují na různé stupně ploidie velmi různorodě. U druhu *Heuchera grossulariifolia* pozorovali Thompson et al. (2004) jeden druh herbivora (*Greya piperella*) na diploidech a jiný druh (*Eupithecia misturata*) na tetraploidech. V jiném případě napadal herbivor obě ploidie, ale upřednostňoval spíše tetraploidy (Kao 2008 – *Arnica cordifolia*). Ve studii Thompsona et al. (1997) také u druhu *Heuchera grossulariifolia* atakoval herbivor (*Greya politella*) diploidy i tetraploidy, ale u tetraploidů rozlišoval jejich evoluční původ (stáří polyploidní linie). Z většiny novějších studií spíše vyplývá, že rostliny s vyšším stupněm ploidie jsou herbivory napadány častěji než diploidy (např. Münzbergová 2006 – *Aster amellus*, Arvanitis et al. 2008, Arvanitis et al. 2010 - *Cardamine pratensis*). To znamená, že polyploidie rozhodně druhům nepřinesla nějakou obecnou rezistenci vůči herbivorii. To proč jsou polyploidy preferovány může být dáno např. tím, že mají větší výhony, pupeny a často více semen než diploidy (Münzbergová 2006) a poskytují tak více potravy nebo prostoru pro naklazení vajíček (Arvanitis et al. 2008, Thompson et al. 1997). Následně Nuismer and Thompson (2001) naznačili, že pokud jsou nově vzniklé polyploidní linie vystaveny

různým skupinám herbivorů a různým selekčním tlakům, tak může docházet k evoluční diverzifikaci mezi ploidiemi a jejich adaptaci na konkrétní skupinu herbivorů. Oswald and Nuismer (2007) později namítli, že nelze takto zobecňovat vliv herbivorie i patogenů na vznik nových polyploidních linií ani porovnávat míru jejich rezistence. Především z toho důvodu, že všechny studie byly prováděny pouze u několika nezávislých polyploidních linií. Navíc u polyploidních linií, které vznikly před dlouhou dobou, mohlo dojít k řadě koevolučních změn, které lze obtížně zahrnout do modelů testujících míru a vliv rezistence polyploidů.

Oswald and Nuismer (2007) se zabývali testováním rezistence vůči patogenům u nově vzniklých polyploidních linií. Výsledky jejich studie ukázaly, že existují rozdíly v rezistenci vůči patogenům u diploidů a polyploidů, ale velikost tohoto rozdílu závisí na počáteční frekvenci alel odpovídající za rezistenci v diploidní populaci. Přičemž tyto alely mohou z polyploidní populace vymizet v důsledku genetického driftu, pokud je populace malá a rezistence jí nepřináší okamžité benefity zvyšující fitness. Naopak pokud populace polyploidů vznikla z mnoha zakladatelů, tak rezistentní alely mohou být zachovány a to zejména v případě, kdy polyploidi vznikají opakovaně. To znamená, že výsledná rezistence závisí na evoluci každé konkrétní linie.

3.5.2 Opylovači

Práci, jež se věnují zkoumání interakcí mezi polyploidními rostlinami a opylovači, v poslední době přibývá, ale také jich není příliš mnoho. Ze studií vyplývá, že druhy s různým stupněm ploidity se mohou lišit v celkovém souboru opylovačů, ale nemusí to být pravidlem. Příkladem je studie Castro et al. (2011), kteří u *Aster amellus* ukázali, že na kontaktních zónách mezi diploidy a hexaploidy docházelo k opylování podobným souborem opylovačů. Naopak Husband and Sabara (2003) pozorovali u druhu *Chamerion angustifolium*, že opylovač navštěvoval pouze jedince jednoho cytotypu. Stejný výsledek vyšel i v práci Thompсона et al. (2008) u druhu *Heuchera grossulariifolia*. Další zajímavý případ interakcí byl publikován ve studii Borgese et al. (2012) u druhu *Libidibia ferrea*. Diploidi a tetraploidi se lišili ve všech zkoumaných morfometrických parametrech květu (tetraploidi měli vždy větší velikost daného znaku). Oba cytotypy však měli stejnou skupinu opylovačů. Navíc diploidi byli autoinkompatibilní na rozdíl od tetraploidů a při vzájemném křížení mezi cytotypy se netvořily žádná semena. Možným vysvětlením pro efektivní opylování cytotypů

„vhodným“ pylem je odlišné ukládání pylu na těle opylovače kvůli odlišné délce tyčinek u diploidů a tetraploidů.

Předpokládá se, že interakce rostlina-opylovač je významnou prezygotickou bariérou, která silně omezuje intercytotypové křížení na kontaktních zónách mezi diploidy a polyploidy (např. Husband and Schemske 2000). Ukazuje se ale, že se tato etologická izolace objevuje jen v určitých případech u některých polyploidních komplexů.

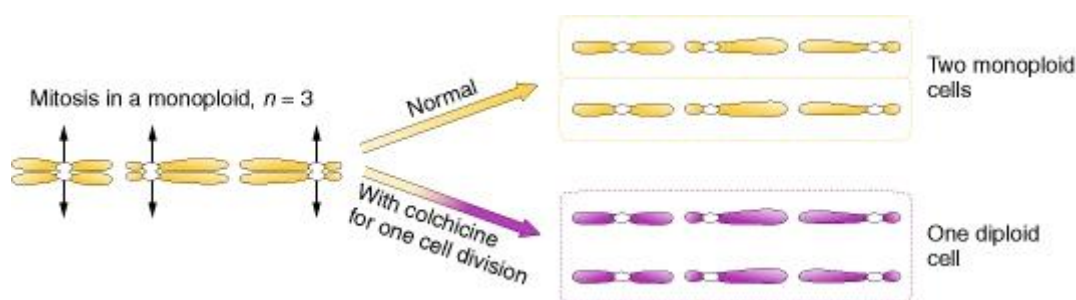
3.6 Umělá syntéza neopolyploidních rostlin

Největším problémem při studiu důsledků polyploidizace u rostlin je rozlišení vlastností, které vznikly přímým zdvojením genomu od vlastností, které vznikly až v průběhu evoluce. Nejlepším způsobem jak tyto dva vlivy separovat je studium první generace neopolyploidních jedinců, která vznikla v přirozeném prostředí z neredukovaných gamet. Bretagnolle and Thompson (1995) shrnuli v review dosavadní poznatky o mechanismu vzniku, metodách screeningu a frekvenci vzniku neredukovaných gamet v přirozených populacích. Konkrétním příkladem využití neredukovaných gamet ke studiu polyploidizace je studie Ramseyho (2007) na druhu *Achillea borealis* (autopolyploidní komplex zahrnující tetraploidní a hexaploidní cytotypy – vznik z tetraploidů). Tetraploidní jedinci produkující neredukované gamety ($4n$ gamety) byli identifikováni metodou měření velikosti pylových zrn (čím vyšší ploidie, tím větší pylová zrna, Tan and Dunn, 1973) a následně byli využiti ke sprášení tetraploidů (produkující $2n$ gamety) v experimentální zahradě, tj. k vypěstování první generace neohexaploidního potomstva. Ve studii z roku 2011 pak Ramsay ukázal přímý pozitivní příspěvek polyploidizace na fitness rostlin při přesazovacích pokusech.

Použití této metody je však možné jen u druhů, u kterých se povede najít jedince produkující neredukované gamety. Frekvence výskytu neredukovaných gamet je ale velmi variabilní mezi druhy, v rámci druhu, i mezi jednotlivými jedinci v rámci populace (Bretagnolle and Thompson, 1995). Lze předpokládat, že u všech druhů obecně někdy dojde k chybě během meiózy a následnému vzniku neredukovaných gamet. Jedná se však o událost těžko prediktabilní a nepříliš častou. To znamená, že nalezení jedince, který produkuje neredukované gamety je často dílem náhody.

Jinou možností získání neopolyploidů je jejich umělá syntéza z diploidních jedinců. Jedná se o proces somatické polyploidizace, při kterém se používají látky blokující buněčný cyklus. Nejčastěji se používá kolchicin (např. Semeniuk and Arisumi 1968, Jaskani et al. 2005), což je sekundární metabolit rostliny *Colchicum autumnale*. Dalšími látkami, které se využívají, jsou uměle připravený trifluralin (např. Lignowski and Scott 1972, Amiri et al. 2010) a oryzalin (např. Madon et al. 2005, Jones et al. 2008). Použití všech látek má stejný důsledek, tj. dojde k zablokování mitózy v metafázi a následně ke vzniku polyploidních buněk. Tento způsob vytvoření neopolyploidů je sice méně vhodný než přirozená polyploidizace kvůli působení toxických látek, ale je rychlý, poměrně efektivní a proto v dnešní době stále oblíbený a hojně využívaný. Dále bude pozornost věnována pouze účinkům kolchicinu, který je v této práci používán.

Kolchicin se k indukci polyploidních buněk využívá už více než 50 let. Pro živočišné buňky je tato látka letální i při použití velmi nízkých koncentrací. Na druhé straně rostlinné buňky jsou schopny jeho aplikaci přežít (Eigsti and Dustin 1955). Kolchicin je anti-mitotický jed, který inhibuje vznik dělicího vřeténka v metafázi mitózy. Chromatidy se nemohou bez dělicího vřeténka přesunout k pólům a zůstanou všechny uzavřené v nově vznikající jaderné membráně. Do interfáze tak vstupuje jádro s dvojnásobným počtem chromosomů (např. Hague and Jones 1987) jak je ukázáno na Obr. 1.



Obrázek 1 - Ilustrace působení kolchicinu na buňku při mitotickém dělení. Výsledkem je vznik diploidní buňky z buňky monoploidní (Griffiths et al. 1999).

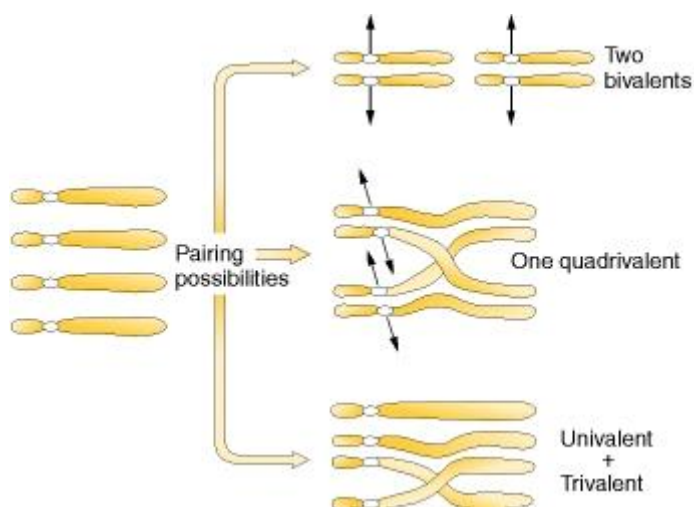
Tento proces spočívá v tom, že kolchicin interferuje s mikrotubuly, způsobí jejich depolymeraci a tvoří s nimi komplexy. Tyto komplexy znemožní skládání mikrotubulů a vznik dělicího vřeténka (Panda et al. 1995). Vznik polyploidního jedince je zcela závislý

na koncentraci roztoku kolchicinu a na době jeho působení. Caperta et al. (2006) ukázali na druhu *Secale cereale* L., že pouze vysoká koncentrace kolchicinu (cca 5mM) při působení 2,5 hod. způsobila polyploidizaci buňky. Nízká koncentrace kolchicinu (0,5 mM), při stejné době působení, vedla k depolymeraci mikrotubulů ve všech fázích buněčného cyklu. To následně vedlo k nesprávné reorganizaci chromatinu v jádře, vzniku abnormálního jádra a často i vzniku dalších mikrojadérek. Oproti tomu u rostlin ošetřených roztokem kolchicinu o vyšší koncentraci se objevilo jen málo anomálií. Vyšší koncentrace způsobila polymeraci nových tubulinových struktur u buněk v c-metafázi, díky čemuž došlo k opětovnému sestavení 4C jader a jejich dalšímu postupu v buněčném cyklu. Tyto účinky kolchicinu jsou paradoxní a zatím není jasné, co je způsobuje.

Ascough and van Staden (2008) zkoušeli indukovat polyploidizaci kolchicinem u druhu *Watsonia lepidia*. Koncentrace kolchicinu byla 25 μ M, 50 μ M, 125 μ M a 250 μ M a u každé z nich byla testována účinnost při třech různých dobách působení a to 24, 48 a 72 hodin. Kolchicin byl přidán do média, na které byly nasazeny explantáty listu a kořene jedince. Při koncentraci 25 μ M nevznikli žádní polyploidi ani ploidní chiméry, ale v průměru (ze všech dob působení) přežilo 59 % ošetřených jedinců. Při koncentraci 50 μ M byly detekovány ploidní chiméry, žádní polyploidi a ošetření přežilo 41 % jedinců. Žádní polyploidi nevznikli ani při nejvyšších koncentracích, ale počet jedinců, kteří ošetření přežili, stále klesal (při nejvyšší koncentraci přežilo jen 18 %). Sakhanokho et al. (2009) syntetizovali tetraploidy z diploidních jedinců druhu *Hedychium muluense*. Koncentrace roztoku kolchicinu byla 2,5 mM, 5 mM a 10 mM, doba působení 24, 48 a 72 hodin a roztok byl aplikován na buněčné kalusy a na nich vzniklá somatická embrya, jejichž ploidie pak byla měřena. Nejlepším výsledkem bylo 13 % tetraploidních jedinců při použití roztoku s koncentrací 2,5 mM a působení 24 hodin. U použité koncentrace 5 mM vzniklo jen cca 5 % tetraploidů a koncentrace 10 mM byla pro všechna somatická embrya letální. Madon et al. (2005) prováděli kolchicinový treatment na druhu *Elaeis guineensis*. Kolchicin měl koncentraci 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM a 12,5 mM, roztok byl aplikován na 30 dní staré semenáčky a doba působení byla 48, 24, 18, 8 a 6 hodin. Roztok s nejmenší koncentrací tak na semenáčky působil nejdelší dobu a naopak. Tetraploidi vznikli při použití roztoku s koncentrací 5 mM (24 hod.), 10 mM (8 hod.) a 12,5 mM (6 hod.) s tím, že úspěšnost byla 6-12 %. Úmrtnost semenáčků se ve všech případech pohybovala kolem 70 %. Z uvedených studií vyplývá, že koncentrace kolchicinu, jeho doba působení a rostlinný materiál na jaký je aplikován má na vznik

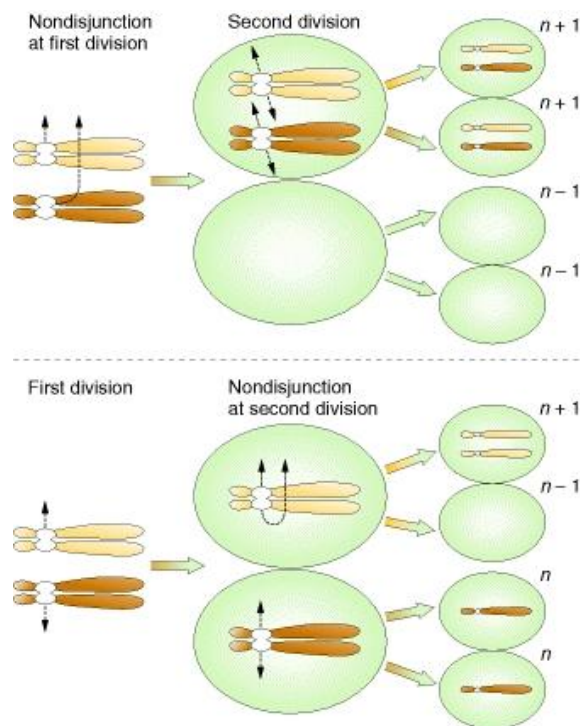
polyploidních rostlin zcela zásadní vliv. Navíc výsledky ukazují, že každý druh i konkrétní jedinec reagují na kolchicinový treatment jinak. To znamená, že ačkoli se lze inspirovat metodikou z nějaké studie, to do jaké míry bude polyploidizace úspěšná (zvláště pokud pracujete s jiným druhem než autor studie) se nedá dopředu příliš odhadnout.

Pokud k somatické polyploidizaci rostlin využijeme některou ze zmíněných anti-mitotických látek, je třeba počítat s tím, že tyto látky sami o sobě ovlivňují fenotyp rostlin. (Ramsey and Schemske 2002). Kolchicin urychluje vývoj rostlin, jedinci tvoří obvykle více biomasy a mají větší listy, květy i plody, což může být žádoucí zejména u užitkových rostlin (Ascough et al. 2008). Dochází ke zvětšení mezofylových buněk a zvýšení počtu chloroplastů (Francis et al. 1990, Hassan and Wazuddin 2000). Při buněčném dělení ale častěji vznikají chyby při tvorbě bivalent a zvyšuje se množství univalent a multivalent, což vede k nesprávnému párování chromosomů a to může způsobovat nižší viabilitu semen a pylu (Hassan and Jones 1994), Obr. 2.



Obrázek 2 - Ilustrace možnosti párování chromosomů u tetraploidů při meióze. Čtyři homologní chromosomy se mohou párovat jako dva bivalenty nebo jeden kvadrivalent. Obě možnosti pak vedou ke vzniku funkčních gamet. Ale může dojít i k možnosti párování univalent-trivalent a výsledkem jsou pak gamety nefunkční (Griffiths et al. 1999)

Konečným výsledkem nesprávného párování chromosomů je častý vznik aneuploidních jedinců, Obr. 3.



Obrázek 3 - Ilustrace vzniku aneuploidních gamet kvůli nondisjunkci (tj. chybnému rozchodu chromosomů) při prvním a druhém meiotickém dělení (Griffiths et al. 1999).

Fenotyp aneuploidů se obvykle liší od euploidních rostlin. Příkladem je studie Henry et al. (2005) u druhu *Arabidopsis thaliana*. U některých druhů rostlin jsou ale aneuploidi na první pohled nerozeznatelní od jedinců s kompletní sadou chromosomů. To se ukázalo ve studii Ellerströma and Sjödin (1966) u druhu *Trifolium pratense*, kdy se aneuploidi od tetraploidů lišili pouze menší produkcí květů a semen. Ve studii Jascaniho et al. (2005) měli neotetraploidi více chlorofylu a více sekundárních metabolitů než diploidi. Produkovali ale jen třetinu množství semen v porovnání s diploidy, což mohlo být způsobeno právě problémy při meioze. Toto vysvětlení podporuje studie Hassana and Jonese (1994), kteří ukázali, že u syntetických polyploidů vytvořených kolchicinem se měnila frekvence a distribuce chiasmat mateřských buněk pylu, což může narušit jeho fertilitu. Podle Husbana et al. (2008) je možné tyto účinky kolchicinu eliminovat tím, že se zkříží dva různí neopolyploidní jedinci ze stejné populace. Již na první generaci potomstva takto zkřížených rodičů lze pozorovat vlastnosti vzniklé pouze v důsledku zdvojení genomu, nikoliv v důsledku ošetření kolchicinem.

3.7 Akumulace kadmia u diploidních a polyploidních rostlin

Kadmium patří mezi těžké kovy, které se v přírodě přirozeně vyskytují v malém množství. Jeho koncentrace v půdě se však v průběhu času zvyšuje a to zejména kvůli antropogenní činnosti. Příjem kadmia rostlinami z půdního roztoku je metabolicky zprostředkovaný a kadmium se váže na stejné přenašeče jako některé základní stopové prvky, kterými jsou např. Zn, Fe a Cu (Tyler et al. 1989). Většina přijatého kadmia se akumuluje v kořenech, ale postupně dochází k jeho částečné translokaci xylémem do nadzemních částí rostlin a to jak do vegetativních tak generativních orgánů (např. Alfadul and Al-Fredan 2013, Grant et al. 1998). A právě následný transport kadmia až do plodů a semen rostlin je závažný problém především u hospodářských plodin. V lidském organismu se kadmium postupně ukládá v ledvinách a způsobuje jejich poškození. Bylo také prokázáno, že se jedná o významný faktor, který přispívá ke vzniku osteoporózy (Alfvén et al. 2000).

U rostlin jsou příznaky intoxikace kadmii dobře identifikovatelné. Typickým symptomem je chloróza. S rostoucím obsahem Cd v rostlinách se obvykle snižuje množství chlorofylu v listech, což se projevuje jejich světle zelenou až nažloutlou barvou (Alfadul and Al-Fredan 2013). U druhu *Brassica juncea* bylo pozorováno hromadění tohoto těžkého kovu (v případě nadzemní části) hlavně v mladých listech, ale celkově nejvyšší koncentrace byla naměřena v trichomech, kde bylo 43krát více kadmia než v listech. Je pravděpodobné, že se jedná o jednu z možností detoxifikačního procesu, protože trichomy jsou v podstatě struktury nacházející se mimo list (Salt et al. 1995). Kadmium má negativní vliv i na růst primárních kořenů, kdy se stoupající koncentrací Cd dochází ke snížení přírůstku jejich biomasy. Důvodem je narušení buněčného dělení v kořenové špičce. Dokonce byla pozorována i změna ploidie u těchto buněk (Fusconi et al. 2006). Kořeny také mohou měnit barvu a strukturu, tj. jsou hnědé, tenké a křehké (Fusconi et al. 2006). Z toho důvodu tvoří rostliny stresované vysokými dávkami kadmia obvykle menší množství biomasy než rostliny pěstované v normálních podmínkách (např. Grejtovský and Pirč 2000). Z kořenů do listů je kadmium translokováno xylémem tj. díky transpiračnímu proudu. Salt et al. (1995) vyvolali uzavření průduchů kyselinou abscisovou u stresovaných rostlin druhu *Brassica juncea* a *Thlaspi caerulescens* a měřili účinnost tohoto transportního systému. Výsledkem bylo, že v listech došlo k dramatickému snížení obsahu kadmia oproti jedincům, kteří měli průduchy otevřené,

ale jeho koncentrace v kořenech byl u obou skupin stejná. Z toho vyplývá, že akumulace Cd v kořenech a v listech jsou dva oddělené procesy, založené na odlišném principu. Cakmak et al. (2000) popsali i opačný směr transportu tj. floémem z listů do kořenů, jedná se však o způsob méně efektivní než v případě xylému.

Kadmium dále ovlivňuje složení a koncentraci volných aminokyselin (u některých AK dochází k poklesu koncentrace, např. u treoninu, a u jiných naopak k jejímu růstu např. u prolinu). Dále byl pozorován negativní vliv na obsah rozpustných proteinů v buňce (Alfadul and Al-Fredan 2013). U vyšších rostlin kadmium indukuje vznik reaktivních forem kyslíku jako je např. peroxid vodíku, singletový kyslík, superoxidový radikál nebo hydroxylový radikál (Devi et al. 1998). Tyto látky napadají všechny typy biomolekul jako nukleové kyseliny, proteiny, lipidy aminokyseliny atd., což vede k nenapravitelným poškozením buněčných struktur a obvykle končí smrtí buňky (Mehta et al. 2002). Tento jev byl pozorován např. u druhu *Phragmites australis*, u něhož se zvyšující koncentrací kadmia rostla peroxidace proteinů (tj. jejich oxidační degradace). Zajímavé je, že zde nebyla lineární závislost mezi množstvím kadmia a počtem volných radikálů. Naopak po delší době došlo k jejich poklesu v důsledku rostoucí aktivity antioxidantních enzymů, kterými jsou např. superoxid dismutáza nebo peroxidáza (Alfadul and Al-Fredan 2013). Kadmium také ovlivňuje příjem esenciálních prvků z půdního roztoku. Vhodným příkladem je zinek, se kterým má Cd mnoho společných fyzikálních a chemických vlastností (oba patří do II. B skupiny v periodické soustavě prvků). Oba tyto prvky se váží na stejné přenašeče, kterými jsou transportovány do buňky a kompetují spolu o jejich vazebná místa. Z toho důvodu se pak často objevuje negativní korelace mezi množstvím přijatého Cd a Zn v rostlinách (Das et al. 1997).

Množství kadmia, které je rostlinami akumulováno a translokováno do listů se primárně odvíjí od jeho koncentrace v půdě a doby, po kterou byly rostliny působení vystaveny. Bylo ale zjištěno, že rozdíly v reakci na přítomnost Cd v půdě jsou nejen mezi jednotlivými druhy rostlin (např. Salt et al. 1995), ale také mezi ploidiemi (Grejtovský and Pirč 2000), kultivary a dokonce i genotypy v rámci jednoho druhu (Yu et al. 2006, Kraljević - Balalić et al. 2009).

Studii, které se věnují rozdílům v akumulaci kadmia u autoployploidních rostlin je jen velmi málo. Z toho důvodu je zde citováno i několik článků, které se věnují studiu vlivu ploidity na příjem Cd u allopolyploidů, a to pro lepší představu o efektu většího

počtu chromosomových sad, přestože jsou odlišného genetického původu. V centru zájmu je v tomto případě rod *Triticum*, protože se jedná o jednu z hlavních zemědělských plodin. Jedná se o allopolyploidní komplex, který se skládá z diploidů, tetraploidů, hexaploidů a oktoploidů a zahrnuje několik desítek druhů a kultivarů. Byl zde pozorován obecný trend, kdy rostliny s nižší ploidií akumulovaly více Cd než jedinci s ploidií vyšší (Kraljević - Balalić et al. 2009, Cakmak et al. 2000, Ci et al. 2010). Ojedinělým příkladem studie této problematiky u autopolyloidních rostlin je práce věnující se druhu *Matricaria chamomilla*, který tvoří diploidní kultivar Novbona a tetraploidní kultivar Lutea. Také v tomto případě diploidi akumulovali v listech i kořenech více Cd než tetraploidi a v důsledku toho u nich došlo k silnější inhibici růstu. Diploidi měli menší kořenový systém i nadzemní část a vytvořili méně květů a pouze u této ploidiie došlo ke snížení koncentrace Zn v kořenech i v listech (Grejtovský and Pirč 2000). Jedním z možných vysvětlení těchto výsledků může být odlišná rychlost transportu kadmia přes buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu u jednotlivých ploidií (Cakmak et al. 2000). Další alternativou je pak vyšší aktivita antioxidantních enzymů zabraňujících buněčné destrukci způsobené reaktivními formami kyslíku, která byla prokázána při stresu suchem u syntetických tetraploidů druhu *Dendranthema nankingense* (Liu et al. 2011). Nicméně je jasné, že je potřeba mnoha dalších studií na toto téma, aby bylo možné formulovat nějaké obecnější závěry.

3.8 Reakce diploidů a polyploidů na stres suchem a zastíněním

U diploidních a polyploidních rostlin je často řešena otázka, zda jsou polyploidi odolnější vůči biotickým a abiotickým stresovým faktorům. Tento předpoklad plyne z faktu, že polyploidi mají více sad genů než diploidi a mohli by tak generovat širší spektrum odpovědí na podmínky prostředí (Song et al. 1995, Yang et al. 2014). Vodní deficit patří mezi abiotické stresy, které významně ovlivňují růst a celkově přežití rostlin. Také zastínění je faktor, který může výrazně ovlivnit celkovou účinnost fotosyntézy a tím výrazně ovlivnit konkurenční boj mezi jedinci na stanovišti (Givnish 1988).

Základním procesem probíhajícím v rostlinách je fotosyntéza a tento fyziologický proces je závislý na faktorech prostředí, na fyziologickém stavu daného jedince a také na anatomii listů různých druhů. Jednou z možností jak by se polyploidi mohli snáze

vyrovnat se stresem je využití anatomických a biochemických změn, ke kterým u rostlin po polyploidizaci dochází. (Warner and Edwards 1993). Polyploidní jedinci mají větší průduchy a mezofylové buňky než diploidi, ale mají jich menší počet na plochu (např. Maherali et al. 2009). S rostoucí ploidí se také zvyšuje počet chloroplastů, množství chlorofylu a obsah Rubisca v buňce. To vede k tomu, že rychlost fotosyntézy v jedné buňce je sice vyšší u polyploidů, ale protože s rostoucí velikostí buněk proporčně klesá jejich počet, tak rychlost fotosyntézy na jednotku plochy je u obou ploidí stejná (Warner and Edwards 1993).

Jednoduchou a nedestruktivní metodou jak měřit stres u rostlin je měření fluorescence chlorofylu. V listech zdravých rostlin za stabilních optimálních podmínek, je zhruba 80 % absorbované světelné energie použito pro fotochemii, cca. 15 % je vyzářeno v podobě tepla a cca. 3-5 % je re-emitováno v podobě fluorescence. Vazba mezi fotochemií a fluorescencí je nejsilnější ve fotosystému II (PS II). Za pokojové teploty 90 % fluorescenční emise pochází právě z PS II, respektive z přilehlých světlosběrných systémů, které obsahují velké množství molekul chlorofylu-a (Nedbal et al. 2000). V případě, že je fluorescence nízká, tak účinnost primární fáze fotosyntézy je vysoká. Naopak působení stresových faktorů způsobuje nižší účinnost fotosyntézy, což vede k vyšším ztrátám energie prostřednictvím tepla a fluorescence (Krause and Weis 1991). Právě poškození PS II je často prvním projevem působení neoptimálních podmínek pro růst rostliny. Z naměřených hodnot vyjadřujících fungování PS II vztažených k množství energie vyzářené jako fluorescence, se tak dá zjistit, jak jsou rostliny na daný stres citlivé a jak jsou schopny jej tolerovat (Roháček and Barták 1999). U rostlin ve světelně adaptovaném stavu se obvykle měří parametr Q_y . Tento parametr vyjadřuje efektivní kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie ve fotosystému II (tj. aktuální fotochemickou účinnost fotosystému II) a měří se na listech ve světelně adaptovaném stavu. Počítá se podle vzorce $(FM' - F0')/FM'$, kde FM' je maximální fluorescence chlorofylu a a $F0'$ je minimální fluorescence chlorofylu a u světelně adaptovaných rostlin (Roháček 2002).

Li et al. (1996) zkoumali reakci na stres suchem u druhu *Betula papyrifera*, u něhož se vyskytují tři cytotypy a to diploidi, tetraploidi a pentaploidi. Bylo prokázáno, že polyploidní rostliny byly odolnější vůči suchu než diploidní rostliny. Polyploidi měli silnější svrchní i spodní epidermis, měli listy hustěji pokryty trichomy, které zvyšují

odrazivost slunečního záření. Diploidi zavírali průduchy dříve než polyploidi z toho důvodu, že nebyli schopni udržet si turgor buněk při tak nízkých hodnotách vodního potenciálu jako polyploidi. Polyploidi tedy mohli déle přijímat oxid uhličitý a účinnost fotosyntézy tak byla vyšší než u diploidů ve stejném prostředí. K podobnému výsledku došli i Li et al. (2009) u diploidního a tetraploidního kultivaru *Lonicera japonica*, kdy tetraploidi měli silnější epidermis, více trichomů a navíc vyšší hodnoty parametru Qy. Po obnovení závlivky došlo k rychlejšímu návratu do původního fyziologického stavu právě u tetraploidů.

Podobně jako těžké kovy i sucho způsobuje vznik a akumulaci reaktivních forem kyslíku v rostlinách. Liu et al. (2011) sledovali působení vodního stresu na diploidy a kolchicinem indukované neotetraploidy u druhu *Dendranthema nankingense*. U obou cytotypů se tvořily kyslíkové radikály, ale neotetraploidi měli účinnější antioxidantní odpověď, tj. produkovali více ochranných enzymů jako např. superoxid dismutázu. Neotetraploidi měli také nižší obsah malondialdehydu v buňkách, což znamená, že u nich došlo k menší degradaci lipidů. Stejný výsledek vyšel ve studii Yanga et al. (2014), kteří porovnávali dva kultivary přirozených diploidů a tetraploidů u druhu *Oryza sativa*. U obou cytotypů došlo ke snížení efektivity fotosyntézy při vodním deficitu. U tetraploidů však byla naměřena vyšší hodnota parametru Qy, což ukazuje, že diploidi byli suchem více postiženi.

Maherali et al. (2009) zkoumali u diploidů, tetraploidů a kolchicinem indukovaných neotetraploidů u druhu *Chamerion angustifolium* hydraulickou vodivost xylému. Tetraploidi a neotetraploidi měli větší xylémové buňky než diploidi a byli tak schopni transportovat více vody v rostlině. Tetraploidi měli nižší vodní potenciál a vyšší hydraulickou vodivost než diploidi i než neotetraploidi a kvůli tomu začali později vadnout a umírat. Z výsledků této studie vyplývá, že fyziologická tolerance vodního stresu není pravděpodobně způsobena přímo polyploidizací, ale tato adaptace se vytvořila až v průběhu evoluce.

Odlišné výsledky v reakci na vodní stres pozoroval Sugiyama (2006) u druhu *Lolium perenne* a *Lolium multiflorum*. U druhu *L. multiflorum* se žádný rozdíl mezi cytotypy neprokázal a u druhu *L. perenne* vykazovaly vyšší odolnost diploidní rostliny. Tyto výsledky byly vysvětleny na základě relativního obsahu vody v pletivech rostlin. Tetraploidi druhu *L. perenne* obsahovali více vody než diploidi a proto byli více citliví na

její nedostatek. U druhu *L. multiflorum* byl obsah vody v pletivech diploidů a tetraploidů podobný a proto se jejich odpověď na vodní deficit nelišila. Hijmans et al. (2007) pozorovali odlišnou distribuci cytotypů u rodu *Solanum*, kdy diploidi osidlovali spíše sušší a teplejší stanoviště ve srovnání s polyploidy.

Co se týká reakce diploidů a polyploidů na zastínění, tak literatury na toto téma je velmi málo. Frydrych (1970) studoval reakci diploidů a tetraploidů na zastínění u druhu *Brassica oleracea*. Oba cytotypy reagovaly na stín zvýšením obsahu chlorofylu v listech a tím, že vytvořili méně biomasy než kontrolní rostliny. Tetraploidi ale měli v listech více chlorofylu a vytvořili více biomasy/list než diploidi. U nestíněných rostlin probíhala fotosyntéza efektivněji než u těch stíněných. Ale v obou případech tj. u stíněných i nestíněných jedinců byla rychlost fotosyntézy vyšší u diploidů. Sano (1980) ale pozoroval, že tetraploidní kultivary druhu *Oryza punctata* se vyskytovaly spíše na stinných než slunných stanovištích. Petit and Thompson (1997) se zabývali studiem druhu *Arrhenatherum elatius*, u něhož diploidi i tetraploidi osidlují jak stinná lesní stanoviště, tak slunné louky. Tyto výsledky ukazují, že odpověď na zastínění u diploidů a tetraploidů je spíše druhově specifická, než že by byla výrazně ovlivněna ploidií rostlin.

4 Metodika

4.1 Neopolyploidní rostliny

4.1.1 Modelové druhy rostlin

Pro studii byly vybrány tři druhy cévnatých rostlin, které se v přirozených populacích vyskytují současně jako diploidi a tetraploidi. Jedná se o běžně se vyskytující druhy lučních společenstev, které byly zároveň předmětem studia na Oddělení cévnatých rostlin PŘF UK, odkud jsme získali informace o lokalitě výskytu a ploidii populací u jednotlivých druhů. Diploidní a tetraploidní semena byla sebrána v roce 2010 Mgr. Tomášem Procházkou, který zkoumá rozdíly v ekologických nárocích diploidů a tetraploidů z přirozených populací. Celkem byla nasbírána semena z 6 – 7 populací od každého druhu vždy z deseti jedinců na populaci a cca 200 semen na jedince. Část sebraných diploidních semen mi byla přenechána a ty jsem použila pro vlastní syntézu neopolyploidních rostlin (příloha 2).

U každého z níže uvedených druhů je uveden počet chromosomů diploidního a tetraploidního cytotypu a jméno osoby, která se studiem daného druhu zabývala. U všech druhů se předpokládá autopolyloidní původ, ačkoliv to nelze s naprostou jistotou prokázat.

Centaurea phrygia L., Asteraceae, ($2n = 22$, $4n = 44$) – Petr Koutecký

Pimpinella saxifraga L., Apiaceae ($2n = 20$, $4n = 40$) – Dana Kořínková

Vicia cracca L., Fabaceae ($2n = 14$, $4n = 28$) – Anežka Eliášová

4.1.2 Syntéza neotetraploidních rostlin

Pro syntézu neopolyploidních rostlin jsem využila metodiku Husbanda et al. (2008), kteří používali kolchicin k vytvoření neopolyploidů u druhu *Chamerion angustifolium*. Do května 2012 byl kolchicin aplikován na druhy *Vicia cracca*, *Pimpinella saxifraga* a *Centaurea phrygia*. U všech druhů byl použit stejný níže uvedený postup.

Na vlhký filtrační papír na Petriho misce bylo vyseto 50 semen deseti mateřských rostlin z populací, které jsem měla k dispozici. Do vody, kde byl namáčen filtrační papír, byla přidána jedna kapka fungicidu Previkur. Petriho misky byly umístěny do klimaboxu Convicon (světelný režim 12 hod. den, 12 hod. noc, vlhkost 50 % den, 70 % noc a 20 °C

den, 10 °C noc). Semena klíčila ve velkém časovém rozmezí. Vzhledem k tomu, že kolchicin musel být aplikován na 10 dní staré semenáčky, tak semenáčky potřebného stáří byly přemístěny na nové Petriho misky a následně byl proveden kolchicinový treatment. V laminárním flow boxu byl na semenáčky pipetou aplikován 0,2% roztok kolchicinu (cca 2 ml roztoku/1 semenáček), který působil 12 hodin (u druhu *Vicia cracca* byla vyzkoušena i doba působení 18 hodin). Po dvanácti hodinách byly semenáčky třikrát opláchnuty destilovanou vodou. Následující den byly ošetřené semenáčky přesazeny do sadbovače se směsí země a písku (3:1). Protože semenáčky byly z Petriho misky „zvyklé“ na vysokou vzdušnou vlhkost, tak byl celý sadbovač zakryt mikrotenovou fólií, aby bylo zabráněno rychlému vysychání substrátu a rostlin. Sadbovač byl umístěn do klimaboxu značky Thermo forma (16 hodin světlo, 8 hodin tma, 24 °C), kde semenáčky lépe rostly.

4.1.3 Ověřování ploidie rostlin na průtokovém cytometru

Poté co semenáčky dostatečně povyroستly, tj. vytvořily několik nových listů, byla jejich ploidie ověřována na průtokovém cytometru na katedře botaniky PŘF UK. Vzorky pro cytometrické analýzy byly připravovány z živých pletiv a analyzovány na cytometru Partec ML (Partec, Münster, Germany, UV LED jako excitační zdroj). Pro izolaci a barvení jader byla zvolena metodika podle Doležel et al. (2007). Přibližně 4 mm² listového pletiva spolu s 10 mm² listového pletiva standardu byly rozsekány ostrou žiletkou v 600 µl ledového extrakčního pufru Otto I (0,1M monohydrát kyseliny citronové, 0,5% Tween 20; Otto 1990) v Petriho misce a promíchány pipetou. Suspenze byla přefiltrována přes nylonový filtr (velikost oka 42 µm) do zkumavky a inkubována alespoň 20 minut při pokojové teplotě. Ke vzorku byl poté přidán 1 ml barvicího roztoku obsahujícího pufr Otto II (0,4M Na₂HP0₄ · 12H₂O; Otto 1990), antioxidant β-mercaptoethanol (2 µl/ml, Sigma) a fluorochrom DAPI (4 µl/ml). Po inkubaci (přibližně 1 min při pokojové teplotě) byl vzorek analyzován na průtokovém cytometru. Z každého vzorku bylo změřeno 3000 částic při rychlosti přibližně 15-25 částic za vteřinu. Výsledné histogramy (na ose X relativní intenzita fluorescence, na ose Y množství měřených částic) byly analyzovány v programu FlowMax (verze 2.4d, Partec, Münster, Germany).

Použité standardy pro jednotlivé druhy:

Druh *Vicia cracca* – standard *Pisum sativum* cv. Ctirad (2C = 9,09 pg, Doležel et al., 1998)

Druh *Centaurea phrygia* – standard *Glycine max* cv. Polanka (2C = 2,50 pg, Doležel et al., 1994)

Druh *Pimpinella saxifraga* – standard *Bellis perennis* (2C = 3,38 pg, Schönswetter et al., 2007)

4.1.4 Získání 2. generace neopolyploidních rostlin

Po změření ploidie semenáčků na průtokovém cytometru byl pro každého jedince vypočten z hodnot relativní fluorescence jeho poměr ke standardu. Následně byla vypočtena průměrná hodnota relativní fluorescence jedinců, kteří zůstali diploidní. Tento průměr byl použit k výpočtu vzájemného poměru diploidů a rostlin, které zpolyploidizovaly tj. neotetraploidů. Za striktní neotetraploidy byli považováni jedinci jejichž poměr k diploidům byl mezi hodnotami 1,95 – 2,05 (tj. s tolerovanou odchylkou 0,05 od dvojnásobku). Hodnoty relativní fluorescence rostlin, na které byl aplikován kolchicin, byly porovnány s hodnotami přirozených diploidů a tetraploidů převzatých z jiných studií (Eliášová 2008, diplomová práce – *Vicia cracca*, Koutecký et al., 2012 – *Centaurea phrygia* a Kořínková, nepublikovaná data – *Pimpinella saxifraga*). Tato data byla zjišťována z důvodu ověření relevantnosti hodnot relativní fluorescence, které v tomto pokusu u jednotlivých ploidí vyšly.

Jedinci, kteří byli označeni jako striktně neotetraploidní, byli přesazeni do plastových květináčů (10 x 10 cm, hranaté) a umístěni do skleníku v botanické zahradě PřF UK. Neotetraploidní rostliny bylo nutné vzájemně zkřížit (různé jedince ze stejné populace) a získat z nich druhou generaci rostlin, u kterých už je odfiltrován vliv kolchicinu na jejich fenotyp. Ploidie rostlin byla znovu přeměřována těsně před kvetením, protože může dojít k tomu, že polyploidní nejsou všechny části rostliny. Květy druhu *Centaurea phrygia* byly zapytlíkovány, aby nedošlo k cizosprášení s jedinci stejného druhu, kteří byli také umístěni v pokusné zahradě. Po vykvetení více květů na různých rostlinách bylo provedeno ruční opylení, které však bylo neúspěšné a vznikla pouze abortovaná semena. Jedinci druhu *Vicia cracca* byli přesazeni do větších stabilnějších plastových květináčů (19 x 19 cm, kulaté) umístěných v pokusné zahradě dostatečně daleko od nejbližší populace vikví a byli ponecháni přirozenému opylení hmyzem. Ruční opylení u tohoto druhu je obtížné a hrozí velké poškození květů. Neotetraploidi druhu *Pimpinella saxifraga* vykvetli až na jaře 2014.

Semena přirozených diploidů, tetraploidů a neotetraploidů (1. generace neotetraploidních semen) byla vyseta na začátku března 2014 (u každé skupiny pocházely semena pouze z jedné populace). Osemení semen bylo mechanicky narušeno broušením smirkovým papírem, aby se usnadnilo jejich klíčení. Semena byla vyseta jednotlivě do plastových květináčů (10 x 10 cm, hranaté) se směsí země a písku (3:1), aby byly jednotlivé rostliny odděleny. Z každé skupiny byl vyset jednotný počet semen tj. 31, což bylo dáno počtem neotetraploidních semen získaných z křížení v roce 2013. Semena diploidů a tetraploidů byla sebrána taktéž v roce 2013 a to z mateřských rostlin v pokusné zahradě, které byly vypěstovány ze semen sebraných v přirozených populacích v roce 2010. Semena z každé skupiny pocházejí jen z jedné populace a u diploidů a neotetraploidů pouze ze dvou mateřských rostlin, u tetraploidů byla semena sebrána z více mateřských rostlin. Semena přirozených tetraploidů musela být vyseta znovu (25 semen), protože v první sadě vyklíčilo pouze 5 jedinců.

4.1.5 Ověřování ploidie 2. generace neopolyploidních rostlin

Ploidie byla ověřována u semenáčků, kteří vyklíčili ze semen získaných zkřížením somatických neotetraploidů 1. generace tj. rostlin, na které byl aplikován kolchicin. Ze dvou mateřských rostlin bylo sebráno celkem 31 semen, z nichž 27 vyklíčilo. Ploidie všech jedinců byla měřena na průtokovém cytometru. U šesti rostlin bylo také provedeno počítání chromosomů, kvůli ověření jejich reálného počtu. Tito jedinci reprezentují škálu hodnot relativní fluorescence (od té nejnižší po nejvyšší), které byly na průtokovém cytometru naměřeny (Tab. 1). Hodnoty u rostlin č. 27, 17 a 20 dokonce převyšovaly hodnoty naměřené u přirozených tetraploidů. Pro porovnání byly chromosomy počítány také u jednoho přirozeného diploida a tetraploida a u jednoho ze dvou neotetraploidních rodičů.

V dopoledních hodinách byly z vybraných rostlin odebrány kořenové špičky, které byly vloženy na 2 hodiny do p-dichlorbenzenu kvůli předpůsobení. Následně byl materiál přenesen do čerstvě připravené fixáže (směs etanolu a kyseliny octové, 3:1), kde byl ponechán do následujícího dne. Kořenové špičky pak byly cca 30 vteřin macerovány (směs etanolu a HCl, 1:1), následně vyprány ve vodě a přeneseny na podložní sklo. Na podložním skle byl proveden roztlak v několika kapkách lacto-propion

orceinu (5 ml kys. mléčné, 5 ml kys. propionové, 0,2 g orceinu, tento zásobní roztok byl smíchán s vodou v poměru 1:1). Chromosomy byly pozorovány při zvětšení 1250x (100x objektiv, 12,5x okulár) na mikroskopu CAIs NU a foceny fotoaparátem Olympus E510.

Tabulka 1 - Seznam neotetraploidů 2. generace, u kterých byly počítány chromosomy společně s jejich hodnotami relativní fluorescence naměřené na průtokovém cytometru.

ČÍSLO ROSTLINY	HODNOTA RELATIVNÍ FLUORESCENCE
11	1,360
23	1,385
5	1,422
27	1,465
17	1,485
20	1,516

4.1.6 Srovnání fenotypu přirozených diploidů, tetraploidů a neotetraploidů

4.1.6.1 Měření velikosti průduchů

Velikost průduchů byla měřena u pěti diploidních, pěti tetraploidních a šesti neotetraploidních rostlin. U neotetraploidů se jednalo o stejné jedince, u nichž byly počítány chromosomy, a účelem bylo ukázat možnou korelaci mezi velikostí průduchů a počtem chromosomů (popř. velikostí relativní fluorescence naměřené na průtokovém cytometru). Z každé rostliny byl odebrán jeden složený list (celé listové větveno s listovými jařmy), z něhož byl pro analýzu použit pouze jeden lístek ze třetího listového jařma vpravo (počítáno od báze složeného listu, při pohledu na lícovou stranu). Listy byly vloženy do malých Petriho misek a zality odbarvovacím roztokem (96% denaturovaný etanol a kyselina octová, objemový poměr 3:1), ve kterém byly ponechány 3 hodiny. Odbarvené listy byly přeneseny na 2 hodiny do roztoku laktoglycerolu (kyselina mléčná, glycerol a voda, objemový poměr 1:1:1) kvůli změkčení. Výsledné vzorky byly uchovány na filtračním papíru namočeném v laktoglycerolu, který byl vložen do eppendorfky. Listy byly pozorovány pod mikroskopem (přímý mikroskop, Olympus BX60) při zvětšení 200x (objektiv 20x, okuláry 10x). Celkem byla měřena délka dvaceti průduchů u každého vzorku (vždy na spodní straně, ve střední části listu). U každého listu bylo pořízeno několik fotografií (kamera Olympus DP70), na kterých byly průduchy ihned měřeny (program QuickPhoto mikro verze 3.0).

4.1.6.2 Rychlost klíčení semen a relativní růstová rychlost rostlin

U semen byla zaznamenána rychlost vyklíčení. U semenáčků byla následně měřena rychlost růstu. Měření probíhalo jednou týdně po dobu šesti týdnů. Každý jedinec byl tedy bez ohledu na dobu vyklíčení změřen šestkrát. Vždy byla zaznamenána délka nejdelší lodyhy. U rostlin byla počítána relativní rychlost růstu (RGR) následujícím způsobem:

$$\text{RGR} = (\text{výška 2} - \text{výška 1}) / \text{výška 1}$$

Výška 2.....výška rostliny v 6. týdnu

Výška 1.....výška rostliny v 1. týdnu

4.2 Akumulace kadmia u diploidních a tetraploidních rostlin

Pokus byl prováděn na druzích *Vicia cracca* a *Centaurea phrygia* pěstovaných v *in vitro* podmínkách. Pro každou ploidiu u obou druhů byla vyseta semena z několika populací, aby měli rostliny větší genetickou variabilitu. Před vysetím byla semena sterilizována 5 minut v 70% etanolu a následně 10 minut v 20% SAVU (5% NaClO). U druhu *C. phrygia* byl do sava přidán ještě detergent (1% TWEEN 20), který umožní lepší smáčivost povrchu semen. V laminárním flow boxu byla semena třikrát promyta sterilní vodou, vyseta do skleniček na pevné MS médium (Murashige and Skoog, 1962, příloha 1) a umístěna do klimaboxu. Režim nastavený v klimaboxu byl rozdělený celkem na 6 fází, které se lišily intenzitou osvětlení, teplotou a dobou průběhu (Tab. 2). Zde byly semenáčky ponechány do doby, než vytvořily 2-3 pravé listy.

Tabulka 2 - Podmínky v klimaboxu, kde byla semena umístěna na vyklíčení.

Fáze režimu	Počet hodin	Intenzita osvětlení (lx)	Teplota
L1	7	11997	24 °C
L2	2	1333	23 °C
L3	2	0 (tma)	21 °C
L4	9	0 (tma)	20 °C
L5	2	0 (tma)	22 °C
L6	2	3999	23 °C

Rostliny byly následně umístěny do kultivační místnosti s režimem 16 hodin světlo, 8 hodin tma a teplota 24 °C. U druhu *Centaurea phrygia* byly semenáčky (Obr. 4) postupně rozsazeny a kultivovány jednotlivě kvůli lepšímu růstu. U druhu *Vicia cracca* musely být rostliny namnoženy řízkováním, tj. pomocí internodálních segmentů, a bylo pěstováno vždy několik rostlin dohromady v jedné skleničce.



Obrázek 4 - Ukázka rostlin pěstovaných v podmínkách in vitro u druhu *Centaurea phrygia*.

Rostliny byly po dosažení dostatečné velikosti přesazeny opět na pevné MS médium, do kterého bylo nyní přidáno kadmium o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ (navážka 0,0308 g/l dusičnanu kademnatého). Do každé skleničky bylo odměřeno 30 ml média. Tetraploidní rostliny druhu *Centaurea phrygia* byly rozsazeny jednotlivě. U diploidů byli nasazeni 2-3 menší jedinci do každé skleničky, protože v průběhu kultivace došlo postupně ke kontaminaci všech původních rostlin a nově vypěstovaní diploidi museli být použiti již při cca poloviční velikosti tetraploidů. U diploidů a tetraploidů druhu *Vicia cracca* bylo nasazeno 4-5 jedinců do jedné skleničky, protože z jedné rostliny by nebylo možné získat dostatečné množství biomasy pro měření obsahu kadmia.

Vzorky rostlin byly odebrány po 2, 6, 10, 14, 17 a 20 dnech působení kadmia. Pro každý odběr byla tři opakování s výjimkou posledního, kde byla pouze dvě. U druhu *C. phrygia* byla celková biomasa rostlin z každé skleničky, při všech odběrech, rozdělena na kořeny a listy. U druhu *V. cracca* byly kořeny vždy v rámci jednoho odběru smíchány dohromady, protože samostatně měly příliš malou biomasu. Prýty z každé skleničky ale byly odděleny zvlášť. Všechny vzorky kořenů a prýtů byly zváženy, umístěny do falkonek, zmrazeny tekutým dusíkem a nechány jeden den lyofilizovat. Dalším krokem zpracování vzorků byla mikrovlnná mineralizace. Do teflonových zkumavek bylo naváženo max. 250 mg sušiny z každého vzorku (pro každý zvlášť zaznamenána přesná hmotnost) a následně byla přidána mineralizační směs složená z HNO_3 a HClO_4

v objemovém poměru 7:1. První den bylo přidáno 5 ml a druhý den 3 ml roztoku do každé zkumavky (vzorky byly ponechány přes noc v digestoři při laboratorní teplotě). Celkové množství mineralizační kyseliny bylo tedy 8 ml na 1 vzorek. Zkumavky pak byly vloženy do speciálních tub s uzávěrem a umístěny do mineralizační pece (Multiwave PRO, Anthon Paar GmbH, Rakousko). Proces mineralizace trval jednu hodinu. Vzorky byly po vyjmutí z pece přelity do falkonek, doplněny na objem 10 ml a jejich analýza byla prováděna na atomovém absorpčním spektrofotometru (SenAA, GBS, Austrálie). Současně s kadmíem byla měřena ve všech vzorcích i koncentrace zinku.

Výpočet koncentrace Cd (Zn) v 1 vzorku ($\mu\text{g/g}$):

Naměřená koncentrace ($\mu\text{g/ml}$) x 10/ sušina vzorku (g)

4.3 Reakce diploidů a tetraploidů na stres suchem a zastíněním

Reakce na stres byla měřena u druhů *Centaurea phrygia*, *Vicia cracca* a *Knautia arvensis*. Diploidní a tetraploidní rostliny byly rozmístěny do třech režimů, z nichž v jednom byla omezena zálivka, ve druhém byly rostliny stíněny a třetí režim byl kontrolní. V každém režimu bylo umístěno cca 15 jedinců od každé ploidie z každého druhu. Jedinci pocházeli z odlišných populací (6 – 7 od každého druhu) a v jejich rámci i z různých mateřských rostlin. Rostliny byly v režimech umístěny cca dva měsíce a měření probíhalo v polovině září roku 2013. U rostlin byl přístrojem FluorPen FP100 (Photon Systems Instruments, Česká republika) měřen parametr QY vyjadřující efektivní kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie ve fototystému II (tj. aktuální fotochemickou účinnost fotosystému II) a byl měřen na listech ve světelně adaptovaném stavu. Měření probíhalo dopoledne (v rozmezí 9 – 11 hodin), aby nedocházelo ke kolísání hodnot v důsledku změny teploty a slunečního záření během dne (D. Holá, nepublikovaná data). Na každé rostlině byly vybrány dva plně vyvinuté listy a na každém z nich byla ve střední části listu naměřena jedna hodnota (tyto dvě hodnoty byly následně zprůměrovány).

4.4 Analýza dat

Data byla zpracována v programu R 2.13.2. U všech dat s normálním rozdělením byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) a stabilita rozptylů byla testována F-testem. Hladina průkaznosti byla $p \leq 0,05$. Nenormální rozdělení měla pouze rychlost klíčení (Poissonovo rozdělení) a relativní růstová rychlost rychlost (Gamma rozdělení).

Jednotlivé testy:

- a) Měření velikostí průduchů u diploidů, tetraploidů a neotetraploidů.

Závislá proměnná je délka průduchů a vysvětlující proměnná je ploidie rostlin.

- b) Rozdíly v délce průduchů u aneuploidních jedinců vztažený k jejich hodnotám relativní fluorescence

Závislá proměnná je délka průduchů aneuploidních rostlin a vysvětlující proměnnou jsou hodnoty relativní fluorescence u šesti aneuploidních jedinců.

- c) Relativní růstová rychlost u diploidů, tetraploidů a neotetraploidů

Závislá proměnná je relativní růstová rychlost a vysvětlující proměnná je ploidie rostlin.

- d) Rychlost klíčení u diploidů, tetraploidů a neotetraploidů

Závislá proměnná je den vyklíčení semen a vysvětlující proměnná je ploidie rostlin.

- e) Obsah kadmia u diploidních a tetraploidních rostlin

Závislá proměnná je koncentrace Cd a vysvětlující proměnné jsou doba působení, ploidie, druh rostliny a vzorek (kořeny nebo listy).

- f) Závislost koncentrace zinku na koncentraci kadmia v rostlinách

Závislá proměnná je koncentrace zinku a vysvětlující proměnné jsou koncentrace kadmia, ploidie, druh rostlin, doba působení a vzorek (kořeny nebo listy).

- g) Reakce diploidů a tetraploidů na stres suchem a zastíněním

Závislá proměnná je hodnota faktoru Q_y a vysvětlující proměnné jsou ploidie, režim (sucho, stín, kontrola) a druh rostliny.

5 Výsledky

5.1 Neopolyploidní rostliny

5.1.1 Syntéza neopolyploidních rostlin

Výsledky shrnují provedené polyploidizační pokusy u druhů *Vicia cracca*, *Centaurea phrygia* a *Pimpinella saxifraga*. Tabulka 3 ukazuje citlivost semenáčků všech druhů na aplikaci kolchicinu a tabulka 4 ukazuje úspěšnost vzniku neotetraploidů. U jednotlivých druhů je vždy uvedena doba působení kolchicinu. U druhu *Vicia cracca* byla zkoumána reakce na dvě doby působení (12 a 18 hodin), kde bylo možno sledovat výrazný rozdíl v přežívání semenáčku a množství vzniklých neotetraploidů. Celkově se při delší době působení výrazně zvýšila mortalita rostlin (ze 43 % na téměř 98 %), ale zároveň se zvýšila úspěšnost syntézy neotetraploidů (z 9,3 % na 100 %). Výsledky z treatmentu trvajících 15 hodin (nepublikovaná data doc. Zuzany Münzbergové, získaná po optimalizaci metodiky z této práce) korelují s výše uvedenými výsledky. Druhy *Centaurea phrygia* i *Pimpinella saxifraga* reagovaly na působení kolchicinu mnohem citlivěji (pouze jedna doba působení – 12 hodin). Mortalita jedinců přesáhla v obou případech 90 %. U obou druhů ale byla vyšší úspěšnost polyploidizace (*C. phrygia* 31,6 % a *P. saxifraga* 33,3 %) ve srovnání s druhem *Vicia cracca* při stejné době působení (jen 9,3 %).

Tabulka 3 - Celkové vyhodnocení počtu vyklíčených semenáčků, které přežily aplikaci kolchicinu.

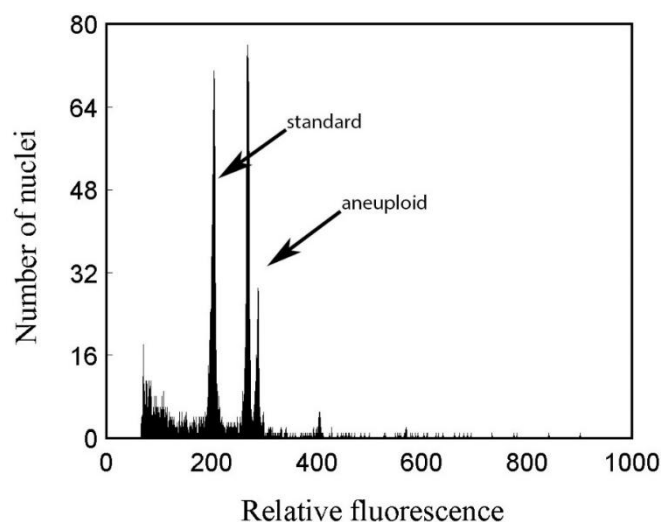
DRUH (DOBA PŮSOBENÍ)	VYSETÁ SEMENA	VYKLÍČENÁ SEMENA	KLÍČIVOST	KOLCHICIN (POČET SEMENÁČKŮ)	PŘEŽITÍ, (%)	ÚMRTNOST, (%)
<i>Vicia cracca</i> (12 hodin)	91	76	83 %	76	43, (56,6%)	33, (43,4 %)
<i>Vicia cracca</i> (15 hodin)	1824	1742	95,5 %	1742	260 (14,9%)	1482 (85,1 %)
<i>Vicia cracca</i> (18 hodin)	380	157	41,3 %	137	3 (2,2%)	134 (97,8 %)
<i>Centaurea phrygia</i> (12 hodin)	1039	462	44,5 %	462	19, (4,1%)	443, (95,9 %)
<i>Pimpinella saxifraga</i> (12 hodin)	1000	232	23,2 %	189	12 (6,3%)	177 (93,7 %)

Tabulka 4 - Celkové shrnutí úspěšnosti kolchicinového treatmentu u druhu *Vicia cracca*, *Centaurea phrygia* a *Pimpinella saxifraga* po vyhodnocení ploidie na průtokovém cytometru.

DRUH (DOBA PŮSOBENÍ)	POČET ZMĚŘENÝCH JEDINCŮ	DIPLOIDI	CHIMÉRY	TETRAPLOIDI	TETRAPLOIDI (%)
<i>Vicia cracca</i> (12 hodin)	43	35	4	4	9,3 %
<i>Vicia cracca</i> (15 hodin)	260	165	42	53	20,4 %
<i>Vicia cracca</i> (18 hodin)	3	0	0	3	100 %
<i>Centaurea phrygia</i> (12 hodin)	19	5	8	6	31,6 %
<i>Pimpinella saxifraga</i> (12 hodin)	12	4	4	4	33,3 %

5.1.1.1 Ploidní chiméry

U všech tří druhů se po aplikaci kolchicinu vyskytovaly ploidní chiméry. Nejčastěji byly detekovány u druhu *Centaurea phrygia* (42,1 %), méně pak u druhu *Pimpinella saxifraga* (33,3 %). U druhu *Vicia cracca* byl výskyt chimér nejméně častý (9,3 % - 12 hodin, 16,2 % - 15 hodin, 0 % - 18 hodin působení). Příkladem chiméry je aneuploid (graf 1) u druhu *Vicia cracca*.



Graf 1 - Zobrazení hodnot relativní fluorescence u aneuploidního jedince druhu *Vicia cracca* (fluorescenční barvivo DAPI, standard *Pisum sativum* cv. *Ctirad*).

5.1.1.2 *Vicia cracca*

Tabulka 5 shrnuje hodnoty relativní fluorescence druhu *Vicia cracca*. Průměrná relativní fluorescence u diploidů byla 0,712 a ta byla použita k vypočtení poměru mezi diploidy a neotetraploidy. Podle poměru velikosti DNA indexu diploidů a neotetraploidů bylo vybráno sedm vhodných jedinců pro následující křížení. Poměr neotetraploidů k diploidům byl mezi hodnotami 1,97 – 2,01 (relativní fluorescence = 1,398 - 1,429). Tabulka 6 převzatá z diplomové práce Mgr. Anežky Eliášové ukazuje poměry relativní fluorescence u přirozených diploidů a tetraploidů a bylo k nim přihlédnuto při výběru striktních neotetraploidů. V grafu 2 jsou společně porovnání diploid a neotetraploid druhu *V. cracca*, jejichž vzájemný poměr je pouze 1,93 a z toho důvodu nebyl tento jedinec pro křížení vybrán (Tabulka 7).

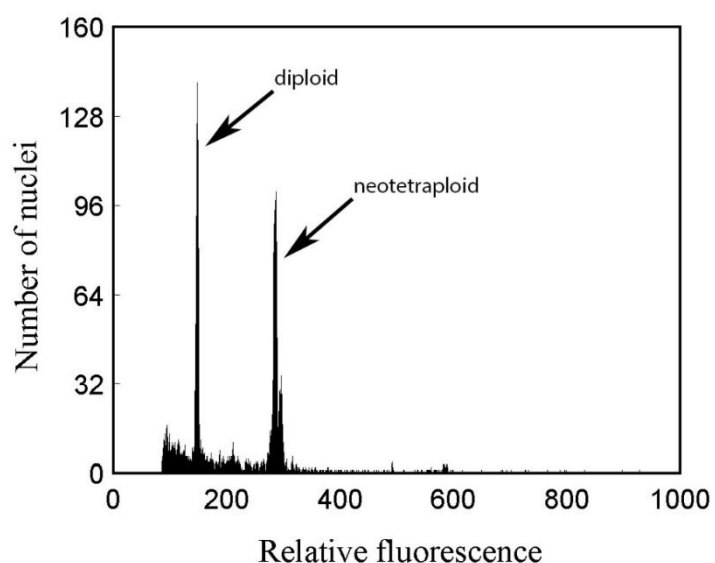
Tabulka 5 - Shrnutí poměrů relativní fluorescence u diploidů a uměle syntetizovaných neotetraploidů Vicia cracca (fluorescenční barvivo DAPI, standard Pisum sativum cv. Ctírad). Červenou barvou jsou označeni jedinci, kteří jsou považováni za striktní neotetraploidy.

VZOREK	POPULACE / JEDINEC	POMĚR 4x/2x	POMĚR KE STANDARDU	CV VZORKU	CV STANDARDU	PLOIDIE
VC 16	2 VC 4/1	-	0,695	4,42	2,74	DIPLOID
VC 2-5	2 VC 4/2	-	0,701	2,6	2,77	DIPLOID
VC 2-8	2 VC 4/2	-	0,704	1,84	1,93	DIPLOID
VC 2-10	2 VC 4/2	-	0,705	2,13	2,57	DIPLOID
VC 2-1	2 VC 4/2	-	0,707	1,42	1,52	DIPLOID
VC 2-7	2 VC 4/2	-	0,707	2,30	2,34	DIPLOID
VC 2-9	2 VC 4/2	-	0,707	2,62	3,01	DIPLOID
VC 2-8	2 VC 4/2	-	0,708	2,51	2,28	DIPLOID
VC 2-11	2 VC 4/2	-	0,708	1,88	1,63	DIPLOID
VC 4	2 VC 4/2	-	0,709	4,29	3,72	DIPLOID
VC 1-5	2 VC 4/1	-	0,709	2,14	2,33	DIPLOID
VC 2-2	2 VC 4/2	-	0,709	1,88	2,25	DIPLOID
VC 2-12	2 VC 4/2	-	0,709	2,43	2,67	DIPLOID
VC 1	2 VC 4/2	-	0,710	1,24	1,57	DIPLOID
VC 22	2 VC 4/2	-	0,710	1,37	1,15	DIPLOID
VC 1-4	2 VC 4/1	-	0,710	1,71	2,25	DIPLOID
VC 2-4	2 VC 4/2	-	0,710	3,08	3,35	DIPLOID

VC 2-6	2 VC 4/2	-	0,710	2,10	2,39	DIPLOID
VC 9	2 VC 4/2	-	0,711	2,68	1,98	DIPLOID
VC 13	2 VC 4/1	-	0,711	1,29	1,19	DIPLOID
VC 1-2	2 VC 4/1	-	0,711	1,89	2,09	DIPLOID
VC 12	2 VC 4/1	-	0,712	4,26	3,12	DIPLOID
VC 5	2 VC 4/2	-	0,714	1,53	1,31	DIPLOID
VC 6	2 VC 4/2	-	0,714	1,38	1,27	DIPLOID
VC 8	2 VC 4/2	-	0,714	1,41	1,45	DIPLOID
VC 10	2 VC 4/2	-	0,715	1,34	1,57	DIPLOID
VC 1-1	2 VC 4/1	-	0,715	2,08	2,00	DIPLOID
VC 2	2 VC 4/2	-	0,716	1,24	1,33	DIPLOID
VC 15	2 VC 4/1	-	0,718	1,96	1,4	DIPLOID
VC 11	2 VC 4/2	-	0,719	1,97	2,27	DIPLOID
VC 25	2 VC 4/2	-	0,719	2,46	2,99	DIPLOID
VC 3	2 VC 4/2	-	0,721	3,92	2,26	DIPLOID
VC 18	2 VC 4/2	-	0,721	2,74	2,01	DIPLOID
VC 17	2 VC 4/1	-	0,722	2,13	1,58	DIPLOID
VC 19	2 VC 4/2	-	0,723	2,26	1,67	DIPLOID
VC 23	2 VC 4/2	1,75	1,245	1,57	2,06	TETRAPLOID
VC 26	2 VC 4/2	1,84	1,313	1,80	1,47	TETRAPLOID
VC 7	2 VC 4/2	1,93	1,377	2,08	1,71	TETRAPLOID
VC 21	2 VC 4/2	1,97	1,405	1,74	1,99	TETRAPLOID
VC 1-3	2 VC 4/1	1,97	1,406	2,02	1,86	TETRAPLOID
VC 2-3	2 VC 4/2	2,00	1,423	1,72	1,88	TETRAPLOID
VC 14	2 VC 4/1	2,01	1,429	1,18	1,85	TETRAPLOID
VC 24	2 VC 4/1	-	1,323 a 1,413	1,12 a 1,00	1,91	TETRAPLOID (aneuploidie)
VC 20	2 VC 4/2	-	1,359 a 1,420	1,24 a 0,86	1,65	TETRAPLOID (aneuploidie)
VC 26	2 VC 24/5	2,003	1,422	2,25	3,33	TETRAPLOID
VC 27	2 VC 24/5	2,004	1,423	1,96	3,57	TETRAPLOID
VC 28	2 VC 24/5	1,97	1,398	2,39	3,12	TETRAPLOID

Tabulka 6 - Shrnutí poměrů relativní fluorescence pro přirozené cytotypy druhu *Vicia cracca* (fluorescenční barvivo DAPI, standard *Pisum sativum* cv. Ctirad). Převzato z diplomové práce Mgr. Anežky Eliášové. S.E. – střední chyba průměru.

PLOIDY LEVEL	MEAN NUMBER OF PLANTS IN SAMPLE	RELATIVE FLUORESCENCE (Mean \pm S.E.)	RANGE OF RELATIVE FLUORESCENCE
2x	2,8	0,710 \pm 0,008	0,686 - 0,335
3x	1	1,071 \pm 0,005	1,062 - 1,076
4x	2,9	1,415 \pm 0,017	1,345 - 1,456



Graf 2 - Zobrazení hodnot relativní fluorescence (Tab. 6) u diploida a uměle syntetizovaného neotetraploida druhu *Vicia cracca* (fluorescenční barvivo DAPI, standard *Pisum sativum* cv. Ctirad).

Tabulka 7 - Poměr relativní fluorescence u diploida a uměle syntetizovaného neotetraploida druhu *Vicia cracca* vypočítaný z grafu 2.

NÁZEV VZORKU	POMĚR 4x/2x	POMĚR KE STANDARDU	CV VZORKU	CV STANDARDU	PLOIDIE
D (1) + T (7)	1,93	1,000 x 1,927	1,04	1,26	DIPLOID + TETRAPLOID

5.1.1.3 *Centaurea phrygia*

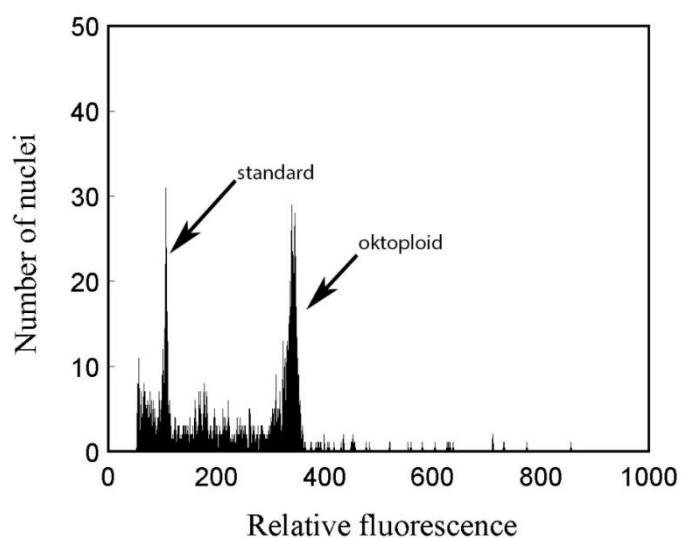
V tabulce 8 jsou vypsány hodnoty relativní fluorescence druhu *Centaurea phrygia*. Průměrná relativní fluorescence u diploidů (nepolyploidizovaní jedinci) byla 0,815. V tomto případě byly využity informace o relativní fluorescenci přirozených diploidů a tetraploidů (tabulka 9) z Koutecký et al. (2012). Pro křížení bylo vybráno 6 neotetraploidních jedinců, jejichž poměr k diploidům byl mezi hodnotami 1,95 - 2,03 (relativní fluorescence = 1,589 - 1,652). Ze semenáčků jedné mateřské rostliny druhu *C. phrygia* se po ošetření kolchicinem podařilo získat tři jedince, z nichž každý měl jinou ploidiu (diploid, tetraploid a oktoploid) a bylo u nich možno pozorovat úplně jiné fenotypy (velikost, tvar a barva listů a rychlost růstu – Obr. 5). Oktoploid je ukázán v grafu 3.

Tabulka 8 - Shrnutí poměrů relativní fluorescence u diploidů a uměle syntetizovaných neotetraploidů druhu *Centaurea phrygia* (fluorescenční barvivo DAPI, standard *Glycine maxima* cv. Polanka). Červenou barvou jsou označeni jedinci, kteří jsou považováni za striktní neotetraploidy.

VZOREK	POPULACE/JEDINEC	POMĚR 4x/2x	POMĚR KE STANDARDU	CV VZORKU	CV STANDARDU	PLOIDIE
CF 10	2 CF 3/2	-	0,794	3,5	2,54	DIPLOID
CF 18	2 CF 6/7	-	0,812	2,14	2,38	DIPLOID
CF 5	2 CF 6/6	-	0,82	3,03	2,68	DIPLOID
CF 3	2 CF 3/7	-	0,821	2,21	1,77	DIPLOID
CF 19	2 CF 6/7	-	0,826	2,22	2,00	DIPLOID
CF 11	2 CF 6/8	1,91	1,558	2,04	2,81	TETRAPLOID
CF 7	2 CF 6/6	1,92	1,562	2,7	2,52	TETRAPLOID
CF 9	2 CF 6/9	1,94	1,582	2,24	3,13	TETRAPLOID
CF 16	2 CF 6/8	1,95	1,589	1,93	2,6	TETRAPLOID
CF 15	2 CF 6/8	1,97	1,602	1,86	2,21	TETRAPLOID
CF 4	2 CF 6/1	1,97	1,609	1,70	2,53	TETRAPLOID
CF 2	2 CF 3/7	2,00	1,626	2,87	4,27	TETRAPLOID
CF 13	2 CF 6/8	2,00	1,628	1,53	1,85	TETRAPLOID
CF 17	2 CF 6/7	2,03	1,652	1,62	2,10	TETRAPLOID
CF 8	2 CF 6/7	-	0,777 a 1,571	3,50 a 2,36	3,27	DIPLOID + TETRAPLOID (endopolyploidie)
CF 12	2 CF 6/8	-	0,817 a 1,632	2,45 a 1,81	2,55	DIPLOID + TETRAPLOID (endopolyploidie)
CF 14	2 CF 6/8	-	0,843 a 1,644	2,97 a 1,96	2,09	DIPLOID + TETRAPLOID (endopolyploidie)
CF 6	2 CF 3/3	-	1,636 a 1,940	1,47 a 1,54	2,88	TETRAPLOID (endopolyploidie)
CF 1	2 CF 3/7	3,95	3,218	1,92	3,63	OKTOPLOID

Tabulka 9 - Shrnutí poměrů relativní fluorescence pro přirozené cytotypy druhu *Centaurea phrygia* (fluorescenční barvivo DAPI, standard *Glycine maxima* cv. Polanka). N - počet vzorků, S.E. - střední chyba průměru. Tabulka převzata z Koutecký et al. (2012).

PLOIDY LEVEL	N	RELATIVE FLUORESCENCE (Mean ± S.E.)	RANGE OF RELATIVE FLUORESCENCE
2x	179	0.805 ± 0.001	0.779 – 0.828
3x	11	1.175 ± 0.005	1.152 – 1.198
4x	292	1.549 ± 0.001	1.474 – 1.585



Graf 3 - Zobrazení hodnot relativní fluorescence standardu a oktoploida druhu *Centaurea phrygia* (fluorescenční barvivo DAPI, standard *Glycine maxima* cv. Polanka).



Obrázek 5 - Diploidní, tetraploidní a oktoploidní jedinec druhu *Centaurea phrygia*.

5.1.1.4 *Pimpinella saxifraga*

V tabulce 10 jsou uvedeny hodnoty relativní fluorescence druhu *Pimpinella saxifraga*. Průměrná relativní fluorescence diploidů (nezpolyloidizovaní jedinci) byla 1,213. Relativní hodnoty fluorescence přirozených diploidů a tetraploidů byly získány

z nepublikovaných dat od Dany Kořínkové (Tabulka 11). Pro křížení byli vybráni 4 neotetraploidní jedinci, jejichž poměr k diploidům byl mezi hodnotami 2,01 – 2,05 (relativní fluorescence = 2,439 – 2,484). Byl detekován jeden oktoploidní jedinec.

Tabulka 10 - Shrnutí poměrů relativní fluorescence u diploidů a neotetraploidů druhu Pimpinella saxifraga (fluorescenční barvivo DAPI, standard Bellis perennis). Červenou barvou jsou označeni jedinci, kteří jsou považováni za striktní neotetraploidy.

VZOREK	POPULACE/JEDINEC	POMĚR 4x/2x	POMĚR KE STANDARDU	CV VZORKU	CV STANDARDU	PLOIDIE
PS 2	2 PS 39/5	-	1,219	2,16	2,19	DIPLOID
PS 4	2 PS 39/5	-	1,224	2,74	3,04	DIPLOID
PS 8	2 PS 42/4	-	1,203	2,65	3,2	DIPLOID
PS 9	2 PS 42/4	-	1,207	2,03	3,2	DIPLOID
PS 1	2 PS 39/5	-	1,214 a 2,435	2,15 a 1,34	2,42	DIPLOID + TETRAPLOID
PS 7	2 PS 42/4	-	1,223 a 2,424	2,81 a 2,51	3,74	DIPLOID + TETRAPLOID
PS 3	2 PS 39/5	2,04	2,473	1,12	2,88	TETRAPLOID
PS 5	2 PS 39/5	2,03	2,467	2,42	2,7	TETRAPLOID
PS 6	2 PS 42/4	2,01	2,439	1,57	3,02	TETRAPLOID
PS 10	2 PS 62/1	2,05	2,484	2,22	4,28	TETRAPLOID
PS 12	2 PS 62/4	2,08	2,522	1,98	4,51	TETRAPLOID
PS 11	2 PS 40/1	3,92	4,751	1,71	4,01	OKTOPLOID

Tabulka 11 - Shrnutí poměrů relativní fluorescence pro přirozené cytotypy druhu Pimpinella saxifraga (fluorescenční barvivo DAPI, standard Bellis perennis). N - počet vzorků, S.E. - střední chyba průměru. Nepublikovaná data Dany Kořínkové.

PLOIDY LEVEL	N	RELATIVE FLUORESCENCE (Mean ± S.E.)	RANGE OF RELATIVE FLUORESCENCE
2x	20	1,254 ± 0,014	1,228 – 1,270
4x	20	2,429 ± 0,043	2,349 – 2,509

5.1.2 Ověření ploidy u 2. generace neotetraploidů

Po změření na průtokovém cytometru se všechny rostliny druhu *Vicia cracca* (27 jedinců) jeví jako tetraploidní (Tab. 12). U šesti jedinců, kteří jsou v Tab. 12 označeni

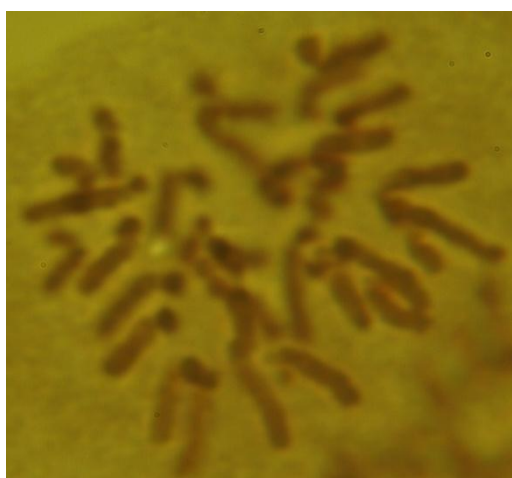
červeně, byly počítány chromosomy. Pět z nich nemělo standardní počet chromosomů, který by odpovídal tetraploidům tj. 28, ale měli o 1 – 2 chromosomy více nebo méně (Tab. 13). Jednalo se tedy o aneuploidní jedince, kteří však byli na první pohled k nerozeznání od rostlin s chromosomovým číslem 28. Přirozený diploid měl chromosomů 14 (relativní fluorescence = 0,709) na Obr. 9 a přirozený tetraploid 28 (relativní fluorescence = 1,433) na Obr. 8. Neotetraploidní rodič měl také 28 chromosomů (relativní fluorescence = 1,429). Na obrázku 6 je ukázka hyperploidního a na obrázku 7 hypoploidního jedince.

Tabulka 12 - Hodnoty relativní fluorescence naměřené na průtokovém cytometru u 2. generace neotetraploidních rostlin (fluorescenční barvivo DAPI a standard Pisum sativum). Červeně jsou označeny rostliny, u kterých byly počítány chromosomy.

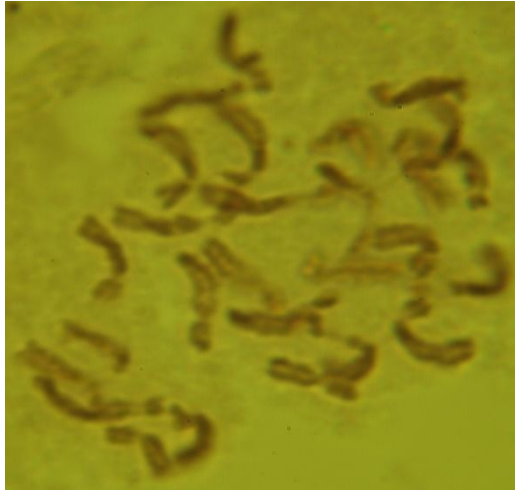
ČÍSLO ROSTLINY	POMĚR KE STANDARDU	CV STANDARDU	CV VZORKU
1	1,381	3,06	2,17
3	1,428	2,03	1,77
4	1,467	2,16	1,60
5	1,422	2,16	2,23
6	1,369	2,57	2,51
7	1,384	2,24	2,07
8	1,431	1,54	1,25
9	1,427	1,98	1,48
11	1,36	1,95	1,68
12	1,42	2,09	1,62
13	1,425	1,65	1,57
14	1,417	1,68	1,68
15	1,431	2,03	1,63
16	1,443	2,25	1,90
17	1,485	1,52	1,4
18	1,365	1,89	1,78
19	1,428	1,84	1,56
20	1,516	1,82	1,54
21	1,413	2,44	2,20
22	1,424	1,37	1,25
23	1,385	2,11	1,61
24	1,422	2,13	1,81
25	1,371	1,7	1,59
26	1,369	1,89	1,74
27	1,465	2,45	2,41
30	1,436	2,53	2,23
31	1,403	2,47	1,89

Tabulka 13 - Hodnoty relativní fluorescence naměřené na průtokovém cytometru a výsledný počet chromosomů u jednotlivých rostlin.

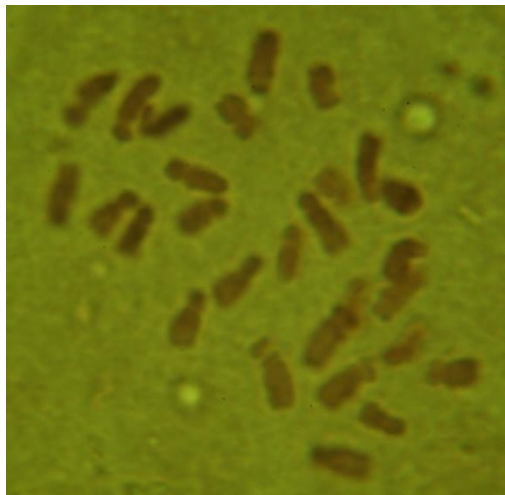
ČÍSLO ROSTLINY	HODNOTA RELATIVNÍ FLUORESCENCE	POČET CHROMOSOMŮ
11	1,360	27
23	1,385	26
5	1,422	28
27	1,465	29
17	1,485	29
20	1,516	30



Obrázek 6 - Jedinec č. 20, 30 chromosomů (anafáze, zvětšení 1000x).



Obrázek 7 - Jedinec č. 11, 27 chromosomů (metafáze, zvětšení 1000x).



Obrázek 8 - Přirozený tetraploid, 28 chromosomů (metafáze, zvětšení 1000x).

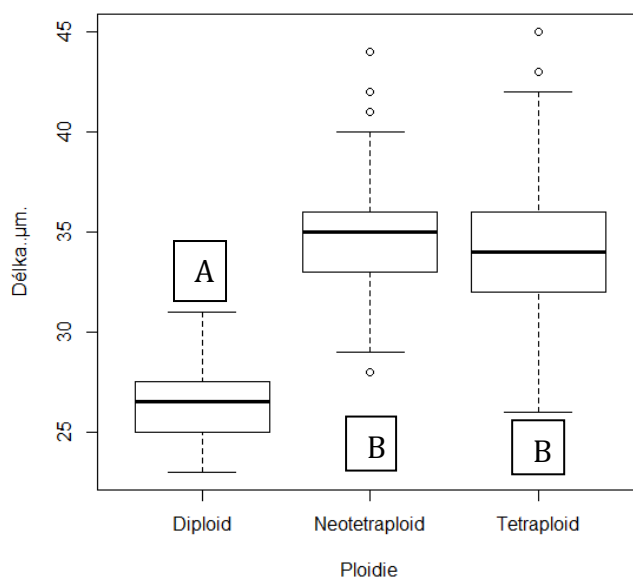


Obrázek 9 - Přirozený diploid, 14 chromosomů (metafáze, zvětšení 1000x).

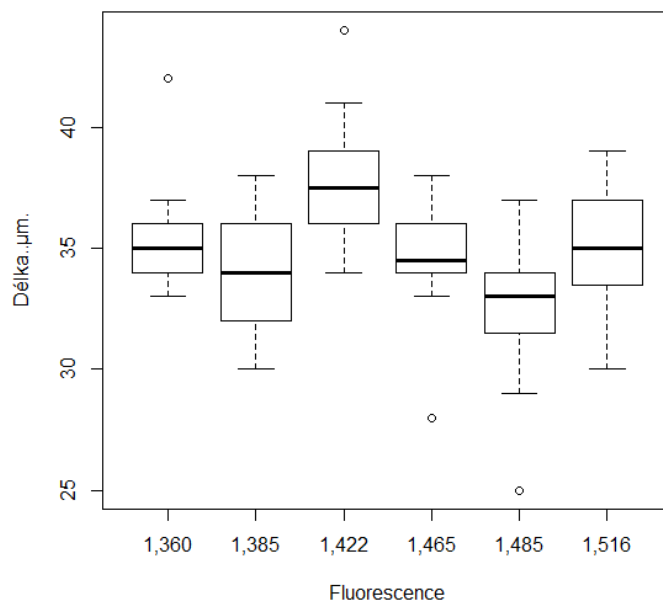
5.1.3 Srovnání fenotypu přirozených diploidů, tetraploidů a neotetraploidů

5.1.3.1 Měření velikosti průduchů

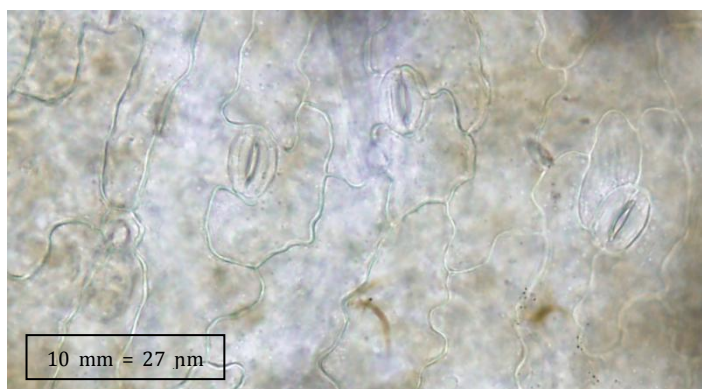
S počtem chromosomů souvisí také velikost průduchů. Rozdíl ve velikosti průduchů byl průkazný mezi diploidy a tetraploidy (p -value $< 0,001$) a mezi diploidy a neotetraploidy (p -value $< 0,001$), jak je patrné z grafu 4. Tetraploidi a neotetraploidi se vzájemně nelišili (p -value = 0,385). Průměrná délka průduchů u diploidů byla $26,26 \pm 1,78 \mu\text{m}$, u tetraploidů $34,52 \pm 3,96 \mu\text{m}$ a u neotetraploidů $34,92 \pm 2,77 \mu\text{m}$. Přirození tetraploidi měli průduchy 1,3x delší než diploidi (Obr. 10 a 11). V rámci neotetraploidů se průkazně lišili rostliny s různou hodnotou relativní fluorescence (6 rostlin, u kterých byly počítány chromosomy) naměřené na průtokovém cytometru (p -value $< 0,001$), jak je vidět na grafu 5. Jednalo se však pouze o rozdíly mezi jednotlivými jedinci, neboť lineární vztah mezi velikostí průduchů a hodnotou relativní fluorescence nalezen nebyl.



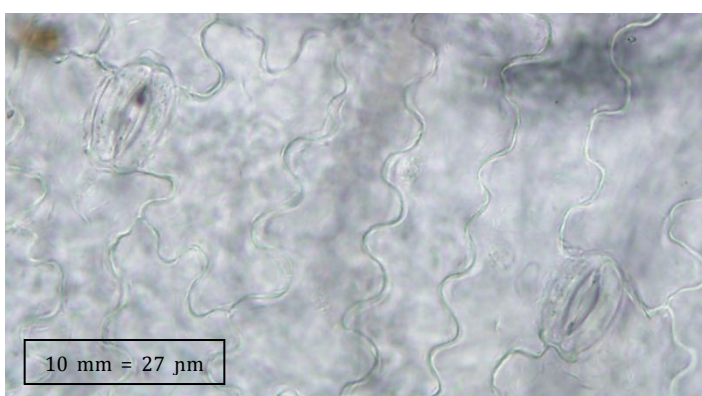
Graf 4 - Rozdíl v délce průduchů u diploidů, tetraploidů a neotetraploidů. Odlišnými písmeny jsou označeny skupiny, u kterých byl rozdíl průkazný (p -value $< 0,001$).



Graf 5 - Rozdíl v délce průduchů u aneuploidních jedinců vztažený k jejich hodnotám relativní fluorescence naměřených na průtokovém cytometru (p -value < 0,001).



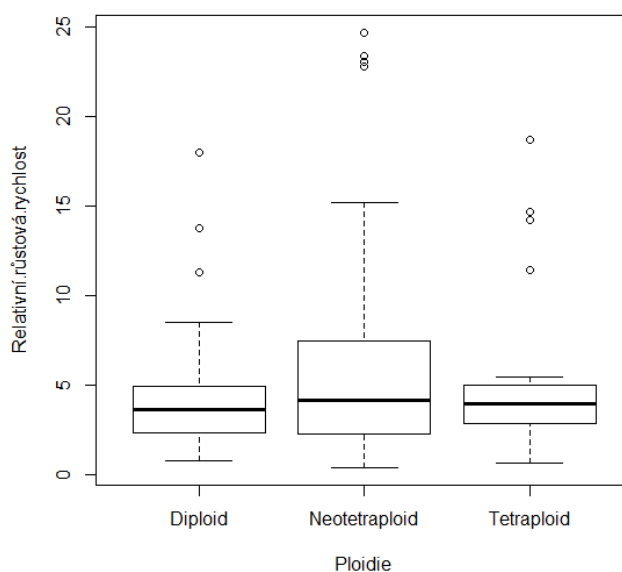
Obrázek 10 - Ukázka velikosti průduchů u diploidního jedince (zvětšení 200x).



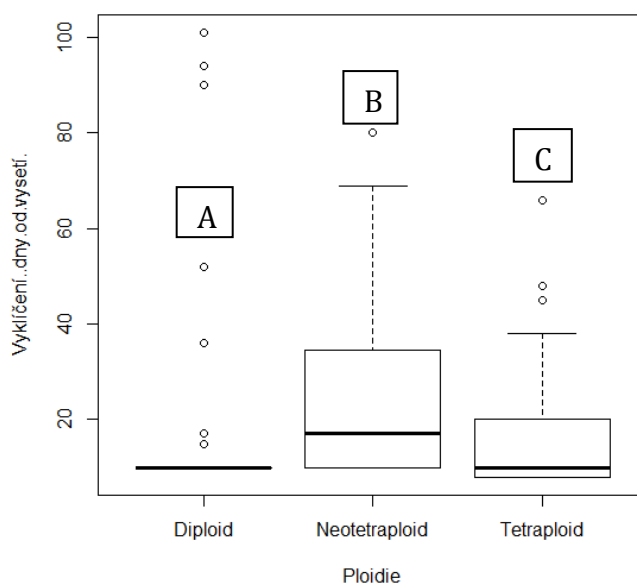
Obrázek 11 - Ukázka velikosti průduchů u tetraploidního jedince (zvětšení 200x).

5.1.3.2 Rychlost klíčení a relativní růstová rychlost

U diploidů, tetraploidů a 2. generace neopolyploidů byla porovnávána relativní růstová rychlost rostlin (RGR) a rychlost klíčení semen. V relativní růstové rychlosti se zkoumané skupiny průkazně nelišily (p -value = 0,233). Výsledky RGR jsou znázorněny v grafu 6. Naopak v rychlosti klíčení semen se od sebe průkazně lišily všechny tři skupiny (p -value < 0,001). Nejrychleji klíčily diploidi a nejpomaleji neotetraploidi. Výsledky jsou znázorněny v grafu 7.



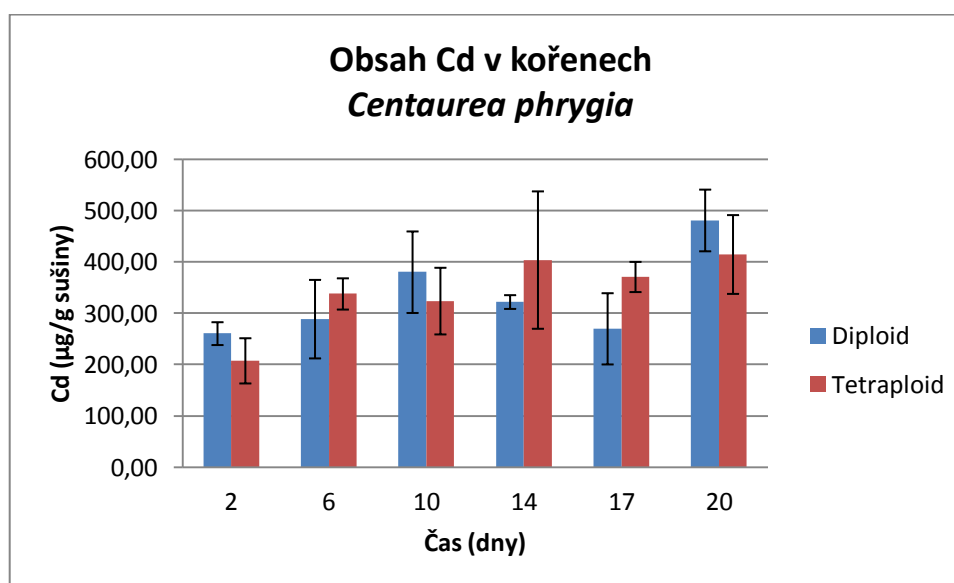
Graf 6 - Relativní růstová rychlost u diploidů, tetraploidů a neotetraploidů. Výsledné hodnoty RGR se u jednotlivých skupin průkazně nelišily.



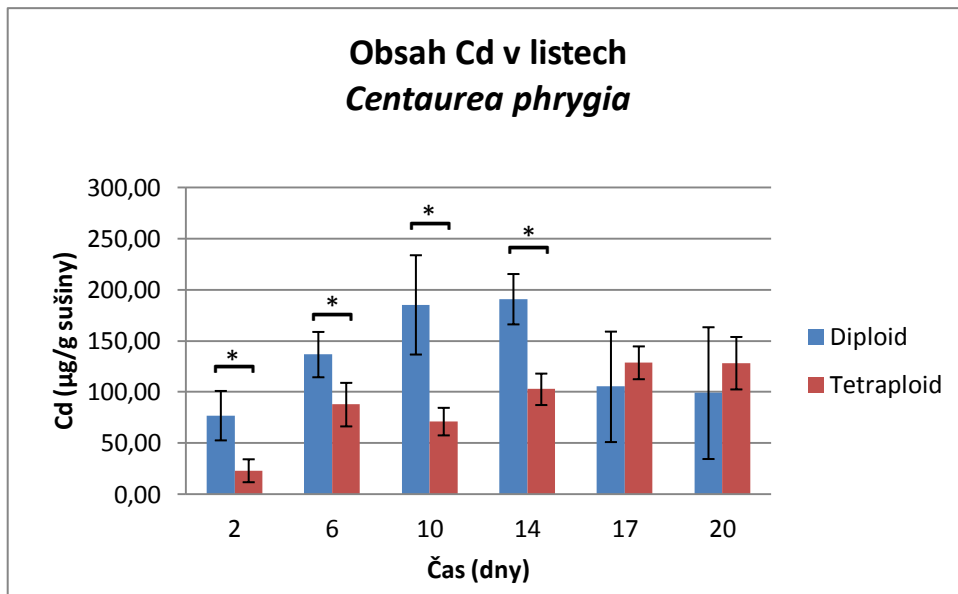
Graf 7 - Znázornění rychlosti klíčení semen u jednotlivých skupin. Skupiny, které se od sebe průkazně lišily, jsou označeny jiným písmenem.

5.2 Akumulace kadmia u diploidních a tetraploidních rostlin

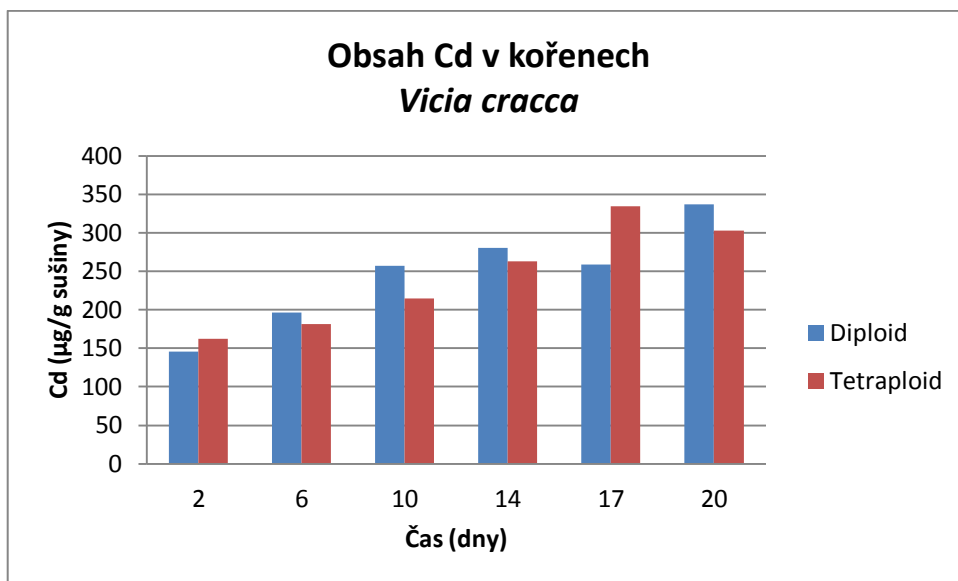
Kadmium bylo, dle předpokladu, rostlinami aktivně přijímáno. Byl zde výrazný rozdíl v jeho koncentraci v kořenech a listech (p -value < 0,001). Kořeny obsahovaly přibližně 2x více Cd než listy. Rozdíl byl také mezi oběma druhy (p -value < 0,001). Rostliny druhu *Centaurea phrygia* byly schopny přijmout cca dvakrát více Cd než jedinci druhu *Vicia cracca*. U obou druhů byla prokázána postupná akumulace Cd v čase (p -value < 0,001). Rozdíl mezi ploidiemi byl průkazný pouze u listů druhu *Centaurea phrygia* v odběrech po 2, 6, 10 a 14 dnech. Ani u jednoho druhu nebylo pozorováno žádné poškození v důsledku působení Cd jako např. chloróza nebo změna struktury kořenů. Během pěstování byl zaznamenán rozdíl v růstu u tetraploidních rostlin druhu *Centaurea phrygia*, kdy tetraploidi tvořili oproti diploidům velké množství odnoží. Naměřené hodnoty v kořenech a v listech u druhu *Centaurea phrygia* jsou zobrazeny v grafu 8 a 9, u druhu *Vicia cracca* v grafu 10 (u kořenů není uvedena směrodatná odchylka, protože byla naměřena u každé ploidiie jen jedna hodnota) a 11. Celkové statistické vyhodnocení vlivu jednotlivých faktorů na akumulaci kadmia v rostlinách je uvedeno v tabulce 14.



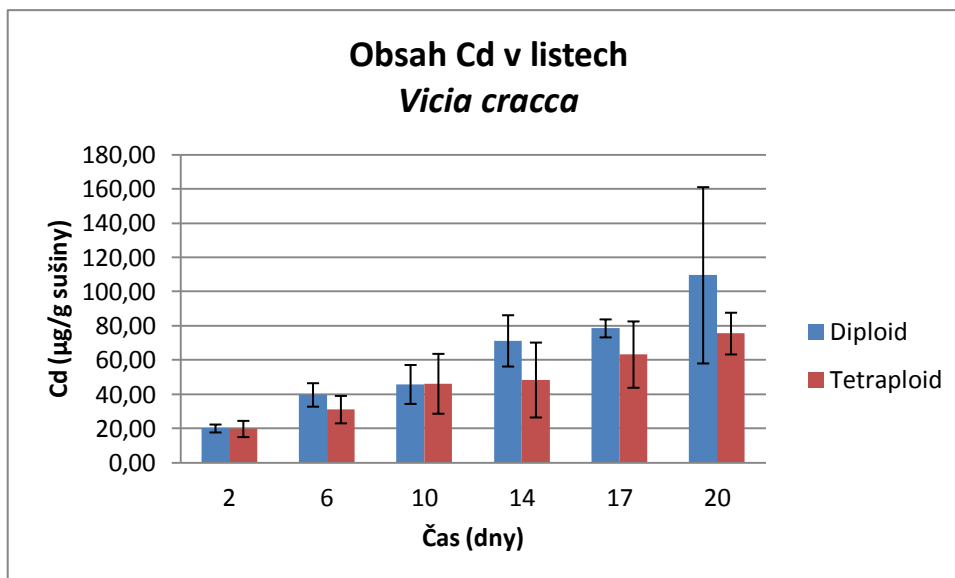
Graf 8 - Rozdíl v akumulaci kadmia mezi diploidy a tetraploidy v kořenech u druhu *Centaurea phrygia*. V případě, že rozdíl mezi diploidy a tetraploidy vyšly průkazně, tak jsou sloupčky označeny hvězdičkou. Uvedeny jsou průměry ± směrodatné odchylky.



Graf 9 - Rozdíl v akumulaci kadmia mezi diploidy a tetraploidy v listech u druhu *Centaurea phrygia*. V případě, že rozdíly mezi diploidy a tetraploidy vyšly průkazně, tak jsou sloupce označeny hvězdičkou. Uvedeny jsou průměry \pm směrodatné odchylky.



Graf 10 - Rozdíl v akumulaci kadmia u diploidů a tetraploidů v kořenech u druhu *Vicia cracca*.



Graf 11 - Rozdíl v akumulaci kadmia u diploidů a tetraploidů v listech u druhu *Vicia cracca*. V případě, že rozdíly mezi diploidy a tetraploidy vyšly průkazně, tak jsou sloupčky označeny hvězdičkou. Uvedeny jsou průměry ± směrodatné odchylky.

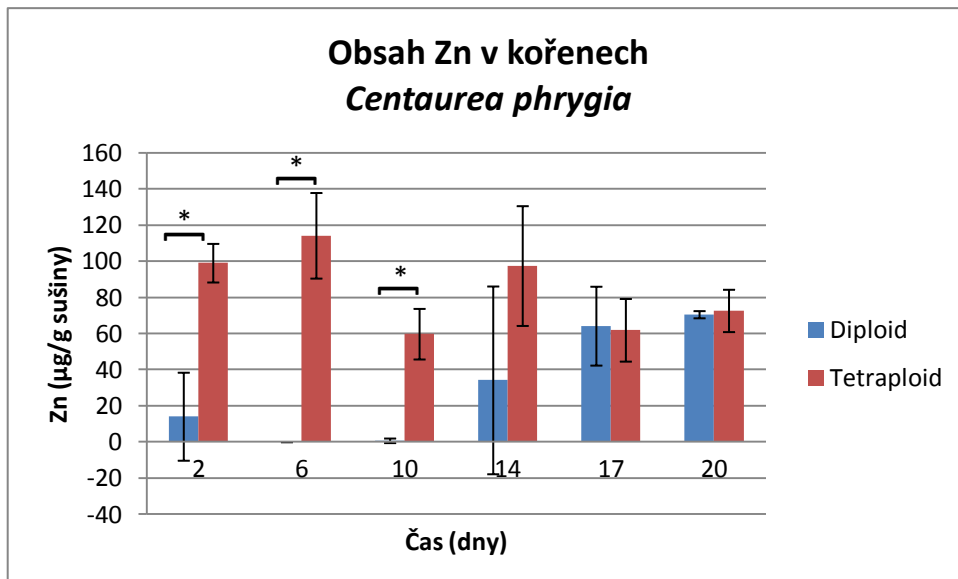
Tabulka 14 - Celkové shrnutí vlivu jednotlivých faktorů na akumulaci kadmia u pokusných rostlin. Hodnoty, které vyšly průkazně, jsou označeny červenou barvou. Df error = 66.

	Df	F value	p-value
Čas působení (dny)	5	16,884	< 0,001
Ploidie	1	2,815	0,098
Vzorek (kořeny x listy)	1	751,230	< 0,001
Druh	1	67,639	< 0,001
Čas působení : Ploidie	5	2,728	0,027
Čas působení : Vzorek	5	3,857	0,004
Ploidie : Vzorek	1	5,531	0,022
Čas působení : Druh	5	1,414	0,231
Ploidie : Druh	1	0,982	0,325
Vzorek : Druh	1	3,603	0,062
Čas působení : Ploidie : Vzorek	5	2,340	0,051
Čas působení : Ploidie : Druh	5	1,194	0,322
Čas působení : Vzorek : Druh	5	0,928	0,469
Ploidie : Vzorek : Druh	1	1,598	0,211
Čas působení : Ploidie : Vzorek : Druh	5	1,168	0,334

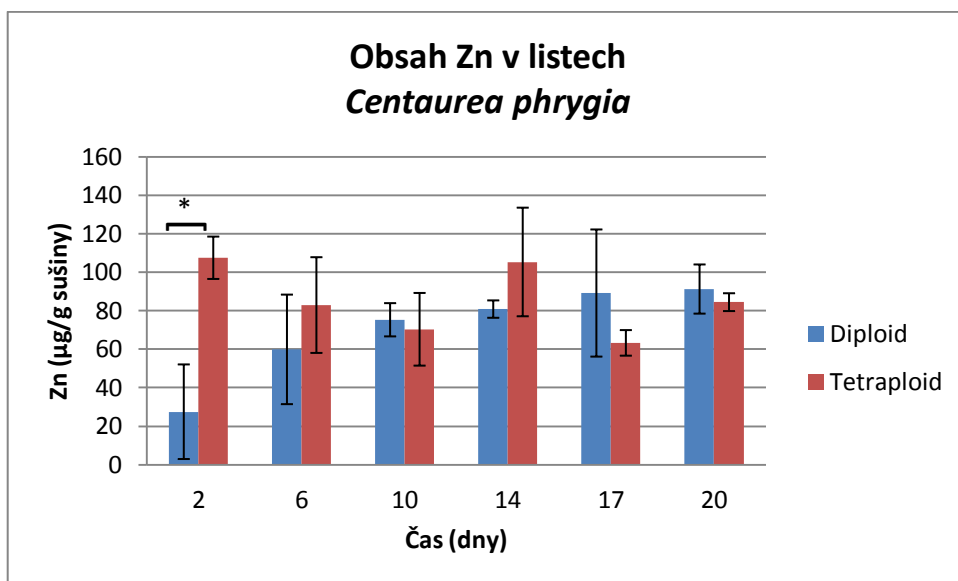
5.2.1 Interakce mezi akumulací kadmia a zinku u diploidních a tetraploidních rostlin

Zinek byl rostlinami z média aktivně přijímán, podobně jako kadmium. U rostlin byla prokázána závislost mezi příjmem zinku a kadmia (p-value = 0,003), která byla ovlivněna dobou působení kadmia (p-value = 0,004) a druhem rostlin (p-value = 0,01). Druh *Vicia cracca* obsahoval menší množství zinku než *Centaurea phrygia*. Na sloupcových grafech je znázorněn obsah zinku zvláště v kořenech a listech diploidů a tetraploidů u obou druhů v závislosti na době působení kadmia. U druhu *Centaurea phrygia* byl zaznamenán na ploidii závislý rozdíl v příjmu zinku (p-value < 0,001) a to jak v kořenech (graf 12), tak v listech (graf 13), kdy více zinku obsahovali tetraploidi. U druhu *Vicia cracca* se vliv ploidie na příjem zinku v čase neprokázal (graf 15 a graf 16). U kořenů v grafu 15 opět není zobrazena směrodatná odchylka z důvodu pouze jednoho naměřeného údaje.

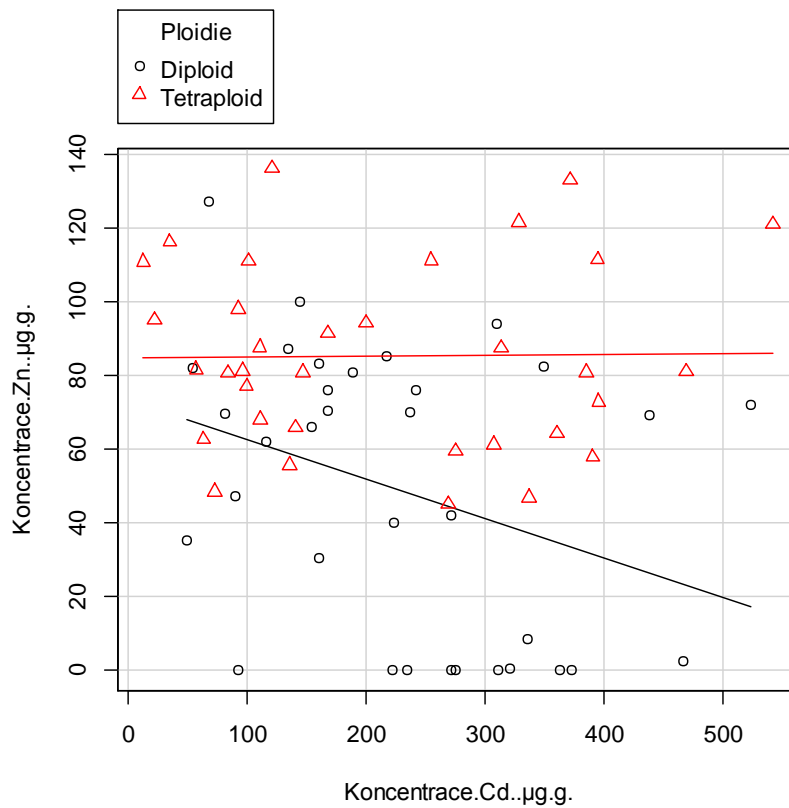
Na bodových grafech je pak vynesena koncentrace zinku v závislosti na koncentraci kadmia u obou druhů zvláště (vyhodnoceno v rámci celých rostlin tj. jsou smíchané kořeny a listy). U diploidů druhu *Centaurea phrygia* (graf 14) bylo prokázáno, že se zvyšující se koncentrací kadmia klesala koncentrace zinku v rostlinách (p-value = 0,05). U tetraploidů však tato závislost prokázána nebyla. Odlišný výsledek vyšel u druhu *Vicia cracca* (graf 17), kde byla závislost prokázána jak u diploidů (p-value = 0,043), tak u tetraploidů (p-value < 0,001), ale v obou případech však se vzrůstající koncentrací kadmia rostla i koncentrace zinku v rostlinách. V celkovém testu se průkazně neprojevil rozdíl mezi kořeny a listy na rozdíl od kadmia. Celkové statistické vyhodnocení vlivu jednotlivých faktorů na akumulaci zinku v rostlinách je uvedeno v tabulce 15.



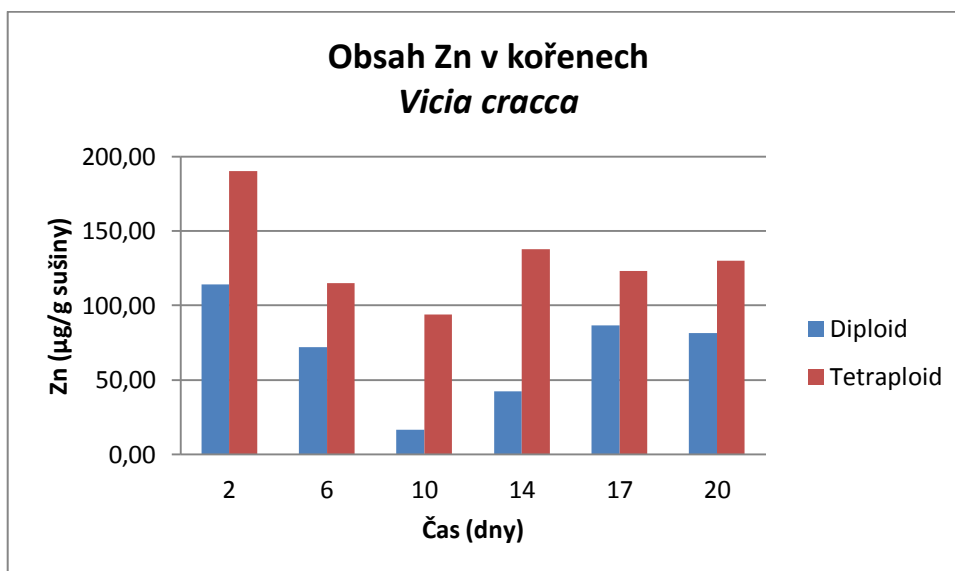
Graf 12 - Rozdíl v akumulaci zinku mezi diploidy a tetraploidy v kořenech u druhu *Centaurea phrygia*. V případě, že rozdíly mezi diploidy a tetraploidy vyšly průkazně, tak jsou sloupečky označeny hvězdičkou. Uvedeny jsou průměry \pm směrodatné odchylky.



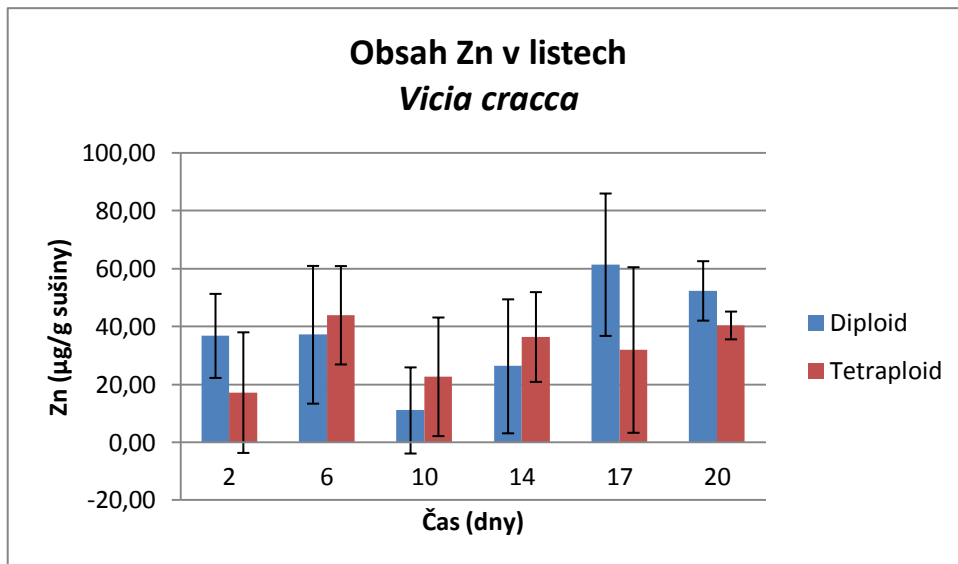
Graf 13 - Rozdíl v akumulaci zinku mezi diploidy a tetraploidy v listech u druhu *Centaurea phrygia*. V případě, že rozdíly mezi diploidy a tetraploidy vyšly průkazně, tak jsou sloupečky označeny hvězdičkou. Uvedeny jsou průměry \pm směrodatné odchylky.



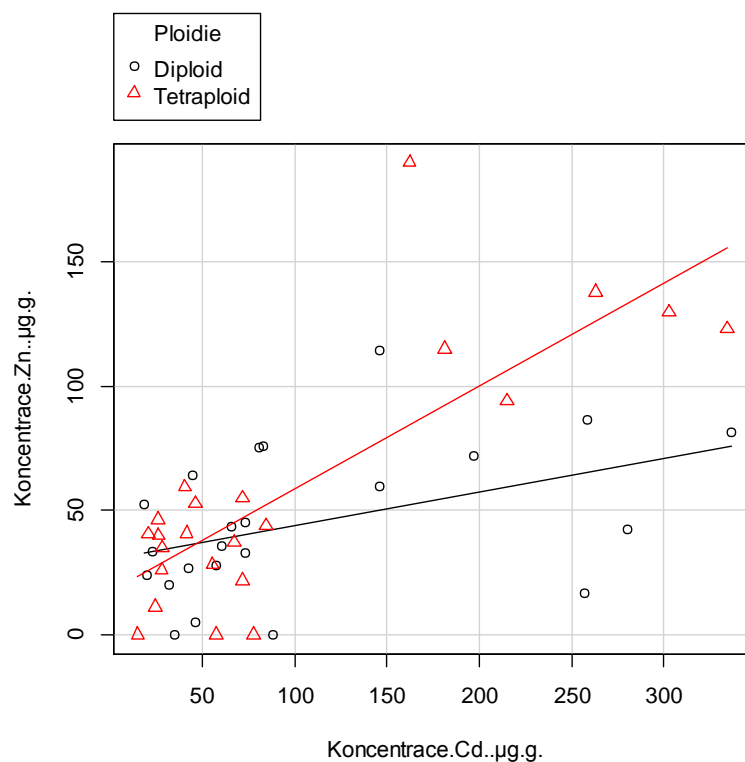
Graf 14 - Změna množství zinku u diploidů a tetraploidů v závislosti na stoupající koncentraci kadmia v rostlinách u druhu *Centaurea phrygia*. Průkazně vyšla pouze u diploidů (p -value = 0,05).



Graf 15 - Rozdíl v akumulaci zinku mezi diploidy a tetraploidy v kořenech u druhu *Vicia cracca*.



Graf 16 - Rozdíl v akumulaci zinku mezi diploidy a tetraploidy v listech u druhu *Vicia cracca*. V případě, že rozdíly mezi diploidy a tetraploidy vyšly průkazně, tak jsou sloupčky označeny hvězdičkou. Uvedeny jsou průměry \pm směrodatné odchylky.



Graf 17 - Změna množství zinku u diploidů a tetraploidů v závislosti na stoupající koncentraci kadmia v rostlinách u druhu *Vicia cracca*. Průkazně vyšla jak u diploidů (p -value = 0,043), tak i u tetraploidů (p -value < 0,001).

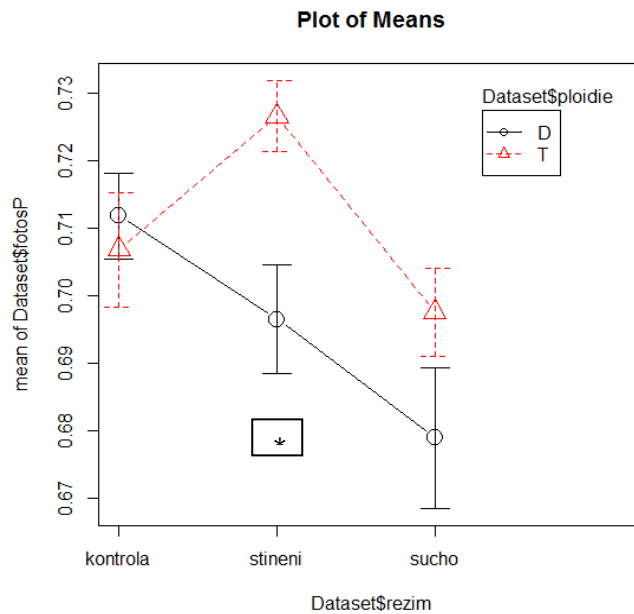
Tabulka 15 - Celkové shrnutí vlivu jednotlivých faktorů na akumulaci zinku u pokusných rostlin. Hodnoty, které vyšly průkazně, jsou označeny červenou barvou. $Df_{error} = 30$.

	Df	F value	p-value
Koncentrace Cd ($\mu\text{g/g}$ sušiny)	1	10,790	0,003
Čas působení (dny)	5	4,347	0,004
Druh	1	7,473	0,01
Ploidie	1	45,027	< 0,001
Vzorek (kořeny x listy)	1	0,826	0,37
Koncentrace Cd : čas působení	5	0,643	0,669
Koncentrace Cd : druh	1	64,335	< 0,001
Čas působení : druh	5	5,001	0,002
Koncentrace Cd : Ploidie	1	20,80	< 0,001
Čas působení : Ploidie	5	9,940	< 0,001
Druh : Ploidie	1	0,099	0,755
Koncentrace Cd : čas působení : druh	5	0,318	0,898
Koncentrace Cd : čas působení : ploidie	5	1,367	0,265
Koncentrace Cd : druh : ploidie	1	7,297	0,011
Čas působení : druh : ploidie	5	1,616	0,186
Koncentrace Cd : čas působení : vzorek	5	0,882	0,505
Koncentrace Cd : druh : vzorek	1	0,922	0,345
Čas působení : druh : vzorek	5	1,022	0,422
Koncentrace Cd : ploidie : vzorek	1	0,002	0,961
Čas působení : ploidie : vzorek	5	1,870	0,129
Druh : ploidie : vzorek	1	2,152	0,153
Koncentrace Cd : čas působení : druh : ploidie	5	0,577	0,717
Koncentrace Cd : čas působení : druh : vzorek	4	0,560	0,694
Koncentrace Cd : čas působení : ploidie : vzorek	5	0,518	0,761

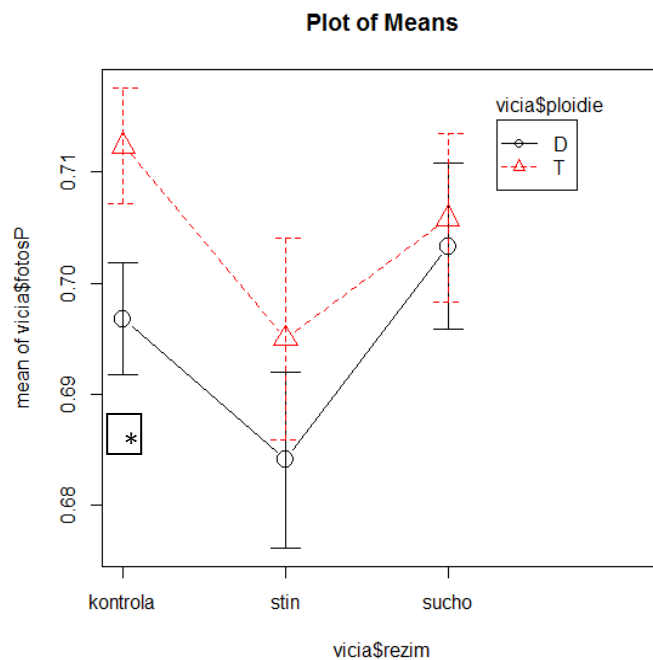
5.3 Reakce diploidů a tetraploidů na stres suchem a zastíněním

U pokusných rostlin byl měřen parametr Q_y , tj. hodnota efektivního kvantového výtěžku fotochemické přeměny energie ve fotosystému II (v grafech na ose Y). To znamená, že čím nižší hodnota byla u rostlin naměřena, tím více byly poškozeny stresem. V reakci na podmínky, ve kterých byly rostliny pěstované, se průkazně projevil vliv konkrétního druhu (p-value < 0,001), stresového režimu (p-value < 0,001) i ploidie (p-value = 0,015). Tyto výsledky jsou graficky znázorněny v grafu 18 a statisticky vyhodnoceny v tabulce 16. Z tohoto celkového grafu je vidět, že tetraploidi se vyrovnávali se stresem lépe než diploidi (průkazné však pouze v případě stínění). Dále je vidět, že diploidním rostlinám obecně více vadilo sucho než zastínění. Také tetraploidi byli více citliví na sucho než stín, ale je zajímavé, že zastíněné rostliny prospívaly lépe než ty kontrolní (tento rozdíl je dům především výsledkem, který byl naměřen u druhu *Centaurea phrygia*).

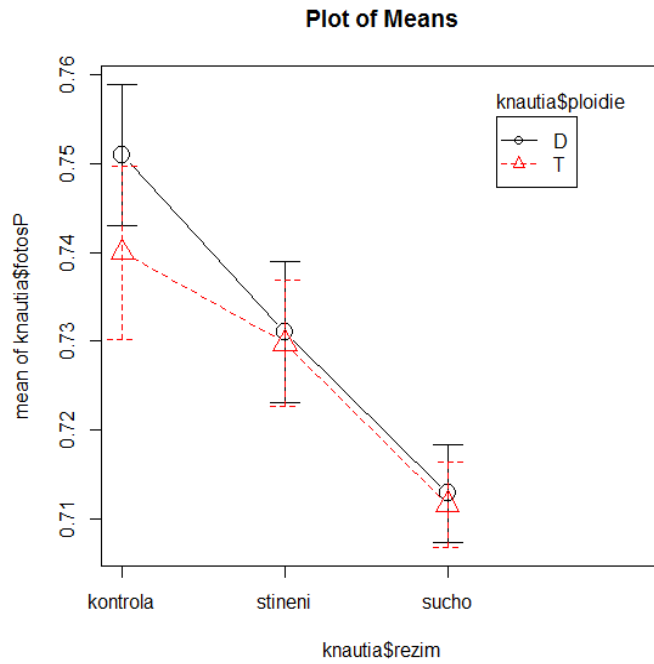
Pokud vezmeme v úvahu výsledky u jednotlivých druhů, tak se objevily určité odlišnosti. U druhu *Vicia cracca* byl vliv stresového režimu okrajově průkazný (p-value = 0,059), vliv ploidie byl prokázán (p-value = 0,042), pouze však u kontrolních rostlin (graf 19). U druhu *Knautia arvensis* se projevil průkazně vliv režimu (p-value < 0,001), nicméně vliv ploidie nebyl statisticky významný (p-value = 0,495). V tomto případě se nejlépe dařilo kontrolním rostlinám a nejhůře jedincům stresovaným suchem (graf 20). U druhu *Centaurea phrygia* byl prokázán jak vliv režimu (p-value = 0,015), tak vliv ploidie (p-value = 0,003). U tohoto druhu se diploidním rostlinám dařilo ve stresových režimech výrazně hůře než tetraploidním a u tetraploidů, kteří byli stíněni probíhala fotosyntéza ještě výrazně efektivněji než u kontrolních rostlin (graf 21).



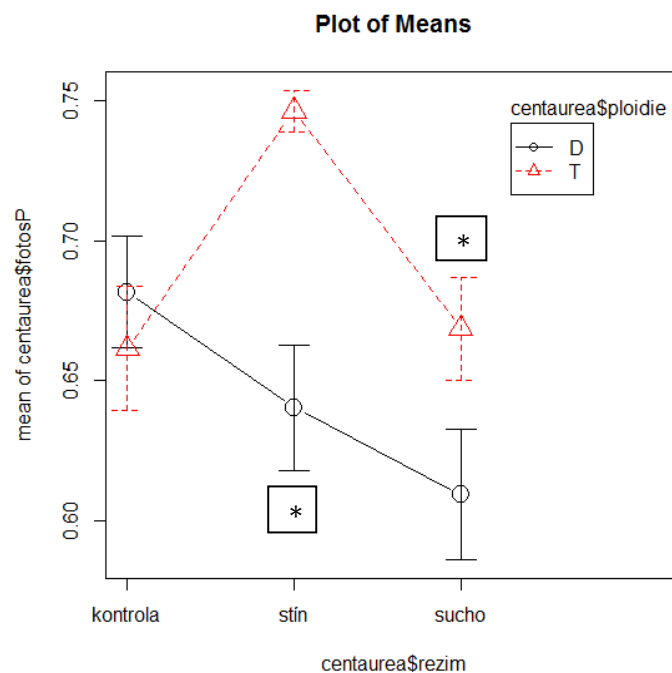
Graf 18 - Reakce diploidů a tetraploidů na stres suchem a zastíněním bez ohledu na druh rostliny. Na ose Y je vynesena naměřená hodnota parametru Q_y . V případě, že rozdíly mezi diploidy a tetraploidy v daném režimu vyšly průkazně, je tento režim označen hvězdičkou. Celkové statistické vyhodnocení jednotlivých faktorů v tomto grafu je shrnuto v tabulce 16.



Graf 19 - Reakce diploidů a tetraploidů na stres suchem a zastíněním u druhu *Vicia cracca*. Na ose Y je vynesena naměřená hodnota parametru Q_y . V tomto případě byl prokázán pouze vliv ploidie (p -value = 0,04), ale ne režimu. Interakce ploidie : režim byla v tomto případě neprůkazná. V případě, že rozdíly mezi diploidy a tetraploidy v daném režimu vyšly průkazně, je tento režim označen hvězdičkou.



Graf 20 - Reakce diploidů a tetraploidů na stres suchem a zastíněním u druhu *Knautia arvensis*. Na ose Y je vynesena naměřená hodnota parametru Q_y . Byl prokázán pouze vliv režimu (p -value < 0,001), ale nikoliv vliv ploidie. Interakce ploidie : režim byla neprůkazná. V případě, že rozdíly mezi diploidy a tetraploidy v daném režimu vyšly průkazně, je tento režim označen hvězdičkou.



Graf 21 - Reakce diploidů a tetraploidů na stres suchem a zastíněním u druhu *Centaurea phrygia*. Na ose Y je vynesena naměřená hodnota parametru Q_y . Byl prokázán vliv ploidie (p -value = 0,003) i režimu (p -value = 0,015). Zde byla interakce ploidie : režim průkazná (p -value = 0,006). V případě, že rozdíly mezi diploidy a tetraploidy v daném režimu vyšly průkazně, je tento režim označen hvězdičkou.

Tabulka 16 - Celkové shrnutí vlivu jednotlivých faktorů na funkčnost fotosystému II u pokusných rostlin. Hodnoty, které vyšly průkazně, jsou označeny červenou barvou. $Df_{error} = 279$.

	Df	F value	p-value
Ploidie	1	5,949	0,015
Režim	2	8,002	< 0,001
Druh	2	44,442	< 0,001
Ploidie : režim	2	3,987	0,020
Ploidie : druh	2	9,185	< 0,001
Režim : druh	4	4,784	< 0,001
Ploidie : režim : druh	4	5,048	< 0,001

6 Diskuze

6.1 Neopolyploidní rostliny

6.1.1 *Vicia cracca*

6.1.1.1 *Somatická polyploidizace kolchicinem*

Druh *Vicia cracca* lze označit jako vhodný pro syntézu neotetraploidů kolchicinem. Semena mají vysokou klíčivost a se semenáčky, které jsou staré necelé dva týdny, se dobře manipuluje při přesazování do sadbovače. Nízký výsledný počet neotetraploidů může být způsoben tím, že semenáčky vikve jsou poměrně velké a musí zpolyploidizovat velké množství buněk. Z toho důvodu je *Vicia cracca* náchylnější ke vzniku ploidních chimér, kdy dojde k duplikaci chromozomů jen u některých pletiv, anebo v některých případech k ní nedojde vůbec. Nejlepší výsledky měl treatment s koncentrací kolchicinu 0,2 % a dobou působení 15 hodin. Při kratší době působení (12 hodin) byl získán jen malý počet neotetraploidů a naopak při delší době působení (18 hodin) byla úmrtnost semenáčků příliš vysoká, i když s velmi dobrou úspěšností polyploidizace.

Poměry hodnot relativní fluorescence neotetraploidů byly porovnány s hodnotami, které zjistila Mgr. A. Eliášová u přirozených diploidů a tetraploidů. Důvodem bylo ověření reálnosti výsledků, které byly naměřeny u syntetizovaných tetraploidů (Husband and Schemske 2000). U neotetraploidů, kteří neměli poměr velikosti DNA indexu k diploidům 2,00 nebo $\pm 0,05$ byli z dalších pokusů vyřazeni, protože zde bylo vysoké riziko, že somatická polyploidizace neproběhla úspěšně. Baldwin and Husband (2011) identifikovali kolchicinem indukované neotetraploidy u druhu *Chamerion angustifolium* pouze na základě porovnání jejich hodnot relativní fluorescence s přirozenými tetraploidy a pokud spadali do mezních hodnot, tak byli považováni za striktní neotetraploidy. Tento postup byl však vyhodnocen jako nevhodný pro druhy v této práci, o nichž nebyly k dispozici žádné informace ohledně jejich reakce na kolchicin. Aneuploidní jedince nebylo možné identifikovat ani na základě odchylky fenotypu od euploidních rostlin (Roux et al. 2002), protože u rostlin nebyly patrné žádné morfologické rozdíly tj. ani u rostlin, kde byla aneuploidie průkazně detekována na průtokovém cytometru.

6.1.1.2 2. generace neopolyploidních rostlin

Jako striktně neotetraploidní bylo určeno celkem 7 jedinců. Tyto rostliny měly být následně využity pro vzájemné zkřížení za účelem získání 2. generace neotetraploidů. Druh *Vicia cracca* je vytrvalá bylina, která kvete obvykle až druhým rokem a první rok přezimování ve skleníku nepřežilo pět rostlin. Z toho důvodu byly nakonec zkříženy pouze dvě mateřské rostliny, ze kterých bylo získáno 31 semen. Ta byla vyseta společně se stejným počtem přirozených diploidů a neotetraploidů. U neotetraploidů druhé generace byla ve věku čtyř týdnů znovu ověřována ploidie na průtokovém cytometru. Podle výsledků se všechny rostliny jevily sice jako tetraploidní, ale byly u nich naměřeny poměrně velké rozdíly v hodnotách relativní fluorescence. Roux et al. (2002) publikovali, že hodnoty relativní fluorescence poměrně dobře korespondují s počtem chromosomů. Navíc je u nově vzniklých neopolyploidů obecně znám problém, že během meiózy dochází k nepřesnému párování chromosomů. Následkem toho pak mohou vznikat gamety s nesprávným počtem chromosomů (Srivastava and Srivastava 2002), ale i z těchto gamet však může vzniknout životaschopné potomstvo (Ellström and Sjödin 1966). Průtoková cytometrie je vhodnou technikou pro určení ploidie, ale je poměrně obtížné takto detekovat aneuploidní rostliny (Roux et al. 2002). Z toho důvodu byly u šesti vybraných rostlin, které dobře reprezentovaly odlišné hodnoty relativní fluorescence, počítány chromosomy. Pouze u jedné rostliny byl nalezen správný počet chromosomů, který odpovídal tetraploidnímu jedinci tj. 28. Ostatní jedinci byli klasifikováni jako aneuploidní, dva z nich byli hypoploidní (s počtem 26 a 27 chromosomů) a tři hyperploidní (s počtem 29 a 30 chromosomů). Korelace počtu chromosomů s hodnotou relativní fluorescence nebyla úplně přesná (jedinec s hodnotou fluorescence 1,385 měl 26 chromosomů a jedinec s hodnotou 1,360 měl 27 chromosomů). Důvodem byla pravděpodobně odlišná velikost chromosomů těchto rostlin, což mohlo být způsobeno jejich nesprávnou segregací do gamet během meiózy. U aneuploidních jedinců nebyli patrné žádné morfologické rozdíly oproti přirozeným tetraploidům. Zda jsou aneuploidi fenotypově rozeznatelní od euploidních rostlin pravděpodobně záleží na tom, jak moc se liší velikost aneuploidního genomu od euploidního tj. kolik důležitých genů chybí nebo naopak přebývá (Henry et al. 2006).

6.1.2 *Centaurea phrygia*

U druhu *Centaurea phrygia* se projevila vysoká citlivost na kolchicin při dané koncentraci (0,2%) a době působení (12 hodin) v porovnání s druhem *Vicia cracca*. Jeho aplikaci nepřežilo téměř 96 % semenáčků. *Centaurea* má poměrně malá semena a s ošetřenými semenáčky se manipuluje hůře než u druhu *Vicia cracca*. Vysoká mortalita rostlin byla pravděpodobně způsobena roztokem kolchicinu, který měl pro tento druh příliš vysokou koncentraci. Po přesazení do sadbovače se uchytily cca $\frac{3}{4}$ semenáčků, jež měly dobře vyvinuté děložní lístky. Naprostá většina jedinců ale nevytvořila žádné nové lístky a jejich vzrostné vrcholy postupně zasychaly a téměř všechny semenáčky nakonec uhynuly (přežilo 4,3 % jedinců). Ntuli and Zobolo (2008) zkoušeli použít různé koncentrace kolchicinu u druhů *Coccinia palmata* a *Lagenaria sphaerica*. Ukázali, že zvyšující se koncentrace a stejná doba působení měla za následek menší přežívání semenáčků kvůli negativnímu vlivu této látky na rozvoj vzrostného vrcholu rostlin u obou druhů, což koresponduje s výsledky u tohoto druhu. Vysokou citlivost vůči kolchicinu potvrzuje i vysoké množství vzniklých tetraploidů (31,6 %) a chimér (42 %). V měřeném souboru tedy bylo nejméně diploidů (26,4 %).

Hodnoty relativní fluorescence diploidů (jedinců, kteří nezapolyloidizovali) a neotetraploidů druhu *Centaurea phrygia* byly také porovnány s hodnotami přirozených cytotypů. Koutecký et al. (2012) naměřili odlišné hodnoty u přirozených tetraploidů, než jaké vyšly v tomto případě u somatické polyloidizace. Hraniční hodnoty u přirozených tetraploidů byly 1,474 – 1,585, zatímco u neotetraploidů byly 1,558 – 1,652. Je tedy zřejmé, že přirození tetraploidi nemají dvojnásobně velký genom vzhledem k přirozeným diploidům a že u této polyloidní linie tedy s největší pravděpodobností došlo v průběhu evoluce k částečné diploidizaci genomu. Jedná se o postupný proces, kdy jsou nejdříve některé geny umlčeny a pak následně odstraněny z genomu (Soltis and Soltis 1999). U tohoto druhu by byl postup, který použili k určení neotetraploidů Baldwin and Husband (2011) zcela nevhodný. Rostliny se nepodařilo mezi sebou sprášit a proto nebyly k dispozici žádná semena pro další experimenty.

6.1.3 *Pimpinella saxifraga*

Druh *Pimpinella saxifraga* reagoval na působení kolchicinu jen o trochu lépe než *Centaurea phrygia*. Jeho aplikaci nepřežilo téměř 94 % jedinců, ale polyploidizace byla skoro o 10 % úspěšnější. Semenáčky ošetřené kolchicinem byly poměrně malé a náchylné k poškození při přesazování do sadbovače. Ale jejich menší velikost měla zřejmé výhody (stejně jako *Centaurea*) oproti druhu *Vicia cracca* při indukci polyploidizace.

Hodnoty relativní fluorescence diploidních a neotetraploidních jedinců byla porovnána s nepublikovanými daty Dany Kořínkové. Průměrná hodnota DNA indexu přirozených diploidů byla 1,254, ale hodnota nezpolyloidizovaných rostlin byla jen 1,213. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben malým datovým souborem přirozených diploidů (cca 20 rostlin) a tudíž byla zahrnuta jen část celkové variability přirozených diploidů. Experiment byl u tohoto druhu proveden s ročním zpožděním oproti druhům *Vicia cracca* a *Centaurea phrygia*. Tento druh také obvykle kvete až druhým rokem, tj. rostliny kvetly poprvé na jaře tohoto roku.

6.1.4 Výhody a nevýhody somatické polyploidizace kolchicinem

Pro syntézu neotetraploidů byla použita metodika B. Husbanda et al. (2008) kteří použili 0,2% roztok kolchicinu při působení 12 hodin u druhu *Chamerion angustifolium* z čeledi *Onagraceae*. Druhy v této práci však patří k jiným čeledím (*Vicia cracca* – *Fabaceae*, *Centaurea phrygia* – *Asteraceae* a *Pimpinella saxifraga* – *Apiaceae*) a jejich reakce na kolchicinový treatment je poměrně rozdílná. U druhu *Vicia cracca*, kde byly vyzkoušeny tři různé doby působení kolchicinu při stejné koncentraci, je však dobře vidět, že rostliny mají poměrně široké spektrum hodnot, ve kterých na kolchicin pozitivně reagují. Každý druh má však vlastní optimum koncentrace a doby působení kolchicinu, při kterých je vysoká úspěšnost vzniku neotetraploidů a relativně nízká úmrtnost rostlin. Z toho důvodu se obvykle zkouší různé koncentrace kolchicinu a doby jeho působení, aby byla nalezena správná rovnováha pro konkrétní druh, např. Ntuli and Zobolo (2008), Sakhanokho et al. (2009). Ascough and van Staden (2008) zkoušeli u druhu *Hedychium muluense* čtyři různé koncentrace kolchicinu a pro každou koncentraci tři doby působení a přesto se jim nepodařilo vytvořit žádného neotetraploida, ale pouze ploidní chiméry.

Výhoda somatické polyploidizace kolchicinem spočívá především v tom, že se jedná o rychlou metodu a po optimalizaci pro konkrétní druh, lze získat i vysoký počet neopolyploidních rostlin. Aplikace kolchicinu je jednoduchá a není potřeba žádné speciální vybavení, které by současné laboratoře běžně neměly. K prvotní identifikaci neopolyploidních rostlin je pak nejlepší využít průtokový cytometr. Příprava vzorků je také jednoduchá a samotné měření velmi rychlé. Po tomto kroku se již autoři některých prací přestávají otázkou počtu chromosomů a účinků kolchicinu na rostliny dále zabývat a již první generaci neopolyploidů využívají pro další experimenty (Kwok 2013). V jiných studiích jsou kříženy rostliny z první generace neopolyploidů za účelem získání 2. generace rostlin, která by již neměla být kolchicinem ovlivněna (Husband et al. 2008). Ploidie těchto potomků je opět standardně ověřována průtokovým cytometrem, na kterém je však problém odlišit aneuploidní a euploidní jedince. V této chvíli se studie dělí na dvě skupiny. Do té první spadají studie, jejichž cílem je zkoumat rozdíly v ekologických vlastnostech neopolyploidů a jejich porovnání s přirozenými cytotypy za účelem odlišení těch vlastností, které vznikly pouze v důsledku polyploidizace a které až následnou evolucí. V těchto studiích není uváděno, že by se nějakým způsobem řešila možná aneuploidie u syntetizovaných neopolyploidů. Buď je tedy autory ignorována, nebo není v publikacích případné řešení uvedeno. Do druhé skupiny spadají studie, které jsou vyloženě zaměřené na aneuploidii u kolchicinem indukovaných neopolyploidů nebo jejich potomstvo anebo na přirozené aneuploidy. Ale u jejich ekologických vlastností je obvykle pouze zmíněna fenotypová podobnost nebo nepodobnost s euploidy. Nevýhodami kolchicinu jsou tedy především chromosomové změny, ke kterým dochází při indukované polyploidizaci a i po ní u další generace rostlin a které jsou jen velmi těžko identifikovatelné. Při polyploidizaci je narušena struktura chromosomů a nelze s jistotou říct, zda se zduplikovaly všechny geny. Jisté však je, že pokud aneuploidní jedinci nejsou odlišeni od euploidů a mohou významným způsobem narušit zkoumání rozdílů mezi diploidy, tetraploidy a neotetraploidy.

6.2 Srovnání fenotypu mezi přirozenými diploidy, tetraploidy a neotetraploidy

Původně měla být u přirozených diploidů, tetraploidů a neotetraploidů analyzována klíčivost, ale u přirozených tetraploidů vyklíčilo jen pět z 31 vyšetých semen, což bylo nejspíše způsobenou špatným obroušením semen. Přirození tetraploidi byli tedy vyseti znovu a to už klíčivost byla vysoká (semena byla znovu lehce obroušena smirkovým papírem). To znamená, že buď byla nízká klíčivost skutečně způsobena horším obroušením semen než u diploidů a neotetraploidů nebo měli tetraploidi silnější osemení, ale ani jeden důvod nebylo možné s jistotou určit.

U rostlin byla analyzována rychlost klíčení a relativní růstová rychlost. V klíčivosti se od sebe průkazně odlišovaly všechny tři skupiny. Nejrychleji klíčili diploidi, pak tetraploidi a nakonec neotetraploidi. Ale v relativní růstové rychlosti už průkazný rozdíl zaznamenán nebyl. Levin (1983) ve svém review uvádí, že u většiny druhů klíčí diploidi rychleji než tetraploidi. Dále uvádí, že kvůli větším semenům mají tetraploidi větší a životaschopnější semenáčky, nicméně tato výhoda rostlinám vydrží jen v raných stádiích a následně se růst zpomalí. To je pravděpodobně důvod, proč nebyl zaznamenán rozdíl v růstu mezi diploidy u jednotlivých skupin, protože růstová rychlost byla počítána u rostlin ve věku šesti týdnů. Z těchto výsledků vyplývá, že rychlost klíčení je pravděpodobně ovlivněna jak polyploidizací, tak i následnou evolucí polyploidní linie, ale na rychlost růstu v pozdějším období života rostlin už tyto faktory vliv nemají.

U přirozených diploidů, tetraploidů a neotetraploidů (jedinci se spočítanými chromosomy) byla měřena velikost průduchů. Tetraploidi a neotetraploidi měli průkazně delší průduchy než diploidi, což odpovídá výsledkům z mnoha dalších studií (např. Warner and Edwards 1993, Liu et al. 2011). Rozdíl mezi tetraploidy a neotetraploidy prokázán nebyl, což mohlo být dáno tím, že aneuploidní rostliny se také vzájemně lišily ve velikosti průduchů a mohli tak výsledek zkreslovat. Pozitivní vztah mezi hodnotou relativní fluorescence u aneuploidů a velikostí průduchů však prokázán nebyl. Možným vysvětlením je to, že rozdíl v počtu chromosomů (1-2 chromosomy) byl moc malý na to, aby se nějak projevil v délce průduchů, je-li bráno v úvahu to, že rozdíl 14 chromosomů změnil délku průduchů přibližně o 30 %. Z těchto výsledků je však jasné že velikost průduchů je polyploidizací ovlivněna.

6.3 Akumulace kadmia u diploidních a tetraploidních rostlin a interakce mezi příjmem kadmia a zinku

Akumulace kadmia v rostlinách je téma, kterému je v současné době věnována pozornost kvůli stoupajícímu znečištění životního prostředí a kvůli důsledkům, které má tento těžký kov jak na rostliny tak na lidské zdraví. Postupná akumulace kadmia v čase byla prokázána u obou zkoumaných druhů. Druh *Centaurea phrygia* ale obsahoval více kadmia než *Vicia cracca*. Tento výsledek odpovídá studii Cibulky et al. (1991), kteří rozdělili rostlinné čeledi na tři skupiny podle stupně akumulace kadmia. Druhy čeledi *Asteraceae* spadají do skupiny s vysokou akumulací, zatímco druhy čeledi *Fabaceae* přijímají kadmium jen v malém množství. U obou druhů byl patrný rozdíl v obsahu kadmia v kořenech a listech a v obou případech více Cd obsahovali kořeny (Alfadul and Al-Fredan 2013, Grant et al. 1998). Na rostlinách nebyly pozorovány žádné negativní účinky kadmia, což bylo asi díky nízké koncentraci nebo krátké době působení těžkého kovu. Vliv ploidie na akumulaci kadmia se projevil pouze u listů druhu *Centaurea phrygia* po 2, 6, 10 a 14 dnech působení. To přesně odpovídá odběrům, kde byli dobře vyvinutí jedinci nahrazeni třemi malými rostlinami. Menší rostliny zřejmě přijali více kadmia intenzivnějším čerpáním živin z média kvůli růstu než větší rostliny, které už měli pro další růst menší prostor. U druhu *Vicia cracca* se vliv ploidie neprokázal ani v kořenech ani v listech, přestože v tomto případě byly zkoumané rostliny totožného stáří. Tyto výsledky nekorespondují s výsledky ze studie na autopolyloidním druhu *Matricaria chamomilla* (Grejtovský and Pirč 2000) ani s výsledky na allopolyploidních druhích, kde rostliny s nižší ploidíi akumulovaly více kadmia (Kraljević - Balalić et al. 2009, Cakmak et al. 2000, Ci et al. 2010).

Ke snížení koncentrace Zn, v rostlinách se stoupajícím obsahem kadmia, došlo pouze u diploidů druhu *Centaurea phrygia*, tento výsledek vyšel i u diploidů druhu *Chamomilla recutita* (Grejtovský and Pirč 2000). V obou případech vyšlo, že diploidi akumulovali více kadmia než tetraploidi a jejich příjem zinku byl tedy více narušen. Shoda byla také v tom, že u tetraploidů se koncentrace zinku se stoupajícím obsahem kadmia neměnila tj. tato ploidie nebyla v tomto směru kadmii nijak ovlivněna a důvodem může být právě její vyšší odolnost. U druhu *Vicia cracca* vyšel ale zcela opačný výsledek, kdy u obou ploidíi došlo ke zvýšení obsahu zinku v rostlinách se zvyšující se koncentrací kadmia. *Vicia cracca* patří do skupiny, která akumuluje jen málo kadmia, a

proto zřejmě nebyl příjem zinku tímto těžkým kovem narušen opět s tím rozdílem, že tetraploidi byli schopni přijmout více zinku než diploidi při stejné koncentraci kadmia. Sharma et al. (1999) publikoval, že kadmium se zinkem fungují jako antagonisté pouze při určitých koncentracích obou prvků a při určité době působení, jinak příjem zinku nemusí být kadmiem narušen.

Nicméně o akumulaci kadmia a jeho interakci se zinkem u diploidních a tetraploidních rostlin je zatím známo tak málo informací, že je potřeba provést další experimenty, než bude možné vyvodit nějaké obecnější závěry.

6.4 Reakce diploidů a tetraploidů na stres suchem a zastíněním

U druhů *Centaurea phrygia* a *Knautia arvensis* byl prokázán vliv stresového režimu, ve kterém byly pokusné rostliny pěstované. To znamená, že byla použita vhodná úroveň stresu, tak aby bylo možné zachytit případný vliv ploidie v reakci na něj. U druhu *Vicia cracca* byl vliv režimu jen okrajově průkazný a to z toho důvodu, že stres v režimu sucha byl měřen jen pár hodin po dešti a faktor Qy je vhodný spíše pro měření okamžitého než dlouhodobého stavu rostliny. Z toho důvodu je tento výsledek zkreslen a naměřená data z tohoto stresového režimu odpovídají kontrolním rostlinám. Rozdíl v ploidii u tohoto druhu vyšel pouze u kontrolního režimu, což znamená, že zde působil buď ještě nějaký jiný než stresový faktor nebo mají tetraploidní rostliny jednoduše efektivnější fotosyntézu ve stabilních příznivých podmínkách (Lin et al. 2011). U druhu *Knautia arvensis* se vliv ploidie neprojevil ani u jednoho stresového režimu. Tento výsledek, kdy se od sebe ploidie neliší, se v literatuře objevuje poměrně zřídka (Sugiyama 2006, Petit and Thompson 1997). U druhu *Centaurea phrygia* byl vliv ploidie prokázán u suchého i stinného režimu a v obou případech byla účinnost fotosyntézy efektivnější u tetraploidů. U vodního deficitu byli i v mnoha dalších studiích obvykle úspěšnější tetraploidi než diploidi (např. Yang et al. 2014, Liu et al. 2011). Překvapivým výsledkem bylo, že u stíněných tetraploidů byla fotosyntéza efektivnější než u kontrolních rostlin. Možným vysvětlením může být to, že u kontrolních rostlin docházelo k fotorespiraci, která výtěžek fotosyntézy snížila, protože měření u tohoto druhu probíhalo za teplého a slunečného dne.

V obou případech, kde byl prokázán efekt ploidie v reakci na stres byla účinnost fotosyntézy vyšší u tetraploidů. Nicméně byly zde uvedeny také případy, kdy se ploidie v reakci na stres nelišily. Ale ani jednou nereagovaly na stres lépe diploidní rostliny. Z těchto výsledků vyplývá, že hypotéza o schopnosti tetraploidů lépe se přizpůsobit stresovým podmínkám je pravděpodobně druhově specifická a nejedná se o obecnou vlastnost tetraploidů.

7 Závěr

Úspěšnost splnění cílů a zodpovězení kladených otázek.

- 1 Vytvoření somatických neopolyploidů kolchicinem alespoň u jednoho vybraného druhu.

Při použití metodiky 0,2% roztok kolchicinu a 12 hodin působení se podařilo vytvořit 4 neotetraploidy u druhu *Vicia cracca*, 6 u druhu *Centaurea phrygia* a 5 u druhu *Pimpinella saxifraga*. Při prodloužení doby působení na 18 hodin při stejné koncentraci kolchicinu u druhu *Vicia cracca* byli získáni další 3 jedinci.

- 2 Vypěstování 2. generace neopolyploidních rostlin, které by bylo možno porovnávat s přirozenými diploidy a tetraploidy.

Pouze u druhu *Vicia cracca* se podařilo vypěstovat 2. generaci neopolyploidních rostlin a to celkem 27 jedinců. U těchto rostlin byl prokázán výskyt aneuploidie. Aneuploidní jedinci se fenotypově nelišili od euploidních rostlin. Neotetraploidy 1. generace druhu *Centaurea phrygia* se nepodařilo vzájemně sprášit a druh *Pimpinella saxifraga* vykvetl až na jaře 2014.

- 3 Rozlišení těch vlastností, které vznikly přímo v důsledku polyploidizace a které se vytvořily až v průběhu evoluce

Polyploidizace má přímý vliv na velikost buněk organismu, což byla v tomto případě velikost průduchů u rostlin. Na relativní růstovou rychlost má pravděpodobně vliv jak polyploidizace, tak i následná evoluce dané ploidie. Tyto výsledky však mohou být ovlivněny zahrnutím aneuploidních jedinců do analýzy.

- 4 Zhodnotit výhody a nevýhody somatické polyploidizace kolchicinem u rostlin.

Polyploidizace kolchicinem je rychlou a jednoduchou metodou, která má při správné optimalizaci pro konkrétní druh vysokou úspěšnost vzniku neopolyploidů. Tato látka však ovlivňuje fenotyp rostlin a způsobuje různé chromosomové změny jak přímo u syntetizovaných neopolyploidů, tak i u jejich potomstva. Tyto důsledky je potřeba brát v potaz, jinak mohou výrazně skreslit výsledky zejména v ekologických studiích, kde jsou tyto rostlin použity.

- 5 Zjistit, zda se liší akumulace těžkých kovů (konkrétně kadmia) u diploidních a tetraploidních rostlin a zda je tím ovlivněn příjem jiných základních prvků (konkrétně zinku).

Rozdíl v akumulaci kadmia se projevil pouze u listů druhu *Centaurea phrygia*, kdy více kadmia přijímali diploidi. Tento výsledek byl však pravděpodobně způsoben odlišným stářím diploidních a tetraploidních rostlin použitých v pokusu. U druhu *Vicia cracca* se rozdíl mezi ploidiemi neprojevil. Negativní vliv kadmia na příjem zinku rostlinami byl prokázán opět pouze u diploidů druhu *Centaurea phrygia*. U druhu *Vicia cracca* obsah zinku se stoupající koncentrací kadmia rostl, tetraploidi však byli schopni přijímat více zinku než diploidi.

- 6 Porovnat reakci diploidních a tetraploidních rostlin na pěstování v různých stresových podmínkách (konkrétně v režimu s omezenou zálivkou a v režimu, kde byly rostliny stíněny).

Rozdíly mezi cytotypy v reakci na stres byly zaznamenány pouze u druhu *Centaurea phrygia*. Při omezené zálivce i stínění se lépe se stresem vyrovnali tetraploidi. U druhu *Knautia arvensis* a *Vicia cracca* se rozdíl mezi ploidiemi neprojevil. Nelze tedy tvrdit, že tetraploidi mají obecnou schopnost snáze se vyrovnat se stresem, než diploidi.

8 Seznam použité literatury

- Adams, L. K. and Wendel J. F. 2005. Polyploidy and genome evolution in plants. - Current opinion in plant biology 8: 135-141
- Alfadul, S. M. S. and Al-Fredan M. A. A. 2013. Effects of Cd, Cu, P and Zn combinations on *Phragmites australis* metabolism, metal accumulation and distribution. - Arabian journal for science and engineering 38: 11-19
- Alfvén, T., Elinder C.-G. and Carlsson M. D. 2000. Low-level cadmium exposure and osteoporosis. - Journal of bone and mineral research 15
- Amiri, S., Kazemitabaar S. K., Ranjbar and Azadbakht M. 2010. The effect of trifluralin and colchicine treatments on morphological characteristics of jimsonweed (*Datura stramonium* L.). - Trakia journal of sciences 8: 47-61
- Anssour, S., Krügel T., Sharbel T. F., Saluz H. P., Bonaventure G. and Baldwin I. T. 2009. Phenotypic, genetic and genomic consequences of natural and synthetic polyploidization of *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana obtusifolia*. - Annals of botany 103: 1207-1217
- Arvanitis, L., Wiklund Ch. and Ehrlén J. 2008. Plant ploidy level influences selection by butterfly seed predators. - Oikos 117: 1020-1025
- Arvanitis, L., Wiklund Ch., Münzbergová Z., Dahlgren J. P. and Ehrlén J. 2010. Novel antagonistic interactions associated with plant polyploidization influence trait selection and habitat preference. - Ecology letters 13: 330-337
- Ascough, G. D., van Staden J. and Erwin J. E. 2008. Effectiveness of Colchicine and Oryzalin at Inducing Polyploidy in *Watsonia lepida* N. E. Brown. - Hort science 43: 2248-2251
- Balao, F., Herrera J. and Talavera S. 2011. Phenotypic consequences of polyploidy and genome size at the microevolutionary scale: a multivariate morphological approach. - New phytologist 192: 256-265
- Baldwin, S. J. and Husband B. C. 2011. Genome duplication and the evolution of conspecific pollen precedence. - Proceeding of the Royal society 278: 2011-2017

- Baldwin, S. J. and Husband B. J. 2011. Genome duplication and the evolution of conspecific pollen precedence. - *Proceeding of Royal society London B* 278: 2011-2017
- Bennet, M. D. 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. - *Proceeding of the Royal society London* 181: 109-135
- Borges, L. A., Souza L. G. R., Guerra M., Machado I. Ch., Lewis G. P. and Lopes A. V. 2012. Reproductive isolation between diploid and tetraploid cytotypes of *Libidibia ferrea* (= *Caesalpinia ferrea*), (Leguminosae): ecological and taxonomic implications. - *Plant systematics and evolution* 298: 1371-1381
- Bretagnolle, F. and Thompson J. D. 1996. An experimental study of ecological differences in winter growth between sympatric diploid and autotetraploid *Dactylis glomerata*. - *Journal of ecology* 84: 343-351
- Bretagnolle, F. and Thompson J. D. 1996. An experimental study of ecological differences in winter growth between sympatric diploid and autotetraploid *Dactylis glomerata*. - *Journal of Ecology* 84: 343-351
- Bretagnolle, F. and Thompson J. D. 2001. Phenotypic plasticity in sympatric diploid and autotetraploid *Dactylis glomerata*. - *International journal of plant sciences* 162: 309-316
- Bretagnolle, F. and Thompson, J. D. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New phytologist*, 129: 1-22.
- Burton, T. L. and Husband B. C. 2000. Fitness differences among diploids, tetraploids, and their triploid progeny in *Chamerion angustifolium*: mechanisms of inviability and implications for polyploid evolution. - *Evolution* 54: 1182-1191
- Cakmak, I., Welch R. M., Hart J., Norvell W. A., Oztürk L. and Kochian L. V. 2000. Uptake and retranslocation of leaf-applied cadmium in diploid, tetraploid and hexaploid wheats. - *Journal of Experimental Botany* 343: 221-343
- Caperta, A. D., Delgado M., Ressurreição F., Meister A., Jones R. N., Viegas W., and Houben A. 2006. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. - *Protoplasma* 227: 147-153

- Castro, S., Münzbergová Z., Raabová J. and Loureiro J. 2011. Breeding barriers at a diploid-hexaploid contact zone in *Aster amellus*. - *Evolutionary ecology* 25: 795-814
- Ci, D., Jiang D., Wollenweber B., Jing Q. and Cao W. 2010. Genetic variance in cadmium tolerance and accumulation in wheat materials differing in ploidy and genome at seedling stage. - *Journal agronomy and crop science* 196: 302-310
- Cibulka, J. 1991. Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře. In. Academia, Praha, Česká republika: 19-121
- Cifuentes, M., Grandont L., Moore G., Cheévre A. M. and Jenczewski E. 2010. Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. - *New phytologist* 186: 29-36
- Das, P., Samantary S. and Rout G. R. 1997. Studies cadmium toxicity in plants: a review. - *Enviromental pollution* 98: 29-36
- Devi, S. R. and Prasad M. N. V. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (coontail), a free-floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. - *Plant science* 138: 157-165
- Dhawan, O. P. and Lavania U. C. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. - *Euphytica* 2: 81-89
- Doležel, J., Doleželová M. and Novák F. J. 1994. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). - *Biologia plantarum* 36: 351-357
- Doležel, J., Greilhuber J. and Suda J. 2007. Estimation of nuclear DNA kontent in plants using flow cytometry. - *Nature protocols* 2: 2233-2244
- Doležel, J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M. A. Nardi L. and Obermayer R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. - *Annals of botany* 1: 17-26
- Eigsti, O. J. and Dustin P. 1955. Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry. - The Iowa state college press
- Eliášová, A. 2008. Zhodnocení cytotypové a morfologické variability druhu *Vicia cracca* L. (Fabaceae) na území střední Evropy. - Diplomová práce, PŘF UK v Praze

- Ellerström, S. and Sjödin J. 1966. Frequency and vitality of aneuploids in a population of tetraploid red Dover. - *Hereditas* 55: 166-182
- Flagel, L. E. and Wendel J. F. 2009. Gene duplication and evolutionary novelty in plants. - *New phytologist* 183: 557-564
- Fowler, N. and Levin D. 1984. Ecological constraints on the establishment of a novel polyploid in competition with its diploid progenitor. - *The american naturalist* 124: 703-711
- Francis, A., Jones, R. N., Parker, J. S. and Posselt. 1990. Colchicine-induced heritable variation in cell size and chloroplast numbers in leaf mesophyll cells of diploid ryegrass (*Lolium perenne* L.). - *Euphytica* 49: 49-55.
- Frydrych, J. 1970. Photosynthetic characteristics of diploid and tetraploid forms of *Brassica oleracea* var. *gongyloides* grown under different irradiance. - *Photosynthetica* 4: 139-145
- Fusconi, A. Repetto O., Bona E., Massa N., Gallo C., Dumas-Gaudot E. and Berta G. 2006. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. - *Environmental and experimental botany* 58: 253-260
- Givnish, T. J. 1988. Adaptation to sun and shade: A whole-plant perspective. - *Australian journal of plant physiology* 15: 63-92
- Grant, C. A., Buckley W. T., Bailey L. D. and Selles F. 1998. Cadmium accumulation in crops. - *Canadian journal plant science* 78: 1-17
- Grejtovský, A. and Pirč R. 2000. Effect of high cadmium concentrations in soil on growth, uptake of nutrients and some heavy metals of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. - *Journal of applied botany* 74: 169-174
- Griffiths, J. H., Gelbart W. M. and Miller J. H. 1999. *Modern genetic analysis*. - New York: W. H. Freeman, ISBN 10: 0-7167-3118-5
- Hague, L. M. and Jones R. N. 1987 Cytogenetics of *Lolium perenne* Part 4, Colchicine-induced variation in diploids. - *Theoretical and applied genetics* 74: 233-241
- Hassan, L. and Wazuddin M. 2000. Colchicine-induced variation of cell size and chloroplast number in leaf mesophyll of rice. - *Plant breeding* 119: 531-533

- Hassan, L., and Jones R. N. 1994. Long-range effects of colchicine sensitivity on meiosis in *Lolium multiflorum* L. (Italian rye grass). - *Heredity* 73: 65-71
- Henry, I. M., Dilkes B. P. and Comai L. 2006. Molecular karyotyping and aneuploidy detection in *Arabidopsis thaliana* using quantitative fluorescent polymerase chain reaction. - *The plant journal* 48: 307-319
- Henry, I. M., Dilkes B. P., Young K., Watson B., Wu H. and Comai L. 2005. Aneuploidy and genetic variation in the *Arabidopsis thaliana* triploid response. - *Genetics* 170: 1979-1988
- Hijmans, R. J., Gavrilenko T., Stephenson S., Bamberg J., Salas A. and Spooner D. M. 2007. Geographical and environmental range expansion through polyploidy in wild potatoes (*Solanum* section *Petota*). - *Global ecology and biogeography* 16: 485-495
- Hroudová, Z. and Zákřavský P. 1993. Ecology of two cytotypes of *Butomus umbellatus* L. Reproduction, growth and biomass production. - *Folia geobotanica* 28: 413-424
- Husband, B. C. 2004. The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. - *Biological journal of the Linnean Society* 82: 537-546
- Husband, B. C. and Sabara H. A. 2003. Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). - *New Phytologist* 161: 703-713
- Husband, B. C., and Schemske D. W. 2000. Ecological mechanisms of reproductive isolation between diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium*. - *Journal of Ecology* 88: 689-701
- Husband, B. C., Ozimec B., Martin S. L. and Pollock L. 2008. Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: current trends and insights from synthetic polyploids. - *International journal of plant science* 169: 195-206
- Chen, Z. J. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. - *Annual review of plant biology* 58: 377-406
- Jaskani, M. J., Kwon S. W. and Kim D. H. 2005. Comparative study on vegetative, reproductive and qualitative traits of seven diploid and tetraploid watermelon lines. - *Euphytica* 145: 259-268

- Kao, R. H. 2008. Implication of polyploidy in the host plant of a dipteran seed parasite. - *Western north american naturalist* 68: 225-230
- Khazaei, H., Monneveux P., Hongbo S. and Mohammady S. 2010. Variation for stomatal characteristics and water use efficiency among diploid, tetraploid and hexaploid Iranian wheat landraces. - *Genetic resources and crop evolution* 57: 307-314
- Kim, S., Rayburn A. L., Boe A. and Lee D. K. 2012. Neopolyploidy in *Spartina pectinata* Link: 1. Morphological analysis of tetraploid and hexaploid plants in a mixed natural population. - *Plant system evolution* 298: 1073-1083
- Köhler, C., Mittelsten Scheid O. and Erilova A. 2010. The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. - *Trends in genetics* 3: 142-148
- Koutecký, P., Štěpánek J. and Baďurová T. 2012. Differentiation between diploid and tetraploid *Centaurea phrygia*: mating barriers, morphology and geographic distribution. - *Preslia* 84: 1-32
- Kralevic - Balalić, M., Mladenov N., Balalić I and Zoric M. 2009. Variability of Lead cadmium kontent in tetraploid and hexaploid wheat. - *Genetika* 41: 1-10
- Krause, G. H. and Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. - *Annual review plant physiology plant molecular biology* 42: 313-349
- Kwok, A. 2013. The role of polyploidy in the evolution of gender dimorphism: An experimental approach using *Fragaria vesca*. - Master thesis, University of Guelph
- Levin, D. A. 1975. Minority cytotype exclusion local plant populations. - *Taxon* 24: 35-43
- Levin, D. A. 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. - *American naturalist* 122: 1-25
- Levy, A. A. and Feldman M. 2004. Genetic and epigenetic reprogramming of the beat genome upon allopolyploidization. - *Biological journal of the linnean society* 82: 607-613
- Li, W. A. B, Biswas D. K., Xu H., Xu Ch., Wang X., Liu J., Jiang G. 2009. Photosynthetic responses to chromosome doubling in relation to leaf anatomy in *Lonicera japonica* subjected to water stress. - *Functional plant biology* 36: 1-10

- Li, W. L., Berlyn G. P. 1996. Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficit in *Betula papyrifera* (betulaceae). - American journal of botany 83(1): 15-20
- Lignowski, E. M. and Scott E. G. 1972. Effect of trifluralin on mitosis. - Weed science 20: 267-270
- Lin, D., Yongcun L., Huaizhi M., Tianyong Z., Feifei L., Haijiao H. and Guifeng L. 2011. Photosynthetic characteristics of tetraploid and diploid *Betula platyphylla*. - Journal of Northeast forestry university
- Liu, S., Chen S., Chen Y., Guan Z., Yin D., Chen F. 2011. In vitro induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. Shows an improved level of abiotic stress tolerance. - Scientia horticulturae 127: 411-419
- Mable, B. K. 2004. Polyploidy and self-compatibility: is there an association? - New phytologist 162: 803-811
- Maceira, N. O., Jacquard P. and Lumaret R. 1993. Competition between diploid and derivative autotetraploid *Dactylis glomerata* L. from Galicia. Implications for the establishment of novel polyploid populations. - New phytologist 124: 321-328
- Madon, M., Clyde M. M., Hasim H., Yusuf M., Mat H. and Saratha S. 2005. Polyploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. - Journal of oil palm research 17: 110-123
- Maherali, H., Walden A. E., Husband B. C. 2009. Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. - New Phytologist 184: 721-731
- Masterson, J. 1994. Stomatal Size in Fossil Plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. - Science 15: 421-424
- Meerts, P. 1992. An experimental investigation of life history and plasticity in two cytotypes of *Polygonum aviculare* L. subsp. *aviculare* that coexist in an abandoned arable field. - Oecologia 92: 442-449
- Mehta, V., Tal M., Volokita M. and Guy M. 2002. Salt stress induces upregulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. - Plant physiology 115, 393-400

- Münzbergová, Z. 2006. Ploidy level interacts with population size and habitat conditions to determine the degree of herbivory damage in plant populations. - *Oikos*: 443-452
- Münzbergová, Z. 2007. No effect of ploidy level in plant response to competition in a common garden experiment. - *Biological journal of the linnean society* 92: 211-219
- Murashige, T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assai with Tobacco tissue cultures. - *Physiologia plantarum* 15: 473-497
- Nedbal, L., Soukupová J., Kaftan D., Whitmarsh J. and Trtílek M. 2000. Kineting paging of chlorophyll fluorescence using modulated light. - *Photosynthesis research* 66: 3-12
- Needham, D. C. and Erickson H. T. 1992. Fecundity of Tetraploid × Diploid Crosses and Fertility of the Resultant Triploids in *Salpiglossis sinuata*. - *Hort science* 27: 835-837
- Ntuli, N. R. and Zobolo A. M. 2008. Effect of water stress on growth of colchicine induced polyploid *Coccinia palmata* and *Lagenaria sphaerica* plants. - *African journal of biotechnology* 20: 3548-3652
- Nuismer, S. C. and Cunningham B. M. 2005. Selection for phenotypic divergence between diploid and autotetraploid *Heuchera grossulariifolia*. - *Evolution* 59: 1928-1935
- Nuismer, S. L. and Thompson J. N. 2001. Plant polyploidy and non-uniform effects on insect. - *Proceeding of Royal society London B* 268: 1937-1940
- Oswald, B. P. and Nuismer S. L. 2007. Neopolyploidy and pathogen resistance. - *Biological sciences*: 2393-2397
- Otto, F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow citometry of nuclear DNA. In: Crissman H. A., Darzynkiewicz Z. [eds.]: *Methods in Cell Biology*, Vol. 33. Academic Press, New York.
- Otto, S. P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. - *Cell* 131: 452-462
- Panda, D., Goode B. L., Feinstein S. C. and Wilson L. 1995. Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. - *Biochemistry* 34: 11117-11127

- Petit, Ch. and Thompson J. D. 1997. Variation in phenotypic response to light availability between diploid and tetraploid populations of the perennial grass *Arrhenatherum elatius* from open and woodland sites. - *Journal of ecology* 85: 657-667
- Petit, Ch. and Thompson J. D. 1999. Species diversity and ecological range in relation to ploidy level in the flora of the Pyrenees. - *Evolutionary ecology* 13: 45-66
- Petit, Ch., Bretagnolle F. and Felber F. 1999. Evolutionary consequences of diploid - polyploid hybrid zones in wild species. - *Trends in ecology and evolution* 14: 1-6
- Ramsey, J. 2007. Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). - *Heredity* 98: 143-150
- Ramsey, J. 2011. Polyploidy and ecological adaptation in wild yarrow. - *PNAS*: 1-6
- Ramsey, J. and Schemske D. W. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. - *Annual review of ecology, evolution and systematic* 33: 589-639
- Roháček, K. 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: The definitions, photosynthetic meaning and mutual relationship. - *Photosynthetica* 40: 13-29
- Roháček, K. and Barták M. 1999. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters and some applications. - *Photosynthetica* 37: 339-363
- Roux, N., Toloza A., Radecki Z., Zapata-Arias F. J. and Dolezel J. 2003. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. - *Plant cell report* 21: 483-490
- Sakhanokho, H. F., Rajasekaran K., Kelley R. J. and Islam-Faridi N. 2009. Induced polyploidy in diploid ornamental Ginger (*Hedychium muluense* R. M. Smith) using colchicine and oryzalin. - *Hort science* 44: 1809-1814
- Salt, D. E., Prince R. C., Pickering I. J. and Raskin I. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. - *Plant physiology* 109: 1427-1433
- Sano, Y. 1980. Adaptive strategies compared between the diploid and tetraploid forms of *Oryza punctata*. - *The botanical magazine* 93: 171-180
- Semeniuk, P. and Arisumi T. 1968. Colchicine-induced tetraploid and cytochimerical roses. - *Botanical gazette* 129: 190-193

- Sharma, S. S., Schat H., Voous R. and Van Heerwaarden M. 1999. Combination toxicology of copper, zinc and cadmium in binary mixtures: concentration-dependent antagonistic, nonadditive and synergistic effects on root growth in *Silene vulgaris*. - *Environmental toxicology and chemistry* 18: 348-355
- Schlaepfer, D. R. and Edwards P. J. 2010. Why only tetraploid *Solidago gigantea* (Asteraceae) became invasive: a common garden comparison of ploidy levels. - *Oecologia* 163: 661-673
- Schönswetter P., Suda J., Popp M., Weiss-Schneeweiss H., Brochmann C. 2007. Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (Juncaceae) inferred from AFLP fingerprints, cpDNA sequences, nuclear DNA content and chromosome numbers. - *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 92-103.
- Soltis, D. E. and Soltis P. S. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. - *Critical reviews in plant sciences* 12: 243-273
- Soltis, D. E., Soltis P. S. and Tate J. A. 2003. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. - *New phytologist* 161: 173-191
- Song, K., Tang P. L. K. and Osborn T. C. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. - *Evolution* 92: 7719-7723
- Srivastava, R. and Srivastava G. K. 2002. Autopolyploids of *Helianthus annuus* L. var. morden. - *Cytologia* 67: 213-220
- Stebbins, G. L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Arnold, London
- Sugiyama, S. 2006. Responses of shoot growth and survival to water stress gradient in diploid and tetraploid populations of *Lolium multiflorum* and *L. perenne*. - *Grassland science* 52: 155-160
- Španiel, S., Marhold K., Hodálová I. and Lihová J. 2008. Diploid and tetraploid cytotypes of *Centaurea stoebe* (Asteraceae) in central Europe: morphological differentiation and cytotype distribution patterns. - *Folia geobotanica* 43: 131-153
- Tann, G. Y. and Dunn G. M. 1973. Relationship of stomatal length and frequency and pollen-grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Lyess. - *Crop science* 13: 332-334

- Thompson, J. N. and Merg K. F. 2008. Evolution of polyploidy and the diversification of plant-pollinator interaction. - *Ecology*, 89: 2197-2206
- Thompson, J. N., Cunningham B. M., Segraves K. A., Althoff D. M. and Wagner D. 1997. Plant polyploidy and insect/plant interactions. - *The American naturalist* 150: 730-743
- Thompson, J. N., Nuismer S. L. and Merg K. 2004. Plant polyploidy and the evolutionary ecology of plant/animal interactions. - *Biological journal of the linnean society* 82: 511-519
- Tyler, G., Pålsson B. A. M., Bengtsson G., Bååth E. and Tranvik L. 1989. Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates. - *Water, air and soil pollution* 47: 189-215
- Voigt-Zielinski, M. L., Piwczynski M. and Sharbel T. F. 2012. Differential effects of polyploidy and diploidy on fitness of apomictic *Boechera*. - *Sexual plant reproduction* 25: 97-109
- Warner, D. A. and Edwards G. E. 1993. Effects of polyploidy on photosynthesis. - *Photosynthesis research* 35: 135-147
- Wendel, J. F. 2000. Genome evolution in polyploids. - *Plant Molecular Biology* 42: 225-249
- Yang, P. M., Huang Q.-C., Qin G.-Y., Zhao S.-P. and Zhou J.-G. 2014. Different drought-stress responses in photosynthesis and reactive oxygen metabolism between autotetraploid and diploid rice. - *Photosynthetica* 52: 193-202
- Yu, H., Wang J., Fang W., Yuan J. and Yang Z. 2006. Cadmium accumulation in different rice cultivars and screening for pollution-safe kultivar rice. - *Science of the total environment* 370: 302-309

9 Seznam obrázků

OBRÁZEK 1 - ILUSTRACE PŮSOBNÍ KOLCHICINU NA BUŇKU PŘI MITOTICKÉM DĚLENÍ. VÝSLEDKEM JE VZNIK DIPLOIDNÍ BUŇKY Z BUŇKY MONOPLÓIDNÍ (GRIFFITHS ET AL. 1999).....	25
OBRÁZEK 2 - ILUSTRACE MOŽNOSTI PÁROVÁNÍ CHROMOSOMŮ U TETRAPLOIDŮ PŘI MEIÓZE. ČTYŘI HOMOLOGNÍ CHROMOSOMY SE MOHOU PÁROVAT JAKO DVA BIVALENTY NEBO JEDEN KVADRIVALENT. OBĚ MOŽNOSTI PAK VEDOU KE VZNIKU FUNKČNÍCH GAMET. ALE MŮŽE DOJÍT I K MOŽNOSTI PÁROVÁNÍ UNIVALENT-TRIVALENT A VÝSLEDKEM JSOU PAK GAMETY NEFUNKČNÍ (GRIFFITHS ET AL. 1999)	27
OBRÁZEK 3 - ILUSTRACE VZNIKU ANEUPLOIDNÍCH GAMET KVŮLI NONDISJUNKCI (TJ. CHYBNÉMU ROZCHODU CHROMOSOMŮ) PŘI PRVNÍM A DRUHÉM MEIOTICKÉM DĚLENÍ (GRIFFITHS ET AL. 1999).	28
OBRÁZEK 4 - UKÁZKA ROSTLIN PĚSTOVANÝCH V PODMÍNKÁCH IN VITRO U DRUHU CENTAUREA PHRYGIA.....	41
OBRÁZEK 5 - DIPLOIDNÍ, TETRAPLOIDNÍ A OKTOPLOIDNÍ JEDINEC DRUHU CENTAUREA PHRYGIA.	51
OBRÁZEK 6 - JEDINEC Č. 20, 30 CHROMOSOMŮ (ANAFÁZE, ZVĚTŠENÍ 1000x).	54
OBRÁZEK 7 - JEDINEC Č. 11, 27 CHROMOSOMŮ (METAFÁZE, ZVĚTŠENÍ 1000x).....	55
OBRÁZEK 8 - PŘIROZENÝ TETRAPLOID, 28 CHROMOSOMŮ (METAFÁZE, ZVĚTŠENÍ 1000x).....	55
OBRÁZEK 9 - PŘIROZENÝ DIPLOID, 14 CHROMOSOMŮ (METAFÁZE, ZVĚTŠENÍ 1000x).....	55
OBRÁZEK 10 - UKÁZKA VELIKOSTI PRŮDUCHŮ U DIPLOIDNÍHO JEDINCE (ZVĚTŠENÍ 200x).	57
OBRÁZEK 11 - UKÁZKA VELIKOSTI PRŮDUCHŮ U TETRAPLOIDNÍHO JEDINCE (ZVĚTŠENÍ 200x).....	57

10 Seznam tabulek

TABULKA 1 - SEZNAM NEOTETRAPLOIDŮ 2. GENERACE, U KTERÝCH BYLY POČÍTÁNY CHROMOSOMY SPOLEČNĚ S JEJICH HODNOTAMI RELATIVNÍ FLUORESCENCE NAMĚŘENÉ NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU.	39
TABULKA 2 - PODMÍNKY V KLIMABOXU, KDE BYLA SEMENA UMÍSTĚNA NA VYKLÍČENÍ.	40
TABULKA 3 - CELKOVÉ VYHODNOCENÍ POČTU VYKLÍČENÝCH SEMENÁČKŮ, KTERÉ PŘEŽILY APLIKACI KOLCHICINU.	44
TABULKA 4 - CELKOVÉ SHRNUTÍ ÚSPĚŠNOSTI KOLCHICINOVÉHO TREATMENTU U DRUHU VICIA CRACCA, CENTAUREA PHRYGIA A PIMPINELLA SAXIFRAGA PO VYHODNOCENÍ PLOIDIE NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU.	45
TABULKA 5 - SHRNUTÍ POMĚRŮ RELATIVNÍ FLUORESCENCE U DIPLOIDŮ A UMĚLE SYNTETIZOVANÝCH NEOTETRAPLOIDŮ VICIA CRACCA (FLUORESCENČNÍ BARVIVO DAPI, STANDARD PISUM SATIVUM CV. CTIRAD). ČERVENOU BARVOU JSOU OZNAČENI JEDINCI, KTEŘÍ JSOU POVAŽOVÁNI ZA STRIKTNÍ NEOTETRAPLOIDY.	46
TABULKA 6 - SHRNUTÍ POMĚRŮ RELATIVNÍ FLUORESCENCE PRO PŘIROZENÉ CYTOTYPY DRUHU VICIA CRACCA (FLUORESCENČNÍ BARVIVO DAPI, STANDARD PISUM SATIVUM CV. CTIRAD). PŘEVZATO Z DIPLOMOVÉ PRÁCE MGR. ANEŽKY ELIÁŠOVÉ. S.E. – STŘEDNÍ CHYBA PRŮMĚRU.	48
TABULKA 7 - POMĚR RELATIVNÍ FLUORESCENCE U DIPLOIDA A UMĚLE SYNTETIZOVANÉHO NEOTETRAPLODIA DRUHU VICIA CRACCA VYPOČÍTANÝ Z GRAFU 2.	48
TABULKA 8 - SHRNUTÍ POMĚRŮ RELATIVNÍ FLUORESCENCE U DIPLOIDŮ A UMĚLE SYNTETIZOVANÝCH NEOTETRAPLOIDŮ DRUHU CENTAUREA PHRYGIA (FLUORESCENČNÍ BARVIVO DAPI, STANDARD GLYCINE MAXIMA CV. POLANKA). ČERVENOU BARVOU JSOU OZNAČENI JEDINCI, KTEŘÍ JSOU POVAŽOVÁNI ZA STRIKTNÍ NEOTETRAPLOIDY.	50
TABULKA 9 - SHRNUTÍ POMĚRŮ RELATIVNÍ FLUORESCENCE PRO PŘIROZENÉ CYTOTYPY DRUHU CENTAUREA PHRYGIA (FLUORESCENČNÍ BARVIVO DAPI, STANDARD GLYCINE MAXIMA CV. POLANKA). N - POČET VZORKŮ, S.E. - STŘEDNÍ CHYBA PRŮMĚRU. TABULKA PŘEVZATA Z KOUTECKÝ ET AL. (2012).	51
TABULKA 10 - SHRNUTÍ POMĚRŮ RELATIVNÍ FLUORESCENCE U DIPLOIDŮ A NEOTETRAPLOIDŮ DRUHU PIMPINELLA SAXIFRAGA (FLUORESCENČNÍ BARVIVO DAPI, STANDARD BELLIS PERENNIS). ČERVENOU BARVOU JSOU OZNAČENI JEDINCI, KTEŘÍ JSOU POVAŽOVÁNI ZA STRIKTNÍ NEOTETRAPLOIDY.	52
TABULKA 11 - SHRNUTÍ POMĚRŮ RELATIVNÍ FLUORESCENCE PRO PŘIROZENÉ CYTOTYPY DRUHU PIMPINELLA SAXIFRAGA (FLUORESCENČNÍ BARVIVO DAPI, STANDARD BELLIS PERENNIS). N - POČET VZORKŮ, S.E. - STŘEDNÍ CHYBA PRŮMĚRU. NEPUBLIKOVANÁ DATA DANY KOŘÍNKOVÉ.	52
TABULKA 12 - HODNOTY RELATIVNÍ FLUORESCENCE NAMĚŘENÉ NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU U 2. GENERACE NEOTETRAPLOIDNÍCH ROSTLIN (FLUORESCENČNÍ BARVIVO DAPI A STANDARD PISUM SATIVUM). ČERVENÉ JSOU OZNAČENY ROSTLINY, U KTERÝCH BYLY POČÍTÁNY CHROMOSOMY.	53
TABULKA 13 - HODNOTY RELATIVNÍ FLUORESCENCE NAMĚŘENÉ NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU A VÝSLEDNÝ POČET CHROMOSOMŮ U JEDNOTLIVÝCH ROSTLIN.	54
TABULKA 14 - CELKOVÉ SHRNUTÍ VLIVU JEDNOTLIVÝCH FAKTORŮ NA AKUMULACI KADMIA U POKUSNÝCH ROSTLIN. HODNOTY, KTERÉ VYŠLY PRŮKAZNĚ, JSOU OZNAČENY ČERVENOU BARVOU. DF ERROR = 66.	61
TABULKA 15 - CELKOVÉ SHRNUTÍ VLIVU JEDNOTLIVÝCH FAKTORŮ NA AKUMULACI ZINKU U POKUSNÝCH ROSTLIN. HODNOTY, KTERÉ VYŠLY PRŮKAZNĚ, JSOU OZNAČENY ČERVENOU BARVOU. DF ERROR = 30.	66

TABULKA 16 - CELKOVÉ SHRnutí VLIVU JEDNOTLIVÝCH FAKTORŮ NA FUNKČNOST FOTOSYSTÉMU II U POKUSNÝCH ROSTLIN. HODNOTY, KTERÉ VYŠLY PRŮKAZNĚ, JSOU OZNAČENY ČERVENOU BARVOU. Df ERROR = 279.70

11 Seznam grafů

GRAF 1 - ZOBRAZENÍ HODNOT RELATIVNÍ FLUORESCENCE U ANEUPLOIDNÍHO JEDINCE DRUHU Vicia cracca (FLUORESCENČNÍ BARVIVO DAPI, STANDARD PISUM SATIVUM CV. CTIRAD).....	45
GRAF 2 - ZOBRAZENÍ HODNOT RELATIVNÍ FLUORESCENCE (TAB. 6) U DIPLOIDA A UMĚLE SYNTETIZOVANÉHO NEOTETRAPLOIDA DRUHU Vicia cracca (FLUORESCENČNÍ BARVIVO DAPI, STANDARD PISUM SATIVUM CV. CTIRAD).....	48
GRAF 3 - ZOBRAZENÍ HODNOT RELATIVNÍ FLUORESCENCE STANDARDU A OKTOPLOIDA DRUHU Centaurea phrygia (FLUORESCENČNÍ BARVIVO DAPI, STANDARD GLYCINE MAXIMA CV. POLANKA).....	51
GRAF 4 - ROZDÍL V DÉLCE PRŮDUCHŮ U DIPLOIDŮ, TETRAPLOIDŮ A NEOTETRAPLOIDŮ. ODLIŠNÝMI PÍSMENY JSOU OZNAČENY SKUPINY, U KTERÝCH BYL ROZDÍL PRŮKAZNÝ (P-VALUE < 0,001).....	56
GRAF 5 - ROZDÍL V DÉLCE PRŮDUCHŮ U ANEUPLOIDNÍCH JEDINCŮ VZTAŽENÝ K JEJICH HODNOTÁM RELATIVNÍ FLUORESCENCE NAMĚŘENÝCH NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU (P-VALUE < 0,001).....	57
GRAF 6 - RELATIVNÍ RŮSTOVÁ RYCHLOST U DIPLOIDŮ, TETRAPLOIDŮ A NEOTETRAPLOIDŮ. VÝSLEDNÉ HODNOTY RGR SE U JEDNOTLIVÝCH SKUPIN PRŮKAZNĚ NELIŠILY.....	58
GRAF 7 - ZNÁZORNĚNÍ RYCHLOSTI KLÍČENÍ SEMEN U JEDNOTLIVÝCH SKUPIN. SKUPINY, KTERÉ SE OD SEBE PRŮKAZNĚ LIŠILY, JSOU OZNAČENY JINÝM PÍSMENEM.....	58
GRAF 8 - ROZDÍL V AKUMULACI KADMIA MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY V KOŘENECH U DRUHU Centaurea phrygia. V PŘÍPADĚ, ŽE ROZDÍLY MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY VYŠLY PRŮKAZNĚ, TAK JSOU SLOUPEČKY OZNAČENY HVĚZDIČKOU. UVEDENY JSOU PRŮMĚRY ± SMĚRODATNÉ ODCHYLKY.....	59
GRAF 9 - ROZDÍL V AKUMULACI KADMIA MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY V LISTECH U DRUHU Centaurea phrygia. V PŘÍPADĚ, ŽE ROZDÍLY MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY VYŠLY PRŮKAZNĚ, TAK JSOU SLOUPEČKY OZNAČENY HVĚZDIČKOU. UVEDENY JSOU PRŮMĚRY ± SMĚRODATNÉ ODCHYLKY.....	60
GRAF 10 - ROZDÍL V AKUMULACI KADMIA U DIPLOIDŮ A TETRAPLOIDŮ V KOŘENECH U DRUHU Vicia cracca.....	60
GRAF 11 - ROZDÍL V AKUMULACI KADMIA U DIPLOIDŮ A TETRAPLOIDŮ V LISTECH U DRUHU Vicia cracca. V PŘÍPADĚ, ŽE ROZDÍLY MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY VYŠLY PRŮKAZNĚ, TAK JSOU SLOUPEČKY OZNAČENY HVĚZDIČKOU. UVEDENY JSOU PRŮMĚRY ± SMĚRODATNÉ ODCHYLKY.....	61
GRAF 12 - ROZDÍL V AKUMULACI ZINKU MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY V KOŘENECH U DRUHU Centaurea phrygia. V PŘÍPADĚ, ŽE ROZDÍLY MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY VYŠLY PRŮKAZNĚ, TAK JSOU SLOUPEČKY OZNAČENY HVĚZDIČKOU. UVEDENY JSOU PRŮMĚRY ± SMĚRODATNÉ ODCHYLKY.....	63
GRAF 13 - ROZDÍL V AKUMULACI ZINKU MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY V LISTECH U DRUHU Centaurea phrygia. V PŘÍPADĚ, ŽE ROZDÍLY MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY VYŠLY PRŮKAZNĚ, TAK JSOU SLOUPEČKY OZNAČENY HVĚZDIČKOU. UVEDENY JSOU PRŮMĚRY ± SMĚRODATNÉ ODCHYLKY.....	63
GRAF 14 - ZMĚNA MNOŽSTVÍ ZINKU U DIPLOIDŮ A TETRAPLOIDŮ V ZÁVISLOSTI NA STOUPAJÍCÍ KONCENTRACI KADMIA V ROSTLINÁCH U DRUHU Centaurea phrygia. PRŮKAZNĚ VYŠLA POUZE U DIPLOIDŮ (P-VALUE = 0,05).....	64
GRAF 15 - ROZDÍL V AKUMULACI ZINKU MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY V KOŘENECH U DRUHU Vicia cracca.....	64
GRAF 16 - ROZDÍL V AKUMULACI ZINKU MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY V LISTECH U DRUHU Vicia cracca. V PŘÍPADĚ, ŽE ROZDÍLY MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY VYŠLY PRŮKAZNĚ, TAK JSOU SLOUPEČKY OZNAČENY HVĚZDIČKOU. UVEDENY JSOU PRŮMĚRY ± SMĚRODATNÉ ODCHYLKY.....	65

- GRAF 17 - ZMĚNA MNOŽSTVÍ ZINKU U DIPLOIDŮ A TETRAPLOIDŮ V ZÁVISLOSTI NA STOUPAJÍCÍ KONCENTRACI KADMIA V ROSTLINÁCH U DRUHU *VICIA CRACCA*. PRŮKAZNĚ VYŠLA JAK U DIPLOIDŮ (p -VALUE = 0,043), TAK I U TETRAPLOIDŮ (p -VALUE < 0,001).65
- GRAF 18 - REAKCE DIPLOIDŮ A TETRAPLOIDŮ NA STRES SUCHEM A ZASTÍNĚNÍM BEZ OHLEDU NA DRUH ROSTLINY. NA OSE Y JE VYNESENA NAMĚŘENÁ HODNOTA PARAMETRU QY. V PŘÍPADĚ, ŽE ROZDÍLY MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY V DANÉM REŽIMU VYŠLY PRŮKAZNĚ, JE TENTO REŽIM OZNAČEN HVĚZDIČKOU. CELKOVÉ STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ JEDNOTLIVÝCH FAKTORŮ V TOMTO GRAFU JE SHRNUTO V TABULCE 16.68
- GRAF 19 - REAKCE DIPLOIDŮ A TETRAPLOIDŮ NA STRES SUCHEM A ZASTÍNĚNÍM U DRUHU *VICIA CRACCA*. NA OSE Y JE VYNESENA NAMĚŘENÁ HODNOTA PARAMETRU QY. V TOMTO PŘÍPADĚ BYL PROKÁZÁN POUZE VLIV PLOIDIE (p -VALUE = 0,04), ALE NE REŽIMU. INTERAKCE PLOIDIE : REŽIM BYLA V TOMTO PŘÍPADĚ NEPRŮKAZNÁ. V PŘÍPADĚ, ŽE ROZDÍLY MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY V DANÉM REŽIMU VYŠLY PRŮKAZNĚ, JE TENTO REŽIM OZNAČEN HVĚZDIČKOU.68
- GRAF 20 - REAKCE DIPLOIDŮ A TETRAPLOIDŮ NA STRES SUCHEM A ZASTÍNĚNÍM U DRUHU *KNAUTIA ARVENSIS*. NA OSE Y JE VYNESENA NAMĚŘENÁ HODNOTA PARAMETRU QY. BYL PROKÁZÁN POUZE VLIV REŽIMU (p -VALUE < 0,001), ALE NIKOLIV VLIV PLOIDIE. INTERAKCE PLOIDIE : REŽIM BYLA NEPRŮKAZNÁ. V PŘÍPADĚ, ŽE ROZDÍLY MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY V DANÉM REŽIMU VYŠLY PRŮKAZNĚ, JE TENTO REŽIM OZNAČEN HVĚZDIČKOU.69
- GRAF 21 - REAKCE DIPLOIDŮ A TETRAPLOIDŮ NA STRES SUCHEM A ZASTÍNĚNÍM U DRUHU *CENTAUREA PHRYGIA*. NA OSE Y JE VYNESENA NAMĚŘENÁ HODNOTA PARAMETRU QY. BYL PROKÁZÁN VLIV PLOIDIE (p -VALUE = 0,003) I REŽIMU (p -VALUE = 0,015). ZDE BYLA INTERAKCE PLOIDIE : REŽIM PRŮKAZNÁ (p -VALUE = 0,006). V PŘÍPADĚ, ŽE ROZDÍLY MEZI DIPLOIDY A TETRAPLOIDY V DANÉM REŽIMU VYŠLY PRŮKAZNĚ, JE TENTO REŽIM OZNAČEN HVĚZDIČKOU.69