

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie
Obor: Biologie



Jana Bayerová

Polyplodie v přirozených populacích v rodu *Arabidopsis*
Polyploidy in natural populations of *Arabidopsis*

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Filip Kolář

Praha, 2014

Prohlášení

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

V Praze, 15.5.2014

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Filipu Kolářovi za trpělivé vedení, vstřícnost a ochotu během zpracování bakalářské práce.

Děkuji také Liborovi Mořkovskému za podporu a cenné rady při psaní, které mi pomohly tuto práci zkompletovat.

Abstrakt

Tato práce se zabývá polyploidizací v přirozených populacích v rodu *Arabidopsis*. Shrnuje informace o příbuzných druzích rodu *Arabidopsis thaliana*, známého modelového organismu pro výzkum genetiky a fyziologie rostlin. Dosud publikované práce ukazují, že polyploidizace přináší v rámci rodu *Arabidopsis* nejen změny ekologických, klimatických a půdních nároků, ale i změnu způsobu rozmnožování. Na rozdíl od většiny prací zaměřených na studium polyploidních hybridů vzniklých umělým křížením – především s modelovým druhem *Arabidopsis thaliana*, se zde zaměřuji na případy spontánně vzniklých polyploidů v rámci rodu. Zvláštní pozornost pak věnuji dosud téměř nestudovanému diploidnímu komplexu vysokohorských populací *Arabidopsis arenosa* v Tatrách. Tento komplex, díky pozorované velké pestrosti v morfologii, v ekologických nárocích i předpokládané blízkosti rodičovských populací polyploidů, představuje jedinečný modelový systém pro studium důsledků polyploidizace v přirozených populacích rostlin.

Klíčová slova:

allopolyploid, *Arabidopsis*, *Arabidopsis arenosa*, autopolyploid, hybridizace, polyploidizace, Tatry

Abstract

This thesis deals with polyploidy in natural populations in the genus *Arabidopsis*. It summarizes information about the relatives of *Arabidopsis thaliana*, a prominent model organism for research on genetics and plant physiology. Literature shows that polyploidy affects ecological, climate and soil requirements, as well as mating system of the plants in genus *Arabidopsis*. Most of the published studies is focused on the study of artificial polyploid hybrids created by crossing experiments – especially with the *Arabidopsis thaliana*. In contrast, my thesis deals with the natural polyploids observed within the genus. In particular, I focus on the nearly unstudied di- polyploid complex of high-altitude populations of *Arabidopsis arenosa* in the Tatra Mountains. This complex represents a unique model system for studying the effects of polyploidization in the wild – thanks to the high morphological and ecological diversity of the hybrids, and to the relative genetic similarity of the parental populations.

Key words:

allopolyploid, *Arabidopsis*, *Arabidopsis arenosa*, autopolyploid, hybridization, polyploidization, Tatra

Obsah

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
OBSAH.....	6
1. ÚVOD	7
2. POLYPLOIDIZACE	8
2.1 OBECNĚ VÝZNAMNÍ POLYPLOIDI	8
2.2 POLYPLOIDIE – MECHANIZMY VZNIKU A VÝSKYT	9
2.3 AUTOPOLYPLOIDIZACE.....	10
2.4 ALLOPOLYPLOIDIZACE	11
2.5 HYBRIDIZACE.....	12
2.5.1 Hybridizace v čeledi brukvovitých (<i>Brassicaceae</i>).....	12
2.6 POLYPLOIDIZACE V RODĚ <i>ARABIDOPSIS</i>	13
2.6.1 Známí polyploidi v rodu <i>Arabidopsis</i>	13
2.6.2 Způsoby vzniku polyploidů.....	16
2.6.3 Důsledky polyploidizace v rámci rodu <i>Arabidopsis</i>	17
3. OKRUH <i>A.ARENOSA</i> V TATRÁCH A OKOLÍ	21
3.1 KOMPLEX <i>ARABIDOPSIS ARENOSA</i>	21
3.1.1 Vysokohorské populace rodu <i>Arabidopsis</i>	24
4. ZÁVĚR.....	26
6. POUŽITÁ LITERATURA	28

1. Úvod

Polyplloidizace je velmi častý a důležitý proces v evoluci rostlin. Polyplloidie rostlin jsou životaschopní, na rozdíl od živočišné říše – kde například u člověka polyplloidní jedinci neexistují, a polyplloidizace somatických buněk může vést až k rakovinnému bujení (Storchova & Pellman 2004). Pro polyplloidy rostlin je typický větší či mohutnější vzrůst. Toho je hojně využíváno v zemědělství, mnoho polyplloidních rostlin je využíváno jako užitkové plodiny, například bavlna, kukuřice, banány i různé druhy z čeledi brukvovitých (Marhold a Lihová 2006). Ve volné přírodě může mít toto vliv na invazivitu rostlin. Polyplloidie, postupně přerůstají a vytlačují své rodiče nebo původní druhy (Beest et al. 2012).

Polyplloidizace může též přispívat ke speciaci (Marhold a Lihová 2006). Nově vzniklé polyplloidie se ale musí potýkat také s řadou nevýhod. Takovou může být například komplikace s rozchodem chromozómů při meióze, patrná především u autopolyplloidů (Yant et al. 2013, Hollister et al. 2012).

Pro studium polyplloidní speciace jsem si vybrala zástupce komplexu blízkému druhu *Arabidopsis arenosa* (L.) Lawalrée v Tatrách, dále označovaný jako komplex *Arabidopsis arenosa* agg. (Měsíček 1970, Měsíček a Goliášová 2002). V této oblasti se totiž vyskytuje řada morfologicky odlišných vysokohorských populací komplexu *A. arenosa* agg. (označovaných jako druh *A. neglecta*), které jsou variabilní ve stupni ploidie – diploidní i tetraploidní. Oba cytotypy mají trochu jiné stanovištní nároky. Můžeme zde sledovat, jak se tyto rostliny chovají v přirozených populacích. *A. neglecta* je splavována do nižších poloh, kde se může potkávat a křížit s *A. arenosa*. Tento fenomén nám poskytuje zajímavý model pro studium hybridizace a nebyl dosud podrobněji zkoumán.

Do rodu *Arabidopsis* patří také dobře známý *A. thaliana*. Tento modelový organismus je blízce příbuzný s mými studovanými druhy *Arabidopsis* z přírodních populací (Schnickl et al. 2012). Díky tomu bude případný genetický výzkum navazující na mojí práci snažší, a zároveň je možné náš výzkum zasadit do širšího kontextu vědeckých poznatků.

Cílem této práce je zhodnotit dostupné informace o volně žijících příbuzných druhu *Arabidopsis thaliana*, vytvořit přehled známých polyplloidních hybridů a shrnout pro ně důsledky polyplloidizace a v neposlední řadě shrnout dosavadní kusé poznatky o populacích komplexu *A. arenosa* agg. v Tatrách.

2. Polyploidizace

Termínem polyploidizace obecně označujeme zmnožení chromozómových sad u organismu, k čemuž dochází různými mechanizmy, které popisují níže. Vznikají takto polyploidní jedinci se zmnoženým počtem kopií celého genomu. Na rozdíl od jiných mechanismů speciace je polyploidizace považována za okamžitou změnu. V jednom kroku vznikne nový polyploid izolovaný od rodičovského druhu. Předpokládá se, že zpětným křížením vznikají většinou nefertilní jedinci (Jakobsson et al. 2006).

Jak ale zjistit jestli je daná rostlina polyploidní? V dnešní době je nejrychlejší metodou, kterou můžeme použít, průtoková cytometrie. Tato metoda spočívá ve fluorescenčním měření celkového obsahu jaderné DNA ve vzorku a výhodou této analýzy je její vysoká rychlost. Na rozdíl od karyologického počítání chromozómů můžeme takto zpracovat velké množství vzorků. Tato metoda je také nedestruktivní, protože k analýze používáme jen malou část rostliny (Kron et al. 2007, Suda et al. 2006).

Polyploidizace je jedním z evolučních procesů, při kterém dochází ke vzniku nových druhů (speciati). Předpokládá se například, že celogenomové duplikace jsou hlavním faktorem v evoluci mnohobuněčných eukaryot (Yant et al. 2013). Představme si teď některé příklady významných polyploidů u rostlin.

2.1 Obecně významní polyploidi

Polyploidi se v přírodě vyskytují velmi často, proto není divu, že si člověk začal všimnout vlastností polyploidů, které může využít ke svému prospěchu. Polyploidizace může měnit rostlinnou morfologii, fenologii, fyziologii a ekologii v jedné nebo několika málo generacích (Levin 2002). Polyploidie proto hrála důležitou roli už při domestikaci některých plodin, jako například pšenice, kukuřice a bavlny (Hilu 1993). Mezi další užitkové rostliny, které byly šlechtěny na velikost plodů – a u kterých došlo ke zmnožení chromozómových sad – jsou například rajčata a banány. Polyploidní rostlinou vyšlechtěnou do mnoha tvarů a velikostí je brukev a polyploidní jsou také sójové boby (Marhold a Lihová 2006).

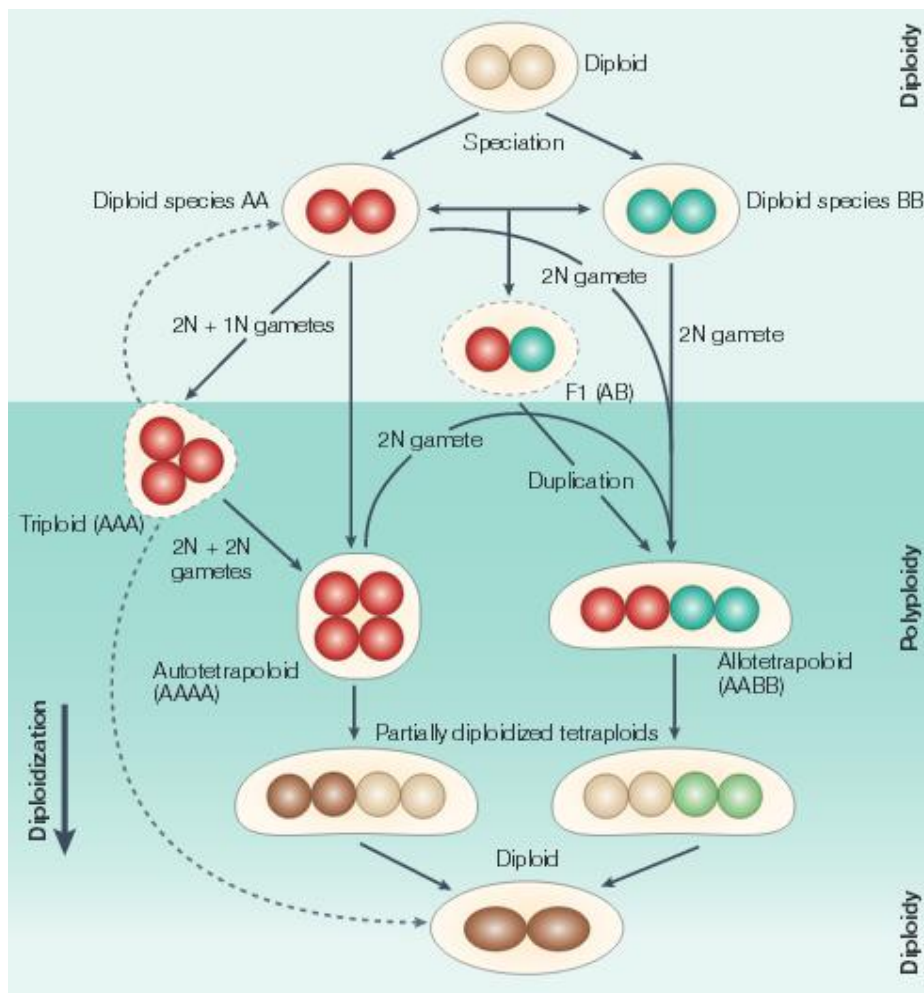
Polyploidní ovšem nejsou pouze užitkové rostliny, ale výhod polyploidizace využívají i invazní rostliny – například tetraploidní *Centaurea stoebe* šířící se v Severní Americe (Hahn et al. 2012). Ve velkém se rozrůstají a vytlačují původní druhy. Mechanismem může být vznik agresivnějšího cytotypu, který přerůstá původní cytotyp.

Nyní už se pojďme podívat blíže na mechanismy vzniku různých polyploidů.

2.2 Polyploidie – mechanismy vzniku a výskyt

Polyplodizace je široce uznávaná jako hlavní mechanismus adaptace a speciace u rostlin. Polyplodizace je pravděpodobně jedním z nejčastějších způsobů sympatrické speciace (Soltis et al. 2009, Wood et al. 2009). Poslední data také ukazují, že většina rostlin prošla jednou nebo více epizodami polyplodizace během své evoluce. Pozorování také ukazují, že vznik polyplodů je probíhající proces a ne vzácná makroevoluční událost (Marhold a Lihová 2006).

Ke vzniku polyplodů dochází nejčastěji splynutím neredukovaných gamet, vzniklých při produkci pylu a vajíček (Parisod et al. 2010). Při splynutí neredukované a redukované gamety vzniká nestabilní a často sterilní triploid. Když splynou dvě neredukované gamety diploida, vzniká potenciálně stabilní tetraploid (Comai 2005).



Obr. 1: Schéma možných cest vzniku polyplodů. Převzato z Comai (2005).

Studie ukazují, že přirozená frekvence výskytu neredukovaných gamet je podobná pro pyl i vajíčka. Produkce neredukovaného $2n$ pylu závisí na podmínkách prostředí, jako například teplotě, herbivorii, poranění, vodním a nutričním stresu (Parisod et al. 2010).

I když se běžně tvrdí, že triploidi jsou sterilní, zjistilo se, že cesta triploidním mostem (tedy vznik tetraploidů přes dvě generace – v diploidní populaci vznikne triploid a z něj splynutím diploidních gamet vznikne tetraploid) může významně přispívat k formaci autopolyloidů bez ohledu na rozmnožovací systém a k formaci allopolyloidů u cizosprašných taxonů. Autoři uzavřeli, že rychlost formování autopolyloidů může být často vyšší než rychlost formování allopolyloidů (Ramsey a Schemske 1998).

Výhodou polyploidie může být přítomnost redundantních chromozómových sad využitelných k evolučním experimentům bez rizika poškození genů nezbytných pro život rostliny. Další výhody polyploidů jsou způsobeny schopností lépe využívat heterozygotitu a v některých případech usnadnění reprodukce přes samosprašení nebo rozmnožení se nepohlavně – vegetativně (Comai 2005).

Polyploidie nepřináší ovšem jen výhody. Jednou ze zásadních nevýhod jsou problémy při průběhu mitózy a meiózy. Může docházet ke ztrátám chromozómů během mitózy, což vede k aneuploidii, nebo například k dysfunkci dělicího vřeténka (Comai 2005).

Polyploidi se vyskytují zejména v prostředí ovlivněném klimatickými a edafickými změnami. Nalézáme je proto častěji například v oblastech dříve zaledněných, zatímco diploidy najdeme typicky v roztráštěných částech refugií (Parisod et al. 2010). Polyploidi jsou ve výhodě při adaptaci na nové niky, mohou vznikat druhy odolné vůči parazitům.

Rozlišujeme dva typy polyploidů – autopolyploidy a allopolyploidy. Hlavní rozdíl je ve způsobu jejich vzniku. Autopolyploid vzniká zmnožením vlastního genomu, kdežto allopolyloid vzniká křížením mezi jedinci odlišných druhů, takzvanou hybridizací a následnou polyploidizací

Představme si jednotlivé mechanismy blíže.

2.3 Autopolyploidizace

Autopolyploidi jsou polyploidi vzniklí v populaci jednoho druhu, v autopolyloidním jedinci se tedy kombinují velmi podobné genomy. Výzkumy z poslední doby ukazují, že autopolyloidie je běžnější než se předpokládalo, ačkoli se jí dostává menší pozornosti než allopolyloidii (Parisod et al. 2010).

Ke vzniku autopolyloidů může docházet dvěma cestami. První z nich je přes triploidní most. Triploid vzniká v diploidní populaci a aby dále vznikl tetraploid, kříží se buď zpětně s některým diploidem, nebo samosprašením. Triploid produkuje mnoho variant různě

redukovaných a neredukovaných gamet (většinou n , $2n$, $3n$ gamety, ale také aneuploidní gamety). Právě přítomnost $2n$ a $3n$ gamet je ve vzniku tetraploidů přes triploidní most zásadní. Triploid může vzniknout také jako potomek křížení diploida a tetraploida. Druhou cestou jak může vzniknout autopolyloid je přímá cesta, kdy dojde ke splynutí dvou neredukovaných gamet nebo somatickému zdvojení (Ramsey a Schemske 1998).

Mezi jeden z hlavních faktorů ovlivňujících vznik neredukovaných gamet pylu patří teplota. Biogeografické a ekologické průzkumy také poukazují na asociaci mezi autopolyloidními liniemi a změnami životního prostředí (Parisod et al. 2010).

2.4 Allopolyploidizace

Allopolyploidi jsou produktem mezidruhového křížení (Parisod et al. 2010). Mohou opět vznikat dvěma cestami. První z nich je přes triploidní most. Triploidní hybrid vznikne v F1 nebo F2 generaci mezidruhovým křížením diploidů (opět za účasti neredukovaných gamet) a následně se samospráší nebo se zpětně kříží s některým diploidem. Druhou cestou je vznik mezidruhovým křížením a následnou polyploidizací diploidního hybridu. Důležitým faktorem je zde zvýšená pravděpodobnost meiotických poruch a tím i tvorba neredukovaných gamet u hybridních (byť diploidních) jedinců. Posledním mechanismem může být vznik allopolyploidního jedince křížením diploidního a tetraploidního druhu, buď ve více krocích (opět přes triploidní most) nebo přímo v jedné generaci za účasti neredukovaných diploidních gamet ($2n$), které splynou s redukovanou gametou tetraploida (také $2n$). Allopolyploidi mohou samozřejmě vznikat i v rámci vyššího ploidního stupně, a sice v populacích polyploidních druhů, kde dojde ke splynutí redukovaných i neredukovaných gamet a tím k navýšení ploidního stupně (Ramsey a Schemske 1998).

Očekává se také, že zastoupení allopolyploidů je vyšší než výskyt autopolyloidů. Bylo navrženo, že je to z velké části důsledkem heterozy a homeostáze, která se udržuje permanentní hybridizací u allopolyploidů. Dalším z důvodů proč lze toto očekávat je, že autopolyploidi mají redukovanou fertilitu kvůli nesrovnalostem v meióze (Ramsey a Schemske 1998).

2.5 Hybridizace

Hybridizace je křížení druhů, které ještě nejsou zcela reprodukčně odděleny. Výsledek takového křížení nazýváme hybridem. Pravděpodobnost mezidruhov^é hybridizace závisí na mnoha faktorech jako například fylogenetické příbuznosti, rozmnožovacím systému a hustotě výskytu divokých příbuzných (Marhold a Lihová 2006).

Při křížení blízkce příbuzných druhů dochází ke vzniku „silných hybridů“, kdy polovina jaderné informace je od otce a polovina od matky. Zpětným křížením hybrida s jedním z rodičů (introgresí) se genom druhého z rodičů vyředuje. Dochází tím k „zeslabení hybridů“ (Schmickl a Koch 2011). Pozdější generace hybridů se mohou díky genetické rekombinaci, spolu se zpětným křížením a následnou selekcí stát vysoce fertilním a úspěšným druhem.

2.5.1 Hybridizace v čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*)

V čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) existuje variabilita v počtu chromosomů. *A. thaliana* má například chromozómový počet $x = 5$, její divocí příbuzní okolo $x = 8$. Zdá se, že čím menší chromosomové číslo, tím odvozenější genom (Marhold a Lihová 2006).

Molekulární markery používané k detekci hybridizace u čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) jsou nejčastěji jaderné DNA ITS oblasti (Internal Transcribed Spacer; Álvarez a Wendel 2003). Jejich vysoká mutační rychlost umožňuje rozlišit mezi domnělými blízkce příbuznými rodiči. Při výzkumu se ale také musí počítat s tzv. *concerted evolution*, kdy dochází ke smazávání některých variant ITS (v extrémním případě zmizí celá varianta od jednoho rodiče) a k homogenizaci genomu (Elder a Turner 1995). Intergenomická rekombinace končí mozaikovou strukturou ITS sekvencí a stále by měla zanechávat stopy minulé hybridizace. Klíčové je proto kombinovat více nezávislých molekulárních markerů. Studie chloroplastových (cpDNA) haplotypů a jejich diverzity umožňují určit mateřskou rostlinu (Marhold a Lihová 2006). Využití metod prozkoumávajících diverzitu napříč celým genomem (např. AFLP, nové metody genomického sekvenování) pak poskytují ucelenější obrázek o síle hybridizace napříč jedinci i populacemi.

Čeď brukvovitých (*Brassicaceae*) zahrnuje mnoho ekonomicky důležitých plodin. Byl zaznamenán občasný výskyt spontánní hybridizace mezi pěstovanými druhy a jejich divokými příbuznými.

Současné geografické rozšíření a genetická variabilita brukvovitých rostlin byla modelována během pleistocenních klimatických změn. V zaledněném období byly jejich spojit^é areály

rozděleny a znovu se potkávaly v sekundárním kontaktu během rekolonizace. U hybridního druhu *Arabidopsis suecica* došlo podobně jako u druhu *Capsella* ke změně rozmnožovacího systému na samosprašení. To zvyšuje úspěšnost druhu při jeho vzniku. Zpětným křížením s rodiči (introgresí) totiž vznikají sterilní potomci. (Marhold a Lihová 2006).

2.6 Polyploidizace v rodě *Arabidopsis*

Rod *Arabidopsis* HEYNH. poskytuje jedinečnou příležitost ke studiu základních otázek v rostlinné biologii (Schmickl a Koch 2011). Do této oblasti zájmu patří například otázky týkající se evolučního vývoje druhů, populační genetiky, areálu rozšíření druhů a další. Různé oblasti se těší odlišně velkému zájmu. Na polyploidizaci (popř. spojenou s introgresí a hybridní speciací) v rodě *Arabidopsis* bylo doposud zaměřeno jen málo pozornosti, ačkoliv je polyploidizace u tohoto rodu běžná (Schmickl a Koch 2011). Postupně ale roste počet studií zabývajících se mapováním genového toku mezi různými druhy rodu *Arabidopsis* (Hunter a Bomblies 2010, Schmickl a Koch 2011).

2.6.1 Známí polyploidní v rodu *Arabidopsis*

U rodu *Arabidopsis* se můžeme setkat s několika polyploidními (tetraploidními) druhy. Z přírody dosud známe *A. suecica* (Fries) Norrlin, Meddel. a *A. kamchatica* (Fisch. ex DC.) O’Kane & Al-Shehbaz jako plně stabilizované allopolyploidní druhy (Schmickl a Koch 2011). Dalším popsáným přírodním polyploidním hybridem je kříženec mezi *A. arenosa* (L.) Lawalrée a *A. lyrata* subsp. *petraea* (L.) O’Kane & Al-Shehbaz (Schmickl a Koch 2011). Předpokládá se, že oba druhy *A. suecica* i *A. kamchatica* vznikly během pleistocenních klimatických oscilací ve Fennoskandinávii a Beringově úžině (Schmickl a Koch 2011). Posledním významným případem výskytu přirozených polyploidů v rodu *Arabidopsis* je složitý di- tetraploidní komplex *Arabidopsis arenosa* agg. (Měsíček 1970, Schmickl et al. 2012). Mnoho hybridů bylo připraveno uměle v experimentálních podmínkách. Takové připravoval například Měsíček (1970) pro své karyologické výzkumy. Dále se budu zabývat pouze hybridy vzniklými v přirozených podmínkách.

A. suecica byl poprvé popsán jako allotetraploid ($2n = 26$) Hylanderem (1957). Ten jako rodičovské druhy navrhl *A. thaliana* a *A. arenosa*, což bylo později potvrzeno i molekulárně. Vyskytuje se ve Švédsku a jižním Finsku. Předpokládá se, že v minulosti se druh vzhledem

k ustupujícímu ledovci rozšiřoval více na sever (Jakobsson et al 2006). Jako mateřská rostlina byla určena *A. thaliana* ($2n = 2x = 10$) a jako otcovská, tedy donor pylu, *A. arenosa* ($2n = 2x$, $4x = 16, 32$) (Schmickl a Koch 2011, Marhold a Lihová 2006, Säll et al. 2003). To bylo navíc potvrzeno umělým křížením v experimentálních podmínkách (Měsíček 1967).

Přesný mechanismus vzniku ale není dosud znám. Jako nejpravděpodobnější se zdá zkřížení redukované tetraploidní *A. arenosa* s redukovanou tetraploidní *A. thaliana* (tito jedinci jsou však v přírodě vzácní) nebo neredukovanou diploidní *A. thaliana* (Jakobsson et al. 2006, Säll et al. 2003).

Předpokládá se, že vznikl jednou polyploidizační událostí v pleistocénu, před asi 12 až 300 tisíci lety (Jakobsson et al. 2006).

Jeho rodiče mají odlišný rozmnožovací systém. *A. thaliana* je samosprašný, v populacích má tedy vysoké procento výskytu homozygotů. Vnitropopulační diverzita je nízká, naopak mezipopulační diverzita je vysoká. *A. arenosa* je cizosprašný, což napomáhá jeho vysoké vnitropopulační genetické diverzitě. Při vzniku allopolyploida *A. suecica* došlo ke změně rozmnožovacího systému směrem k vysoké schopnosti samosprášení (Marhold a Lihová 2006).

V rámci výzkumu polyploidního vzniku *A. suecica* se podařilo vypěstovat syntetické allopolyploidy, kteří byli spolu s přírodními *A. suecica* podrobeny cytogenetické analýze (in situ hybridizaci, GISH a FISH) (Comai 2000). Oba typy allopolyploidů (přírodní i syntetické) byly konzistentní v složení genomu, obsahovaly 10 chromozómů z *A. thaliana* a 16 chromosomů od *A. arenosa* (Marhold a Lihová 2006).

Pozorování párování homeologních chromozómů v syntetických polyploidech ukázalo, že k potlačování homeologního párování dochází už u brzkých generací po polyploidizační události a tedy, že nebylo dosaženo adaptivními mutacemi nebo genomovým přeskupováním, jak mohlo být očekáváno (Marhold a Lihová 2006).

Metoda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ukazuje nízkou míru variability v populaci, což podporuje teorii o jedné události vzniku v minulosti a krátké době existence (Säll et al. 2004, Säll et al. 2003).

A. kamchatica ($2n = 32$) je považován za tetraploidního hybrida mezi diploidními rodiči, sibiřským zástupcem druhu *A. lyrata* ($2n = 16$) a jedincem komplexu *A. halleri* (L.) O'Kane

& Al-Shehbaz (východoasijský poddruh *A. halleri* subsp. *gemmifera* (Matsumura) O'Kane & Al-Shehbaz, $2n = 16$) (Schmickl a Koch 2011; Shimizu-Inatsugi et al. 2009).

Allopolyploidní původ *A. kamchatica* se podařilo prokázat pomocí přímého sekvenování homologních párů low-copy jaderných genů, chloroplastových a ribosomálních ITS sekvencí (Shimizu-Inatsugi et al. 2009). Identifikování rodičů polyploidů bylo obtížné, protože běžně používané markery ve fylogenetických studiích zahrnují cpDNA s mateřskou dědičností a ITS sekvence často také reflektují pouze jednoho rodiče, kvůli homogenizaci způsobené mechanismy tzv. *concerted evolution* (Álvarez a Wendel 2003). Na základě low-copy genů dvou jedinců z Japonska navrhli autoři studie vznik *A. kamchatica* jako allopolyploida, v jeho genomu totiž detekovali sekvence blízké oběma předpokládaným rodičovským druhům. Dříve navrhovaný autopolyploidní vznik jedinců ze Severní Ameriky byl vyvrácen; data z cpDNA a ITS sekvencí byla nedostatečnými markery (Shimizu-Inatsugi et al. 2009). Za mateřskou rostlinu je považován *A. lyrata*, jako donor pylových zrn byl určen *A. halleri* (Schmickl et al. 2010). Tento druh vznikl pravděpodobně několikrát nezávisle na sobě během

pleistocénu a dob meziledových (Schmickl a Koch 2011). Je zajímavé, že tento allotetraploid je rozšířen v širší klimatické nice než oba jeho diploidní rodiče (Shimizu-Inatsugi et al. 2009, Wang et al. 2010).

Třetího přírodního allopolyploida – *A. lyrata* subsp. *petraea* ($2n = 4x$) popisují ve studii Schmickl a Koch 2011, a sice jako hybrida mezi *A. arenosa* ($2n = 4x = 32$) a *A. lyrata* subsp. *petraea* ($2n = 2x$). Donorem pylových zrn je *A. arenosa*, jejich akceptorem *A. lyrata* subsp. *petraea* (Schmickl a Koch 2011). Diploidní zástupci rodičovských druhů (*A. arenosa* a *A. lyrata* jsou přitom dobře rozlišitelné druhy, na diploidní úrovni nesdílejí žádné alely studovaných genů (Jørgensen et al. 2011). Také morfologicky jsou oba diploidní rodičovské druhy dobře odlišené. Naproti tomu tetraploidní jedinci obou druhů se částečně překrývají v morfologii, což indikuje introgresi mezi těmito druhy (Schmickl et al. 2012). Také pomocí jaderných mikrosatelitů bylo možno pozorovat introgresi mezi těmito druhy. Vysoká hodnota genetické diverzity následně izolovaných introgresních tetraploidů ve studovaném regionu vypovídá o dávné kolonizační historii populací. Podporuje to také genetický gradient v mikrosatelitových datech. Z těchto dat také vychází pozorování jednosměrného genového toku z *A. arenosa* jako donora pylových zrn a tedy pozorování *A. lyrata* jako mateřské rostliny (Schmickl a Koch 2011). Rod *Arabidopsis* je příkladem

nekompletní reprodukční izolace mezi druhy. Ačkoli jsou diploidi dobře odlišeni morfologicky i jadernými molekulárními daty, hybridizace se objevuje často (Schmickl a Koch 2011). Mikrosatelitová data pro hybridizační a introgresní systém *A. arenosa* a *A. lyrata* však nejsou dostatečná pro stanovení, jestli tetraploidní hybrid vznikl ze dvou diploidních jedinců, nebo smícháním diploidního a tetraploidního cytotypu (Schmickl a Koch 2011).

Pro ostatní polyploidní druhy v rámci rodu *Arabidopsis*, které spadají do okruhu *Arabidopsis arenosa* agg. není zatím přesně znám jejich původ, jestli vznikli jako autopolyploidi nebo allopolyploidi. Také se neví, kolikrát v historii vznikli, jestli opakovaně nebo jedenkrát (Clauss a Koch 2006).

Do komplexu *A. arenosa* agg. zahrnujeme několik tetraploidních poddruhů, u kterých se předpokládá autotetraploidní vznik. Jsou to *A. arenosa* (L.) Lawarée subsp. *arenosa*, *A. arenosa* (L.) Lawarée subsp. *arenosa* var. *intermedia* (Kovats) Hayek, *A. arenosa* (L.) subsp. *borbasii* (Zapał.) O’Kane & Al-Shehbaz, *A. neglecta* (Schult.) O’Kane & Al-Shehbaz subsp. *robusta*, nom. prov. a *A. petrogena* (A. Kern.) V.I. Dorof. subsp. *exoleta*, nom. prov. (Schmickl et al. 2012, Clauss a Koch 2006).

2.6.2 Způsoby vzniku polyploidů

Ke vzniku polyploidů dochází různými cestami. Mezi mechanismy, které vzniku polyploidů napomáhají, patří mutace. K mutacím dochází v genomu přirozeně. Ke zmnožení celých chromozómových sad dochází například při mitóze, kdy dojde k poškození dělicího vřeténka, a chromozomy se nerozejdou správným způsobem. Může dojít také k tzv. somatické polyploidizaci, kdy k poruše mitózy dojde jen v části meristému a vznikne polyploidní mutace několika buněk (Ramsey a Schemske 1998). Taková mutace v rozmnožovacích orgánech může vést k problémům při meióze, kdy vzniknou neredukované gamety, a ty když se spojí, vytvoří polyploida. Nemusí také dojít k rozdělení buňky po duplikaci chromozomů. Tímto způsobem vznikají autopolyploidi (Ramsey a Schemske 1998).

Některé studie se snaží odhadnout dobu vzniku některých druhů. Není to vůbec jednoduché – záleží vždy na více faktorech, mezi něž patří například odhad populačního růstu nebo mutační rychlosti. U druhu *A. suecica* odhadli autoři čas vzniku na dobu před 12-300 tisíci let. Když zkombinovali data s tím, co se ví o glaciální historii, podporují jejich výsledky původ *A. suecica* v jižnější oblasti než je její současný výskyt ve Švédsku a Finsku (Jakobsson et al. 2006).

Tradiční cestou jak vyzkoumat, jedná-li se o druh vzniklý polyploidizací jedenkrát nebo vícekrát, je porovnat fylogenetické stromy allopolyploida a jeho potencionálních rodičů, založené na několika molekulárních znacích. Když příslušné homeology všech allopolyploidních jedinců tvoří jednu větev na dostatečně rozlišeném stromě (tzn. např. jednu větev v sekvencích *A. thaliana* a jednu větev v sekvencích *A. arenosa*), dá se očekávat, že se jedná o vznik jedenkrát v historii. Pokud se však allopolyploidi (jejich různé linie) rozdělí do více různých větví s potomky rodičů, jedná se o mnohonásobný vznik v historii. Tato metoda byla použita na jaderných sekvenčních datech *A. suecica* a výsledkem bylo indikování jednoho počátku v historii (Jakobsson et al. 2006).

Další podporu allopolyploidního původu *A. suecica* přineslo sekvenování ITS oblastí. Podařilo se potvrdit, že *A. suecica* je allopolyploidní druh složený ze dvou odlišných typů ITS sekvencí (O’Kane et al. 1996). Přičemž jedna patří mateřské rostlině *A. thaliana* a druhým rodičem je *A. arenosa* nebo *A. neglecta*. Podpořili tak již předchozí studie na cpDNA restrikčních místech, cytologii a isoelektrickém měření enzymu rubisco (Mummenhoff a Hurka 1994).

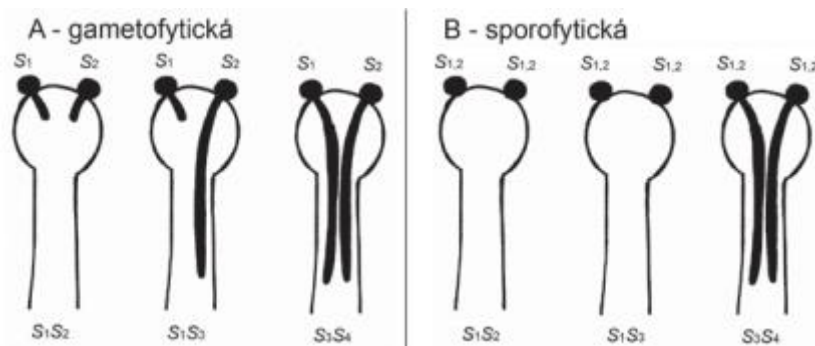
2.6.3 Důsledky polyploidizace v rámci rodu *Arabidopsis*

Jak již bylo řečeno, polyploidizace je u rostlin velmi častý jev. Jaké výhody či nevýhody z toho ale pro rostlinu plynou? Popišme si nyní některé z nich na příkladech, které byly zjištěny studiem zástupců rodu *Arabidopsis*.

Přítomnost více kopií genomu v buňce má za následek změny v základních biologických funkcích. Mění se buněčná homeostáze, chromatinová struktura a genová exprese. Při dělení buněk, tedy mitóze a meióze dochází k abnormalitám, například poruše segregace chromozómů.

U rodu *Arabidopsis* se setkáváme se dvěma typy rozmnožovacího systému – samosprášením a cizosprašností. Samosprášení je obecně strategie, kterou využívají především rostliny s nedostatkem opylovačů, v odlehlých arktických nebo vysokohorských oblastech. Je pro ně výhodnější se rozmnožit nějak, než vůbec. Tato strategie se může hodit také při kolonizaci nových stanovišť, kde nemá rostlina k dispozici pyl žádného jiného jedince. Samosprášením ale dochází postupně k tzv. inbrední depresi, kdy se postupně snižuje počet heterozygotů. Většina rostlin se ale samosprášení různými způsoby brání. Významným způsobem obrany proti samosprášení je (auto)inkompatibilita, tedy odmítnutí vlastního pylu. Tato interakce se děje mezi pylem a pletivem blizny a čnělky pestíku. Rozlišujeme dva typy pylové

autoinkompatibilitu – gametofytickou a sporofytickou. Za gametofytickou inkompatibilitu odpovídá genetická výbava haploidního pylu. Ten nese určitou S-alelu genu pro pylovou autoinkompatibilitu. Pokud se takový pyl potká s vlastní bliznou a jeho alela se shoduje s jednou z alel diploidní blizny, růst pylové láčky je zastaven. Tento typ je běžnější. Na molekulární úrovni můžeme pozorovat například štěpení příbuzné pylové RNA enzymem RNázou přítomnou ve čnělce. Sporofytická pylová inkompatibilita je určena diploidním genotypem prašníku. Tento typ nalzáme právě například u brukvovitých. Informaci o S-alele nese jen samotný pyl, ale také exina a na blizně je rozpoznáván a může klíčit jen nepřibuzný pyl (Briggs a Walters 2001).



Obr. 2: Rozdíl mezi gametofytickou a sporofytickou autoinkompatibilitou. (A) Gametofytická autoinkompatibilita – na blizně klíčí pouze haploidní pyl s jiným lokusem S-alely než má blizna. (B) Sporofytická autoinkompatibilita – informaci o lokusu S-alely nese i exina, oba lokusy musí být odlišná od kombinace lokusů, kterou má blizna. Převzato z Baláz et al. 2012.

Zástupce různých rozmnožovacích strategií můžeme nalézt také v rodě *Arabidopsis*. Se sporofytickou autoinkompatibilitou se setkáváme u většiny zástupců rodu, existují ale významné výjimky. Například mezi převážně self-inkompatibilními přírodními diploidními severoamerickými populacemi *A. lyrata* nacházíme populace jedinců schopných samosprašení (Mable et al. 2004). Jedním z důsledků polyploidizace může být například změna rozmnožovacího systému u hybrida. Mezi samosprašné druhy patří hybrid *A. suecica* pokud roste v izolaci (Säll et al. 2004). Jeho rodiče – *A. thaliana* je samosprašný a *A. arenosa* cizosprašný (Marhold a Lihová 2006). Dalším samosprašným hybridem je *A. kamchatica*, zatímco jeho rodiče jsou převážně cizosprašní (Shimizu-Inatsugi et al. 2009).

Pokud vznikne v diploidní populaci polyploid, má komplikovanou situaci a zhoršenou šanci na přežití. Všude okolo něj se vyskytují diploidi, kteří produkují haploidní pyl. Pokud se polyploid kříží zpátky s diploidními rodiči, posunuje se rovnováha opět k diploidnímu

potomstvu, případně jsou vytvářeni většinou méně životaschopní triploidní hybridi. Proto je pro čerstvě vzniklého polyploida výhodné samosprášení (Levin 2002).

V rámci druhu *Arabidopsis lyrata* a jeho tetraploidních derivátů byla prokázána variabilita v síle self-inkompatibility (SI) mezi populacemi diploidů a tetraploidů ze dvou různých regionů (Evropa a Japonsko), ale také mezi populacemi diploidů ze Severní Ameriky. Japonští tetraploidi ukázali schopnost produkovat autogamní plody, diploidi naopak nebyli schopni tvořit plody (byli self-inkompatibilní). Dále testovali rakouské tetraploidy ($4x = 32$), kde, ačkoliv většina první generace tetraploidních potomků byla silně SI, našli se i potomci s částečnou schopností samosprášení (self-compatible). Ta nicméně již nebyla nalezena v dalších generacích. Ukázalo se, že systém nastavení self-kompatibility záleží na přítomnosti různých alel S-lokusu a jejich vzájemném vztahu (Mable et al. 2004).

Dalším důležitým faktorem pro přežití druhu jsou jeho substrátové a klimatické nároky. Různé druhy preferují různě kyselé půdy. Neutrální až kyselomilný je například diploidní *A. neglecta* subsp. *neglecta*, rostoucí v Tatrách. Naopak na neutrálních až spíše bazických podkladech nalézáme řadu ostatních jedinců komplexu *A. arenosa* agg. včetně okolních tetraploidů (Schmickl et al. 2012, Clauss a Koch 2006, Měsíček a Goliášová 2002).

Vysokohorské diploidní populace *A. neglecta* subsp. *neglecta* rostou v polohách nad hranicí lesa (vzácně i níže), až do alpinských poloh. Můžeme u nich proto předpokládat odolnost vůči (vysoko)horskému prostředí; odolnost proti chladu, UV záření, větru, přizpůsobení se kratší vegetativní době a malému počtu opylovačů (Schmickl et al. 2012, Měsíček a Goliášová 2002). Tetraploidní populace *A. neglecta* subsp. *robusta* rostou v nižších polohách, což může být důsledek polyploidizace. Také se již nemusí potýkat s tak nepříznivými podmínkami, což může mít vliv na jejich habitus.

Díky změnám v reprodukčních bariérách a schopnosti polyploidů obývat jiná stanoviště, se mohou polyploidní druhy následně dostat do kontaktu s jinými druhy, s nimiž se mohou křížit (Hoffmann 2005).

Je prokázáno, že změna stupně ploidie umožňuje některým druhům efektivnější přežívání, využívání nových nik, usnadnění šíření, vytlačení rodičů a další výhody. To se podařilo například tetraploidnímu cytotypu *A. lyrata*. Tento cytotyp byl schopen uniknout z úzké niky využívané jedním z jeho rodičů, diploidním *A. lyrata* subsp. *petraea* na vápencových výchozech a migrovat na sever na kyselé substráty (Schmickl a Koch 2011). Dalším příkladem takového chování může být *A. kamchatica*, allotetraploid vzniklý z *A. lyrata* a

A. halleri, který osidluje širší klimatickou niku než jeho rodiče. Vyskytuje se ve Východní Asii a Severní Americe. Společně s rodiči se tento hybrid vyskytuje pouze v oblasti Dálného východu Ruska (Shimizu-Inatsugi et al. 2009).

Různé ploidní stupně můžeme nalézt v různých částech areálu výskytu daného druhu. To ukázala například cytogenetická analýza u *A. lyrata*. Diploidní populace *A. lyrata* jsou omezeny na teplejší východní okraj Východního Rakouského Předalpí, zatímco tetraploidní populace *A. lyrata* se vyskytují v centrální a severovýchodní části Rakouského Předalpí (Schmickl a Koch 2011).

Diploidní populace komplexu *A. arenosa* byly nalezeny výhradně v oblasti Karpat a na Balkáně. Oproti tomu tetraploidy můžeme najít v celé zbývající části areálu rozšíření. Například v západní části Východního Rakouského Předalpí se nalézají tetraploidní populace *A. arenosa* rozšířené z kopcovitých a horských stanovišť až na subalpínské masivy Severovýchodních Vápencových Alp (Schmickl et al. 2012).

Často také můžeme pozorovat rozdíly ve velikostech areálů. Větší areál rozšíření polyploidů, než mají rodiče, můžeme vidět u allotetraploida *A. kamchatica*, který se vyskytuje cirkumpolárně na severní polokouli, kdežto jeho rodič *A. halleri* pouze v Japonsku (Shimizu-Inatsugi et al. 2009). Ne vždy je areál polyploida větší než areál rodičovský. Tetraploidní populace *A. lyrata* subsp. *petraea* nacházíme v oblasti Wachau sympatricky s diploidními populacemi *A. lyrata* subsp. *petraea* (Schmickl a Koch 2011), většina zbylého obrovského cirkumpolárního areálu *A. lyrata* je však obývána diploidy. Polyploidi často osidlují jiné niky než jejich rodiče, například tetraploidní *A. lyrata* subsp. *petraea*, která roste oproti rodičům na kyselých substrátech (Schmickl a Koch 2011).

Smíšené populace více cytotypů jsou v rámci rodu *Arabidopsis* spíše vzácné, ale taky se s nimi můžeme setkat. Můžeme v nich pak pozorovat probíhající evoluci nových polyploidních linií, například vznik triploidů. Jednu z vzácných smíšených populací diploidů a tetraploidů komplexu *A. arenosa* můžeme najít ve Slovenských Tatrách (Kolář et al., nepublikováno). Další smíšenou populací je populace diploidní a triploidní *A. lyrata* v České republice jihovýchodně od Brna (Jørgensen et al. 2011). Pro studium zajímavá kontaktní zóna cytotypů různých druhů se vyskytuje v Rakouském Předalpí, v oblasti Wachau. Rostou tam tetraploidní populace *A. arenosa* a tetraploidní a diploidní populace *A. lyrata* subsp. *petraea*. Dochází zde k hybridizaci a vzniku tetraploidního hybridu *A. lyrata* subsp. *petraea*. Ke kontaktu cytotypů zde však dochází pouze na větší (krajinné) prostorové škále, smíšené

populace diploidů a tetraploidů zde vůbec nebyly nalezeny, pouze vzácně byli přítomni triploidi v jedné diploidní populaci (Schmickl a Koch 2011).

Ve studiích založených na zkoumání allopolyploidů, však zůstává otázkou, jak dobře poznat a odlišit, které efekty jsou způsobeny samotnou polyploidizací a co je způsobeno hybridizací. Tedy samotným vznikem jedince.

U autopolyploidů se často setkáváme s obtížemi při meióze, končící až sterilitou. Je to způsobeno meiotickým aparátem, který je optimalizovaný na diploidní stav, tedy segregaci homologních párů. Při vzniku tetraploida působí čtyři homology potíž (Hollister et al. 2012).

Ve studii Yant et al. (2013) ukázali, že diploidi nejsou preadaptovaní na polyploidní meiózu, a navrhli *A. arenosa* jako reprezentativní model pro studium adaptace na autopolyploidní meiózu na molekulární úrovni.

3. Okruh *A.arenosa* v Tatrách a okolí

Tatry a jejich okolí jsou součástí celku Západních Karpat. Setkáváme se tady s vysokou druhovou diverzitou a výraznou koncentrací endemismu. Tyto hory poskytly rostlinám relativně stabilní prostředí v rámci glaciálů (Mráz et al. 2007, Kliment 1999). Rostou tady nejenom jedinci z okruhu *A. arenosa*, ale také například *A. halleri* ve své zde endemické subspecii *A. halleri* subsp. *tatrica* (Kolník a Marhold 2006). Vzhledem k tomu, že se tady potkává také více cytotypů z okruhu *A. arenosa* agg., je to ideální prostředí pro studium interakcí cytotypů. Tato unikátní oblast je považována i dnes za kolébkou speciace v rodě *Arabidopsis* (Schmickl et al. 2012). Soubor populací *A. arenosa* agg. v Tatrách je unikátní, protože se zde vyskytují přirozené vysokohorské populace rodu *Arabidopsis*, které byly zatím jen málo studované.

3.1 Komplex *Arabidopsis arenosa*

Komplex *A. arenosa* je jedním z hlavních druhových komplexů v rodě *Arabidopsis*. Je blízcě příbuzný modelovému druhu *A. thaliana*. Obsahuje několik druhů, které se liší svojí ploidií, rozšířením a vlastnostmi (Schmickl et al. 2012). Do tohoto komplexu patří byliny jednoleté, dvouleté nebo krátce žijící vytrvalé rostliny, 5-45 cm vysoké, s mohutnou přízemní růžicí bez nadzemních výhonků. Jedinci rostou nejen na přirozených stanovištích skalnatého charakteru, ale také na narušených stanovištích, na okrajích lesa, při okrajích silnic, železničních tratí

nebo břehů řek (Al-Shehbaz a O’Kane 2002). Rostliny rostou na široké škále substrátů a často jsou lokálně specializované. Například na vápenec nebo půdu zamořenou těžkými kovy (Clauss a Koch 2006).

Ačkoli rozmnožovací systém nebyl detailně studován, pozorování na experimentálních plochách a ve skleníku naznačují přítomnost obou systému pohlavního rozmnožování, samosprašení i cizosprašnost. Doba kvetení je kratší než u *A. lyrata* a *A. halleri* (Clauss a Koch 2006).

Tento komplex byl dříve chápán jako jeden druh *A. arenosa* se dvěma poddruhy. Z většiny se vyskytuje jako tetraploid *A. arenosa* subsp. *arenosa* ($2n = 4x = 32$) rostoucí na kyselém podloží a písčitých půdách při pobřeží. Ve střední Evropě se překrývá s diploidním poddruhem *A. arenosa* subsp. *borbasii* ($2n = 2x = 16$) rostoucím převážně na vápenatém podloží a v Karpatech (Měsíček 1970). *A. arenosa* subsp. *borbasii* má omezenější areál rozšíření a vyznačuje se viditelně okřídlenými semeny (Clauss a Koch 2006, Hollister et al. 2012). Jedinci tohoto komplexu jsou převážně cizosprašní (Jakobsson et al. 2006, Schmickl a Koch 2011).

Tato kategorizace ale špatně odráží taxonomii a morfologickou a karyologickou diverzitu ve skupině *A. arenosa*. Dalším činitelem jsou opakující se genové duplikace (polyploidizace) a mezidruhové křížení (hybridizace), které přispívají k celkové komplexitě druhu (Clauss a Koch 2006). Oblast nejvyšší diverzity tohoto druhu, a sice Západní Karpaty, je stále málo prozkoumána. Byla zde prováděna jen provizorní a lokálně zaměřená taxonomická zhodnocení (Měsíček 1970). Situace je komplikována také tím, že zde dochází k opakované hybridizaci a introgresi. Pro ujasnění vnitrodruhových vztahů je proto potřeba dalšího výzkumu v této oblasti.

Během nepříznivých podmínek – zalednění, přežívaly druhy v refugiích. Pomocí chromozomového počtu, jaderných AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) dat a po mateřské linii děděné chloroplastové informaci (úsek trnL-F) byla v dosavadních výzkumech určena tři centra genetické diverzity v rámci komplexu *Arabidopsis aenosa* agg. – Balkán, Karpaty a nezaledněné Východní a Jihovýchodní Alpy. Všechna tři centra mohla sloužit jako dlouhodobá refugia během pleistocenních klimatických oscilací. Západní Karpaty se zdají být stále kolébkou speciace pro komplex *A. arenosa*, kvůli vysokému počtu druhů,

kteře se zde vyskytují, vysoké genetické diverzity a současné existenci obou cytotypů, diploidního i tetraploidního (Schmickl et al. 2012).

Kontaktní zóna dvou cytotypů - diploidů a tetraploidů byla lokalizována v SZ části Balkánu a v Západních Karpatech (Schmickl et al. 2012). Na základě přítomnosti dvou kontaktních zón byla vyslovena hypotéza o nejméně dvou nezávislých polyploidizačních událostech v minulosti tohoto komplexu. Při úvahách ale musíme brát ohled na možnou roli dalších nedávných autopolyploidizačních událostí (Schmickl et al. 2012).

Na základě sebraných dat se vyvozuje, že jako refugium pro *A. arenosa* během pleistocénu sloužil Balkán, ze kterého byly paralelně osídleny Alpy a Tatry. Kvůli bariéře, kterou tvoří Panonská nížina, nemohly spolu tyto populace komunikovat (neprobíhal mezi nimi genový tok) a došlo k jejich plastické proměně. Teorii, že došlo k rozšíření z Balkánu, podporuje výskyt tamějšího endemita *A. croatica* (Schott) O’Kane & Al-Shehbaz, který je s *A. arenosa* blízce příbuzný (založeno na ITS datech) (Schmickl et al. 2012). AFLP data zatím nepotvrdila paralelní evoluci *A. neglecta* z Tater a *A. arenosa* var. *intermedia* z Alp. Zatím však není vyloučeno, že by *A. arenosa* nemohla mít refugium v Západních Karpatech, kde se vyznačuje vysokou cytologickou i genetickou diverzitou.



Obr. 3: Jedinec („nížinný“ typ) komplexu *Arabidopsis arenosa* agg. Foto Filip Kolář, 2012.

V oblasti Západních Karpat se rozlišuje několik většinou nepopsaných taxonů (Měsíček 1970, Měsíček a Goliášová 2002) z komplexu *Arabidopsis arenosa* agg. Do tohoto komplexu patří celkem přibližně 10 taxonů, kromě značně odlišného druhu *A. croatica* sem náleží následující druhy a poddruhy; *Arabidopsis arenosa* (L.)

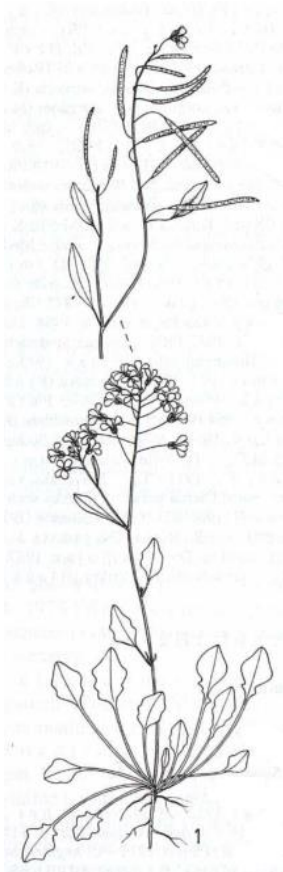
Lawalrée subsp. *arenosa*, *A. arenosa* subsp. *borbasii* (Zapał.) O’Kane & Al-Shehbaz, *A. carpatica*, nom. prov., *A. neglecta* (Schult.) O’Kane & Al-Shehbaz subsp. *neglecta*, nom. prov., *A. neglecta* subsp. *robusta*, nom. prov., *A. nitida*, nom. prov., *A. petrogena* (A. Kern.) V.I. Dorof. subsp. *petrogena*, nom. prov., *A. petrogena* (A. Kern.) V.I. Dorof. subsp. *exoleta*, nom. prov. (Schmickl et al. 2012).

Kvůli dosud neobjasněným vztahům v rámci komplexu a pouze provizornímu členění neřeším v předložené práci taxonomii tohoto komplexu, ale v oblasti Tater k němu přistupuji jako k celku. Pro účely formulování evolučních hypotéz zde rozlišuji vysokohorské populace (*A. neglecta* subsp. *neglecta* a *A. neglecta* subsp. *robusta*) a ostatní zástupce komplexu *A. arenosa* agg. jako „nížinné“ populace. Označení nižinné je zde uvedeno pouze pro přehlednost, protože tyto populace rostou v podhorských až horských polohách.

3.1.1 Vysokohorské populace rodu *Arabidopsis*

Arabidopsis neglecta (Schult.) O’Kane & Al-Shehbaz subsp. *neglecta* je diploidní ($2n = 16$), vytrvalá 4-20 cm vysoká rostlina, s krátkým oddenkem bez nadzemních výhonků. Roste jednotlivě nebo v trsech, na neutrálních až kyselých substrátech, ve vlhku na skalách, okolo ples, vodopádů a horských potoků. Vyskytuje se ve vyšších nadmořských výškách, nad hranicí lesa. Pro tetraploidní cytotyp ($2n = 32$) byl navržen název *A. neglecta* (Schult.) O’Kane & Al-Shehbaz subsp. *robusta*, nom. prov. (Měsíček 1970). Tetraploid roste v nižších nadmořských výškách a také na kyselých substrátech. Tetraploidní cytotyp se vyskytuje v Západních a Nízkých Tatrách, diploidní ve Vysokých Tatrách. (Měsíček a Goliášová 2002, Schmickl et al. 2012).

Tento druh byl poprvé popsán jako *Arabis neglecta* SCHULTES 1814 a přesné místo sběru není zcela známo – Ind. loc.: „auf den Karpaten“ tedy z Karpat (Al-Shehbaz a O’Kane 2002).

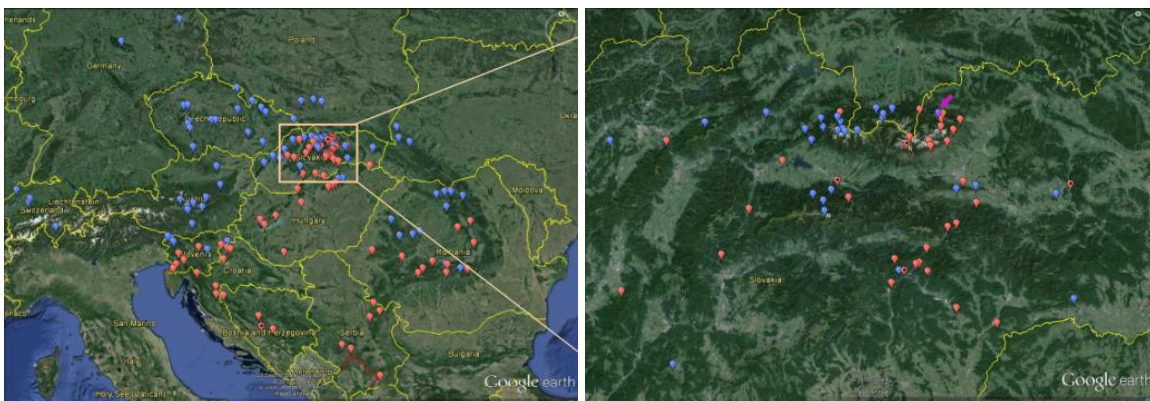


Obr. 3: Habitus vysokohorského jedince *Arabidopsis neglecta*. Převzato z Měsíček a Goliášová (2002), upraveno.



Obr. 4: Vysokohorský typ (*Arabidopsis neglecta*). Foto Filip Kolář, 2012.

Diploidní *A. neglecta* subsp. *neglecta* i tetraploidní *A. neglecta* subsp. *robusta* jsou Karpatské endemity, nejvíce rozšířené právě v Západních Karpatech. Mimo Západní Karpaty jsou uváděny ještě z Východních a Jižních Karpat (Al-Shehbaz a O’Kane).



Obr. 5: Západní Karpaty, pohoří Tatry, lokalita výskytu vysokohorských (*Arabidopsis neglecta*) a „nížinných“ (*Arabidopsis arenosa* agg.) populací. Převzato z posteru Filip Kolář et al., Krakow 2013.

V oblasti Tater můžeme najít zajímavou kontaktní zónu vysokohorských a „nížinných“ populací rodu *Arabidopsis*. Potkávají se zde diploidní a tetraploidní cytotypy, které se mezi sebou mohou křížit. Vzhledem ke křížení různých druhů zde dochází ke vzniku hybridů. Otázkou tedy zůstává, jak vzniká tetraploidní vysokohorský typ (*A. neglecta* subsp. *robusta*, nom. prov.). Můžeme formulovat dvě základní hypotézy: (1) vysokohorští tetraploidi (*A. neglecta* subsp. *robusta*) vznikli jako autopolyploidi z vysokohorských diploidů (*A. neglecta* subsp. *neglecta*) (2) vysokohorští tetraploidi (*A. neglecta* subsp. *robusta*) vznikli hybridizací v rámci komplexu *A. arenosa* agg. mezi vysokohorskými diploidy a jinými „nížinnými“ morfologicky odlišnými zástupci komplexu. Hybridizace by byla možná, neboť vysokohorský diploid bývá občas splavován do nižších poloh, kde se potkává s „nížinnými“ jedinci komplexu *A. arenosa* agg.

4. Závěr

Jak již bylo zmíněno, polyploidizace je u rostlin běžný jev a předpokládá se, že v minulosti většina rostlin polyploidizací prošla. Polyploidizace má na jedince řadu efektů. Změna obsahu DNA a přítomnost více kopií genomu v jedné buňce má vliv na celou škálu faktorů jako je rozmnožovací systém jedince, ekologické, klimatické a další nároky. Poskytuje polyploidům výhody, jako například schopnost osídlit nové niky, efektivnější schopnost uchycení se a agresivnější cytotypy jsou více konkurenčně zdatné. Na druhou stranu přináší polyploidie i problémy. Setkáváme se s nimi při mitóze a hlavně meióze vyšších ploidních stupňů. Počty chromozómů jsou buď nevyvážené, nebo celý aparát není přizpůsoben segregaci většího množství homologních chromozómů.

Setkáváme se se dvěma základními druhy polyploidů. Autopolyploidi vznikají polyploidizací vlastního genomu, allopolyploidi většinou hybridizací dvou příbuzných druhů. Mezi zkoumané hybridy v rodě *Arabidopsis* patří allotetraploidní *A. suecica* vzniklá křížením *A. thaliana* a *A. arenosa*. Jako mateřská rostlina byla určena *A. thaliana* a jako otcovská *A. arenosa*. Další allotetraploid je *A. kamchatika* vzniklý jako potomek křížení mateřské *A. lyrata* a otcovského jedince komplexu *A. halleri*. Třetí, evolučně pravděpodobně nejmladší a na druhové úrovni nediferenciovaný polyploid – jsou tetraploidní populace *A. lyrata* v Rakousku. K jejich vzniku dochází křížením tetraploidní *A. arenosa* a diploidní *A. lyrata* subsp. *petraea*.

Problémem řady studií prováděných na allopolyploidech je, že nedovedeme s jistotou říci, jestli je zkoumaný efekt důsledkem čistě polyploidizace nebo do jeho projevu zasahuje i hybridizace. Proto se v diplomové práci budu věnovat autopolyploidům. Vybrala jsem si komplex *A. arenosa* agg., konkrétně oblast Západních Karpat. Toto území je jedinečné výskytem diploidních i tetraploidních populací, které navíc vykazují zajímavou morfologickou a ekologickou diferenciaci na výškovém gradientu. Nacházíme zde i smíšenou populaci di- a tetraploidního cytotypu. To je jedinečné, protože smíšené populace v rámci rodu *Arabidopsis* jsou vzácné.

Otázky, které si kladu pro budoucí diplomovou práci jsou:

Jakým způsobem vznikly tetraploidní horské populace *Arabidopsis* v Tatrách (*A. neglecta* subsp. *robusta*, nom. prov.)?

(A) Polyploidizací z morfologicky podobných diploidních vysokohorských populací vyskytujících se ve stejném území (*A. neglecta* subsp. *neglecta*) nebo

(B) kombinací polyploidizace a hybridizace mezi diploidními vysokohorskými populacemi (*A. neglecta* subsp. *neglecta*) a morfologicky odlišnými diploidními nebo tetraploidními „nižními“ populacemi komplexu *A. arenosa* z nižších poloh?

Liší se diploidní a tetraploidní vysokohorské populace (*A. neglecta*) v ekologických preferencích?

Můžeme pozorovat změny v morfologické variabilitě spojené se změnou stupně ploidie?

6. Použitá literatura

- Álvarez I, Wendel JF. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 417–434.
- Baláž V, Balážová A, Fila J, Kolář F, Mikát M. 2012. Láska, sex a něžnosti v říši živočichů. Biologická olympiáda 2012-2013, 47. ročník, přípravný text pro kategorie A, B. Česká zemědělská univerzita v Praze, Ústřední komise Biologické olympiády, Praha 2012.
- Beest M te, Roux JJJ, Richardson DM, Brysting AK, Suda J, Kubešová M, Pyšek P. 2012. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany* **109**: 19–45.
- Briggs D, Walters SM. 2001. Proměnlivost a evoluce rostlin. 1. české vyd. Olomouc: Univerzita Palackého.
- Clauss MJ, Koch MA. 2006. Poorly known relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science* **11**: 449–459.
- Comai L. 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Molecular Biology* **43**: 387–399.
- Comai L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* **6**: 836–846.
- Elder JF Jr, Turner BJ. 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quarterly Review of Biology* **70**: 297–320.
- Hahn MA, Buckley YM, Müller-Schärer H. 2012. Increased population growth rate in invasive polyploid *Centaurea stoebe* in a common garden. *Ecology Letters* **15**: 947–954.
- Hilu KW. 1993. Polyploidy and the Evolution of Domesticated Plants. *American Journal of Botany* **80**: 1494.
- Hoffmann MH. 2005. Evolution of the Realized Climatic Niche in the Genus: *Arabidopsis* (*Brassicaceae*). *Evolution* **59**: 1425–1436.
- Hollister JD, Arnold BJ, Svedin E, Xue KS, Dilkes BP, Bomblies K. 2012. Genetic Adaptation Associated with Genome-Doubling in Autotetraploid *Arabidopsis arenosa*. *PLoS Genet* **8**: e1003093.
- Hunter B, Bomblies K. 2010. Progress and Promise in using *Arabidopsis* to Study Adaptation, Divergence, and Speciation. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* **8**.
- Jakobsson M, Hagenblad J, Tavaré S, Säll T, Halldén C, Lind-Halldén C, Nordborg M. 2006. A Unique Recent Origin of the Allotetraploid Species *Arabidopsis suecica*: Evidence from Nuclear DNA Markers. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 1217–1231.
- Jørgensen MH, Ehrlich D, Schmickl R, Koch MA, Brysting AK. 2011. Interspecific and interploidal gene flow in Central European *Arabidopsis* (*Brassicaceae*). *BMC Evolutionary Biology* **11**: 346.
- Kliment J. 1999. Komentovaný přehľad vyšších rastlín flóry Slovenska, uvádzaných

v literatúre ako endemické taxóny. *Bull. Slov. Bot. Spoločn.*, Bratislava, 21, Suppl. 4: 1–434.

Kolář F, Lučanová M, Fuxová G, Záveská E, Španiel S, Smatanova J, Marhold K. 2013. Cytological variation of *Arabidopsis arenosa* in its Carpathian diversity centre. Krakow 26–28 September, Poland.

Kolník M, Marhold K. 2006. Distribution, chromosome numbers and nomenclature of *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*) in the Carpathians. *Biologia* **61**: 41–50.

Kron P, Suda J, Husband BC. 2007. Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **38**: 847–876.

Levin DA. 2002. The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. *Oxford University Press*.

Mable BK, Beland J, Di Berardo C. 2004. Inheritance and dominance of self-incompatibility alleles in polyploid *Arabidopsis lyrata*. *Heredity* **93**: 476–486.

Marhold K, Lihová J. 2006. Polyploidy, hybridization and reticulate evolution: lessons from the *Brassicaceae*. *Plant Systematics and Evolution* **259**: 143–174.

Měsíček J. 1967. The chromosome morphology of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. And some remarks on the problem of *Hylandra suecica* (Fr.) Löve. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* **2**: 433–436.

Měsíček J. 1970. Chromosome counts in *Cardaminopsis arenosa* agg. (Cruciferae). *Preslia* **42**: 225–248.

Měsíček J, Goliášová K. 2002. *Cardaminopsis* (C. A. Mey.) Hayek. In: Goliašová K, Šípová H, eds. *Flóra Slovenska*. Bratislava: Veda, 388–415.

Mráz P, Gaudeul M, Rioux D, Gielly L, Choler P, Taberlet P, IntraBioDiv Consortium. 2007. Genetic structure of *Hypochaeris uniflora* (*Asteraceae*) suggests vicariance in the Carpathians and rapid post-glacial colonization of the Alps from an eastern Alpine refugium. *Journal of Biogeography* **34**: 2100–2114.

Mummenhoff K, Hurka H. 1994. Subunit polypeptide composition of rubisco and the origin of allopolyploid *Arabidopsis suecica* (*Brassicaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology* **22**: 807–811.

O’Kane SL Jr, Schaal BA, Al-Shehbaz IA. 1996. The Origins of *Arabidopsis suecica* (*Brassicaceae*) as Indicated by Nuclear rDNA Sequences. *Systematic Botany* **21**: 559–566.

Parisod C, Holderegger R, Brochmann C. 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist* **186**: 5–17.

Ramsey J, Schemske DW. 1998. Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 467–501.

Säll T, Jakobsson M, Lind-Halldén C, Halldén C. 2003. Chloroplast DNA indicates a single origin of the allotetraploid *Arabidopsis suecica*. *Journal of Evolutionary Biology* **16**: 1019–1029.

Säll T, Lind-Halldén C, Jakobsson M, Halldén C. 2004. Mode of reproduction in *Arabidopsis suecica*. *Hereditas* **141**: 313–317.

- Schmickl R, Jørgensen MH, Brysting AK, Koch MA. 2010.** The evolutionary history of the *Arabidopsis lyrata* complex: a hybrid in the amphi-Beringian area closes a large distribution gap and builds up a genetic barrier. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 98.
- Schmickl R, Koch MA. 2011.** *Arabidopsis* hybrid speciation processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 14192–14197.
- Schmickl R, Paule J, Klein J, Marhold K, Koch MA. 2012.** The Evolutionary History of the *Arabidopsis arenosa* Complex: Diverse Tetraploids Mask the Western Carpathian Center of Species and Genetic Diversity. *PLoS ONE* **7**: e42691.
- Al-Shehbaz IA, O’Kane SL. 2002.** Taxonomy and Phylogeny of *Arabidopsis* (*Brassicaceae*). *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* **1**.
- Shimizu-Inatsugi R, Lihová J, Iwanaga H, Kudoh H, Marhold K, Savolainen O, Watanabe K, Yakubov VV, Shimizu KK. 2009.** The allopolyploid *Arabidopsis kamchatica* originated from multiple individuals of *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis halleri*. *Molecular Ecology* **18**: 4024–4048.
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, dePamphilis CW, Wall PK, Soltis PS. 2009.** Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* **96**: 336–348.
- Suda J, Krahulcová A, Trávníček P, Krahulec F. 2006.** Ploidy Level versus DNA Ploidy Level: An Appeal for Consistent Terminology. *Taxon* **55**: 447–450.
- Wang W-K, Ho C-W, Hung K-H, Wang K-H, Huang C-C, Araki H, Hwang C-C, Hsu T-W, Osada N, Chiang T-Y. 2010.** Multilocus analysis of genetic divergence between outcrossing *Arabidopsis* species: evidence of genome-wide admixture. *New Phytologist* **188**: 488–500.
- Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB, Rieseberg LH. 2009.** The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 13875–13879.
- Yant L, Hollister JD, Wright KM, Arnold BJ, Higgins JD, Franklin FChH, Bomblies K. 2013.** Meiotic adaptation to genome duplication in *Arabidopsis arenosa*. *Current Biology* **23**: 2151–2156.