

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BOTANIKY



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

*Reprodukční izolace diploidů a tetraploidů druhu *Vicia cracca*  
a možnosti evoluce tohoto agregátu*

Praha 2016

Bc. Zuzana VLČKOVÁ

Vedoucí práce: doc. RNDr. Zuzana MÜNZBERGOVÁ, PhD.

## Prehlásenie

Prehlasujem, že som záverečnú prácu na tému Reprodukční izolace diploidů a tetraploidů druhu *Vicia cracca* a možnosti evoluce tohoto agregátu vypracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru.

V.....dňa.....

Podpis:

## **Podakovanie**

Chcela by som sa poďakovať doc. RNDr. Zuzane Münzbergovej, PhD. za odborné vedenie, ochotu a cenné rady, ktoré mi poskytla počas písania práce; Mgr. Blanke Vlasákovej, PhD. za metodické rady pri skúmaní opeľovačov; rodičom a súrodencom za oporu a povzbudenie.

## Abstrakt

Diplomová práca sa zaoberá reprodukčnými bariérami v diploidno-polyplloidnom komplexe *Vicia cracca*. Komplex so základným chromozómovým číslom  $x=7$  zahŕňa diploidy ( $2x=14$ ), tetraploidy ( $4x=28$ ) a vzácné triploidy ( $3x=21$ ). Skúmala som prezygotické bariéry medzi diploidmi a tetraploidmi: fenológiu, správanie opeľovačov (preferencia druhov voči jednotlivým ploidiám, poradie navštevovaných ploidii), premenné, ktoré by správanie opeľovačov mohli vysvetliť (množstvo nektáru ako hlavnej odmeny a veľkosť a počet peľových zŕn ako potenciálnej odmeny). V zmiešaných populáciách som analyzovala ploidiu semien a semenáčikov, aby sa zistilo aký silný je triploidný blok. Ako najsilnejšia reprodukčná bariéra sa ukázala priestorová izolácia. Veľmi významne prispieva aj správanie opeľovačov, fenológia kvitnutia iba minimálne. Koeficient vyjadrujúci mieru všetkých prereprodukčných bariér, je 0,990. Na jednej lokalite *Bombus pascuorum* preferoval tetraploidy a *Andrena* sp. diploidy, iné testy neukázali preferenciu opeľovačov voči tetraploidom aj napriek tomu, že tetraploidy produkujú viac nektáru.

**Kľúčové slová:** *Vicia cracca*, reprodukčné bariéry, zmiešané diploidno-tetraploidné populácie, správanie opeľovačov

## Abstract

Master thesis investigates reproductive barriers in diploid-polyploid complex of *Vicia cracca*. Complex with basic chromosome number  $x=7$  consists of diploid ( $2x=14$ ), tetraploid ( $4x=28$ ) and rare triploid ( $3x=21$ ) cytotype. I studied prezygotic barriers between diploid and tetraploid cytotype: phenology of flowering, pollinators' behavior (preference of species of pollinators to cytotypes, sequence of visited cytotypes), variables, that could explain pollinators' behavior (amount of nectar as the main reward, size and amount of pollen grains as a potential reward). To find out how strong the triploid block is, I analyzed ploidy of seeds and seedlings from mixed-ploidy population. The habitat isolation showed up to be the strongest reproductive barrier. Pollinator's behavior meaningfully contributes to isolation, phenology of flowering contributes only minimally. Index expressing rate of prereproductive barriers is 0,990. Pollinator *Bombus pascuorum* visited on one locality preferably tetraploid plants and *Andrena* sp. preferred diploid plants. Even though tetraploid plants produce more nectar, no other analysis showed pollinators' preference to tetraploid plants.

**Key words:** *Vicia cracca*, reproductive barriers, mixed diploid-tetraploid populations, pollinators' behavior

# Obsah

Obsah.....	1
Zoznam použitých skratiek.....	8
1 Úvod.....	9
1.1 Reprodukčné bariéry a ich význam.....	9
1.2 Ciele práce.....	16
2 Metodika.....	18
2.1 Študovaný taxón.....	18
2.2 Reprodukčné bariéry.....	20
2.2.1 Určovanie úrovne ploidie.....	20
2.2.2 Fenologická izolácia.....	20
2.2.3 Správanie opelovačov.....	21
2.2.4 Analýza semien zo zmiešanej populácie.....	23
2.2.5 Produkcia nektáru.....	24
2.2.6 Veľkosť peľových zrn a ich množstvo.....	24
2.2.7 Umelé kríženie.....	25
2.3 Analýza dát.....	26
2.3.1 Fenologická izolácia.....	26
2.3.2 Správanie opelovačov.....	26
2.3.3 Produkcia nektáru.....	30
2.3.4 Veľkosť peľových zrn a ich množstvo.....	30
2.3.5 Zložky reprodukčnej izolácie.....	31
3 Výsledky.....	32
3.1 Reprodukčné bariéry.....	32
3.1.1 Analýza semien a semenáčikov zo zmiešanej populácie.....	32

3.1.2	Fenologická izolácia.....	34
3.1.3	Priestorová izolácia.....	34
3.1.4	Správanie opelovačov .....	34
3.1.5	Produkcia nektáru.....	38
3.1.6	Veľkosť peľových zrn a ich množstvo .....	39
3.1.7	Umelé kríženie .....	40
3.1.8	Zložky reprodukčnej izolácie .....	41
4	Diskusia .....	42
5	Záver.....	48
6	Použitá literatúra.....	49

## **Zoznam použitých skratiek**

ANOVA – analýza rozptylu (z angl. Analysis of Variance)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)

GLM – zovšeobecnený lineárny model (z angl. general linear model)

UV – ultrafialové (z angl. ultraviolet)



# 1 Úvod

## 1.1 Reprodukčné bariéry a ich význam

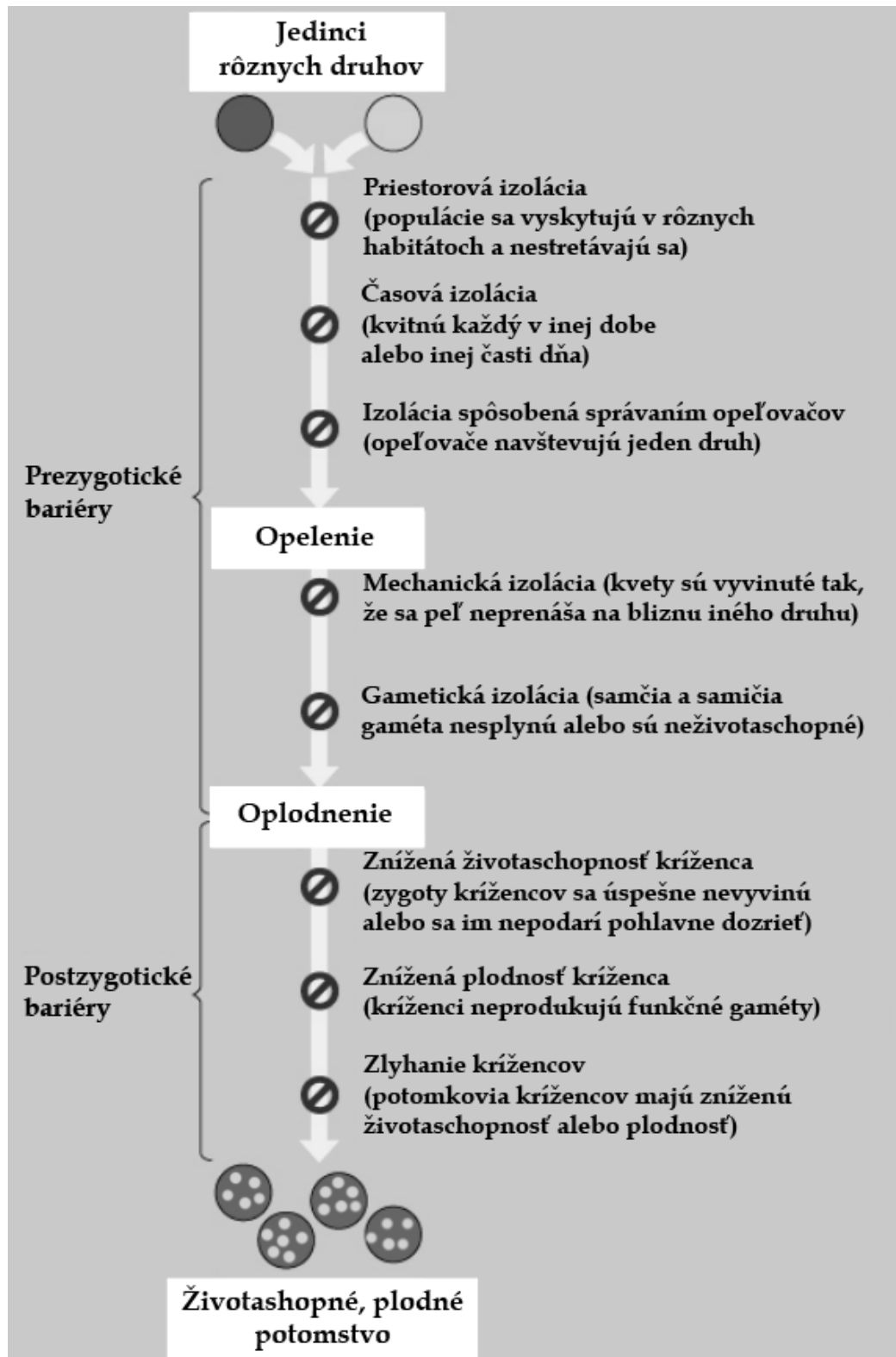
Reprodukčné bariéry sú súbor mechanizmov a fyziologických procesov, ktoré bránia jedincom rôznych druhov vo vzájomnom krížení, produkcii potomkov alebo aspoň zabezpečujú, že je potomok neplodný. Tieto bariéry udržujú integritu druhu v čase redukciou alebo priamym bránením toku génov medzi jedincami rôznych druhov. Tým sa zachovávajú vlastnosti daného druhu. Reprodukčné bariéry môžu byť prezygotické a postzygotické (Coyne & Orr 2004, Rieseberg & Willis 2007). Prezygotické bariéry (rozdelenie reprodukčných bariér je na obr. 1, prezygotické sú pred oplodnením) sú pre organizmus výhodnejšie, pretože sa zbytočne neplytvá gamétami. Do tejto skupiny patrí časová a priestorová izolovanosť (rozdielna doba kvitnutia, rôzne stanovište), správanie opeľovačov, mechanická izolácia, či izolácia konkurenčných gamét. Medzi postzygotické bariéry patrí neživotaschopnosť zygoty, príp. hybrida a sterilita hybrida (Coyne & Orr 1998). Reprodukčné bariéry sú tradične medzidruhový problém, v poslednej dobe sa však objavuje veľa štúdií polyploidov, ktoré sa nimi zaoberajú tiež. Bariéry v krížení medzi cytotypmi jedného druhu môžu pomôcť novovzniknutému polyploidovi udržať sa v populácii a vyhnúť sa tzv. minority cytotype exclusion (vylúčeniu menšinového cytotypu) (Baack 2005). Ďalšou výhodou existencie bariér je neplytvanie gamét na medzicytotypové krížence, ktoré sú často neživotaschopné alebo aspoň neplodné. Tieto bariéry môžu byť rovnaké ako bariéry medzi druhmi.

Najúčinnejšou reprodukčnou bariérou je priestorová izolovanosť jednotlivých cytotypov. V prírode však dochádza ku vzniku tzv. hybridných zón, t.j. miest, kde sa rôzne cytotypy môžu krížiť (Barton & Hewitt 1985, 1989, Harrison 1993). Poznáme dva typy takýchto zón (Mayr, 1942, 1963, Harrison, 1990), jednak primárne, v mieste vzniku polyploida z diploida, kde sa prirodzene nachádzajú obidve ploidie. Druhým typom je sekundárna hybridná zóna, ktorá vzniká na mieste, kde sa pôvodne vyskytovala iba jedna ploidia a jedince druhej na toto miesto domigrovali. Sekundárne hybridné zóny sú častejšie (Pettengill & Moeller 2012). Sonnleintner *et al.* (2010) skúmali rozšírenie diploidného, tetraploidného a hexaploidného cytotypu druhu *Senecio carniolicus* a zistili, že závisí od zemepisnej šírky a tiež, že jednotlivé cytotypy majú rozdielne

nároky na stanovište. Areály výskytu týchto cytotypov sa prekrývali na rozsiahlych kontaktných zónach a v zmiešaných populáciách vznikali aj jedince ďalších úrovni ploidie (3x, 5x, 7x, 8x a 9x). Naopak, v štúdií Castro *et al.* (2012) ukazujú, že diploidno-hexaploidný komplex *Aster amellus* má síce rozsiahlu kontaktnú zónu, ale ak medzicytotypové krížence vznikajú len na diploidných materských rastlinách, a tak znižujú reprodukčný úspech tejto ploidie. Husband a Shemske (1998) skúmali cytotypové zloženie populácií v úzkej kontaktnej zóne diploidného a tetraploidného cytotypu druhu *Chamerion angustifolium*. V každej populácii bol jeden cytotyp dominantný, jedna bola uniformná. Vyslovili záver, že táto kontaktná zóna je skôr mozaikovitá ako prelínajúca sa postupne. Stuessy *et al.* (2004) zistili, že kontaktné zóny diploidného a tetraploidného cytotypu druhov *Melampodium cinereum* a *M. leucanthum* sú veľmi úzke, areál výskytu diploidného cytotypu je západnejšie ako tetraploidného. Táto kontaktná zóna je pravdepodobne primárna.

Práve na týchto miestach – hybridných zónach – má zmysel skúmať nielen ostatné reprodukčné bariéry (Hu & Yeh 2014), ale aj evolúciu nových druhov (Hewitt 2011).

Jednou z najdôležitejších prezygotických bariér medzi rôznymi cytotypmi je doba kvitnutia (Jersáková *et al.* 2010, Castro *et al.* 2011, Husband & Shemske 2000, Segreaves & Thompson 1999). Fenológia sa najčastejšie skúma na vzorke 100 jedincov, prípadne pozorovaním celej populácie. V intervale 3 až 15 dní najčastejšie počas celej vegetačnej sezóny sa sleduje počet otvorených kvetov, príp. dátum, kedy začne rastlina kvitnúť a doba kvitnutia. Fenologický prekryv rôznych cytotypov bol v prípade *Aster amellus* a *Gymnadenia conopsea* s.l. veľký (Castro *et al.* 2011, Jersáková *et al.* 2010), v prípade *Chamerion angustifolium* 50% (Husband & Shemske 2000). Zaujímavý je výsledok štúdie na *Heuchera grossulariifolia*, ktorá má diploidný a tetraploidný cytotyp. Dĺžka kvitnutia sa nelíšila, ale doba kvitnutia sa nikdy úplne neprekrývala. Prekvapivé je, že v záhradných podmienkach začal kvitnúť diploid o 5 dní skôr, zatiaľčo na lokalite Salmon River kvitli o 8 dní skôr tetraploidy (Segreaves & Thompson 1999). Kvitnutie diploidov a tetraploidov druhu *Libidibia ferrea* bolo asynchrónne v rámci aj medzi cytotypmi. Na lokalite, kde sa vyskytovali oba cytotypy, kvitlo len niekoľko tetraploidných jedincov v čase, keď aj diploidy (Borges *et al.* 2012). Diploidy a tetraploidy *Arrhenatherum elatius* sa významne líšili v dobe počiatku kvitnutia (Petit *et al.* 1997). Všetky okrem 2 tetraploidných genotypov prestali kvitnúť skôr ako



Obr. 1 Rozdelenie reprodukčných bariér (upravené, podľa web 3)

začali kvitnúť prvé diploidy. Trvanie kvitnutia bolo signifikantne dlhšie u tetraploidov. Z globálneho hľadiska sa z týchto štúdií nedá odvodiť, že by tetraploidy alebo diploidy kvitli skôr, je to individuálne u rôznych druhov, dokonca aj u jedného

druhu boli pozorované iné výsledky v prírode ako v umelo vytvorených podmienkach (Segraves & Thompson 1999).

Ďalšou bariérou v krížení môžu byť rozdiely v morfológii kvetov (Jersáková *et al.* 2010, Segraves & Thompson 1999, Husband & Shemshke 2000). Jediný morfológický znak – dĺžku ostrohy merali u cytotypov *Gymnadenia conopsea* s.l. (Jersáková *et al.* 2010). Naproti tomu Segraves & Thompson (1999) merali 9 rôznych vzdialeností, ktoré komplexne charakterizujú morfológiu kvetu *Heuchera grossulariifolia*. Husband & Shemshke (2000) merali štyri charakteristiky druhu *Chamerion angustifolium*. Vo všetkých spomenutých štúdiách boli signifikantné rozdiely medzi diploidmi a polyploidmi. Morfológia kvetov diploidov a tetraploidov *Libidibia ferrea* je podobná, ale sú medzi nimi signifikantné rozdiely (Borges *et al.* 2012). Tetraploidy majú vo všeobecnosti vyššie hodnoty meraných charakteristík.

Ďalšou bariérou v krížení súvisiacou s morfológiou kvetu môže byť sila potrebná k jeho otvoreniu nejakým silovým mechanizmom. Nenašla som štúdiu, ktorá by sa touto tematikou zaoberala v rámci cytotypov jedného druhu. Zaujímavou štúdiou týchto mechanizmov je porovnávacia štúdia na *Fabaceae*. Koruna tejto čeľade pozostáva zo striešky, dvoch krídel a člku, ktorý vznikol zrastením dvoch korunných lupienkov, reprodukčné orgány sú kryté člkom (Córdoba & Cocucci 2011). Opeľovač sa dostane k odmene tak, že odtlačí bočné a spodné korunné lupienky, ktoré sú pohyblivé, smerom nadol. Tak sa odkryjú reprodukčné orgány aj odmena a dostanú sa do kontaktu so spodnou stranou opeľovača. U viacerých druhov z čeľade *Fabaceae* Córdoba & Cocucci (2011) skúmali silu potrebnú k otvoreniu ich kvetov a hľadali súvislosť so silou, ktorú opeľovači dokážu vyvinúť. Pomocou prístroja, ktorý si zhotovili, odmerali silu potrebnú, aby sa hmyz dostal k reprodukčným orgánom. Potom naskenovali korunné lupienky a u každého merali 4 znaky: dĺžku a šírku lupienku a šírku nechtu (zúžená časť pri báze lupienku) pri báze a uprostred. Ďalej zmerali hmotnosť a silu opeľovačov, ktorí boli pozorovaní pri opeľovaní. Pozorovali, že opeľovači (okrem jedného druhu) boli schopní vyvinúť oveľa väčšiu silu ako bolo potrebné, aby sa dostali k odmene. Boli nájdené silné korelácie medzi jednotlivými morfometrickými znakmi a medzi morfometrickými znakmi a potrebnou silou na otvorenie kvetu. Obzvlášť silné boli korelácie medzi znakmi krídel a člku, ktoré sa najviac podieľajú na otváracom mechanizme kvetu.

Ďalším rozdielom medzi cytotypmi potenciálne fungujúcim ako prezygotická bariéra môže byť množstvo a kvalita nektáru. Nektár je spolu s peľom najdôležitejšia

odmena, ktorú krytosemenné rastliny ponúkajú opelovačom, aby zaplatili za ich služby (Simpson & Neff, 1983). Jeho zloženie a množstvo môže ovplyvniť atraktivitu kvetov pre opelovačov. Davis *et al.* (1996) skúmali nektár allotetraploidnej *Brassica napus* a *B. rapa*, ktorá má 3 úrovne ploidie: haploidnú, diploidnú a tetraploidnú. Zmerali množstvo nektáru u všetkých ploidii. U *B. rapa* množstvo nektáru záviselo od úrovne ploidie: najviac nektáru produkovali nektáriá kvetov tetraploidov, najmenej haploidov. Davis *et al.* (1994) skúmali zloženie nektáru vyššie uvedených druhov. Nektár je tvorený prevažne glukózou a fruktózou, ich obsah však nie je závislý na ploidii. Rozdiely v množstve nektáru medzi cytotypmi jedného druhu by mohli mať význam ako reprodukčná bariéra. Napríklad kvety s väčším množstvom nektáru (pravdepodobne kvety polyploidov) by mohli lákať väčších opelovačov alebo by mohli byť pre opelovačov atraktívnejšie a mohli by ich navštevovať častejšie ako diploidné kvety.

Peľ ako odmena pre opelovače môže mať tiež vplyv na ich správanie. Viacero štúdií ukazuje, že polyploidy majú väčšie bunky ako diploidy (Segraves & Thompson 1999, Stebbins 1950, Stebbins 1971). U rastlín sa veľkosti dvoch neredukčne sa deliacich typov buniek, obličkovej bunky prieduchu a peľových zrn (Nagl 1978), bežne používa na určenie úrovne ploidie blízko príbuzných diploidných a polyploidných druhov. Butterfass (1987) vo svojej review uvádza, že veľkosť peľových zrn u tetraploidov je priemerne 1,49 až 2,11-krát väčšia ako u ich diploidných príbuzných. Výnimočne sa veľkosť peľových zrn u diploidov a polyploidov môže prekrývať, čo sťažuje presné odhadnutie úrovne ploidie v niektorých prípadoch (napr. Lewis 1980, Small 1983, Butterfass 1987, Brochmann, 1992, Tate & Simpson 2004). Tate & Simpson (2004) sa domnievajú, že menší peľ u tetraploidov rodu *Tarasa* (*Malvaceae*) sa dá vysvetliť zmenou životnej formy z trvaliek u diploidov na jednoročné rastliny u tetraploidov a zmenou spôsobu opelovania z xenogamie u diploidov na autogamiu u tetraploidov. Ak by veľkosť peľových zrn bola závislá od ploidie aj u skúmaného druhu a zároveň by ich bol na tyčinkách rovnaký počet alebo by sa ich tvorilo viac (bez ohľadu na zmenu veľkosti), boli by tetraploidy teoreticky atraktívnejšie pre opelovačov. Peľ je primárne zložka rozmnožovacieho systému, odmena je jeho sekundárna funkcia. Jeho zloženie preto nie je, na rozdiel od nektáru, ktorého primárnou funkciou je nasýtiť opelovače, priamo korelované s potrebami opelovačov.

Veľmi účinnou prezygotickou bariérou medzi cytotypmi môže byť správanie opelovačov. Opelovače môžu preferovať jeden z cytotypov, ktorý je pre nich

atraktívnejší buď vzhľadom (veľkosťou a sfarbením kvetu), buď vôňou alebo odmenou (množstvo a kvalita nektáru). Odmena sama osebe však nestačí, pretože bez vizuálneho alebo čuchového signálu nemá opelovač šancu jedinca rôznych ploidií rozlíšiť. Na druhej strane aj polyploidné druhy sa môžu špecializovať na iný druh opelovača ako materský diploid. Opelovači sú pri skúmaní tejto bariéry vždy pozorovaní v období kvitnutia oboch cytotypov v tú časť dňa, kedy kvety navštevuje najviac opelovačov. Zaznamenáva sa druh opelovača, počet navštívených kvetov na rastline a poradie cytotypov, ktoré daný jedinec navštívil. Správanie opelovačov *Aster amellus* sa významne líšilo medzi cytotypmi aj medzi študovanými populáciami. Viac variability ako cytotyp však vysvetlili populácie. V prítomnosti oboch cytotypov nebola pozorovaná preferencia opelovačov k jednému z cytotypov (Castro *et al.* 2011). V štúdiu Husband & Shemshke (2000) boli kvety tetraploidov navštevované častejšie ako keby sa hmyz správal náhodne. Prelietavanie z kvetu na kvet medzi kvetmi rovnakej ploidiie bolo častejšie ako sa predpokladalo podľa modelu náhodného správania. Podľa výsledkov štúdie (Segraves & Thompson 1999) sa návštevnosť kvetov medzi ploidiami *Heuchera grossulariifolia* nelíšila. Obidva cytotypy boli priemerne navštívené 1,3-krát za dobu pozorovania. Kombinácia opelovačov, ktoré navštívili danú rastlinu sa však medzi cytotypmi významne líšila. Jedinca druhu *Heuchera grossulariifolia* boli navštevované 15 druhmi alebo skupinami hmyzu, z toho 6 navštevovalo jednu z ploidií častejšie ako druhú. Príkladom opelovača, ktorý preferoval jednu z ploidií, je rod *Lasioglossum*, ktorý predstavoval štvrtinu návštev diploidov, ale iba desatinu návštev tetraploidov. Naopak, *Bombyllius major* navštevoval 6,4-krát častejšie kvety tetraploidov ako diploidov. Ako efektívnych opelovačov tetraploidov aj diploidov druhu *Libidibia ferrea* označili Borges *et al.* (2012) tri druhy včiel. Ďalšie dva druhy včiel boli zaradené do kategórie príležitostných opelovačov. Jeden druh včely sa niekedy správal ako príležitostný opelovač, inokedy ako zlodej nektáru. Kolibriky, ktoré tiež občas navštevovali väčšie kvety tetraploidov, sa správali ako príležitostní opelovači.

Súhrn všetkých bariér môžem zistiť sledovaním semien na rastlinách v zmiešaných populáciách. Analýzou ploidiie semien alebo naklíčených semenáčikov za predpokladu, že rastliny sú opelené umelo (bariéry typu rôzna doba kvitnutia, priestorová segregácia, preferencie opelovačov sú eliminované) môžeme získať informácie o postzygotických bariérach medzi cytotypmi. Preto niektoré štúdie

skúmajú aj semená z prirodzene opelovaných zmiešaných populácií aj umelo opelujú (Castro *et al.* 2011, Borges *et al.* 2012).

Najskôr sa pozrieme na to, ako sa študuje opelovanie v prirodzených podmienkach. Castro *et al.* (2011) využili k zisteniu schopnosti vzájomného kríženia medzi cytotypmi umelú zmiešanú populáciu. Rastliny nechali opelovať miestnym hmyzom (opelovanie hmyzom – preferencie opelovačov nie sú eliminované, pokus skúma aj prezygotické bariéry), ktorý bol viac-menej rovnaký ako na pôvodných lokalitách. Rovnako ako Husband a Shemshke (2000) zmerali časť semien študovaných rastlín na cytometri a zvyšok použili na klíčiaci pokus, aby následne zistili ploidiu semenáčikov. Z výsledkov štúdie (Castro *et al.* 2011) je prekvapivé, že hexaploidné matky mali vysoké percento aneuploidných semien (medzi penta- a hexaploidmi). Diploidy mali väčšinu potomkov diploidných. Husband a Shemshke (2000) dokázali zo zozbieraných dát zistiť závislosť produkcie semien na dobe kvitnutia. Produkcia semien diploidných rastlín bola významne vyššia u tých, ktoré kvitli len s inými diploidmi. Naopak, produkcia semien tetraploidov bola výrazne vyššia u tých ktoré kvitli spolu s diploidmi. Tento fakt by mohol súvisieť s tým, že v čase, keď kvitnú oba cytotypy, uprednostňujú opelovači tetraploidné rastliny.

Alternatívny prístup použili Borges *et al.* (2012), ktorí skúmali systém rozmnožovania študovaného druhu pomocou kontrolovaných opelovacích pokusov. Vybrané kvety boli buď ručne samoopelené, opelené peľom z iného jedinca rovnakej ploidiie alebo opelené peľom jedinca inej ploidiie. Pre porovnanie boli pozorované aj kvety opelované prirodzene. Podľa výsledkov štúdie Borges *et al.* (2012) netvorili diploidné jedince *Libidibia ferrea* plody po samoopelení, ale plodili dosť úspešne po opelení inými jedincami rovnakej ploidiie. Tetraploidné jedince tvorili malé množstvo plodov po samoopelení a podobné množstvo po opelení iným jedincom rovnakej ploidiie. Po krížení rastlín s rôznou ploidiou nevznikli žiadne semená. Diploidy aj tetraploidy tvorili prirodzene málo plodov. Následne bola vypočítaná úspešnosť reprodukcie ako pomer percent plodov vyprodukovaných prirodzenou cestou a tých, ktoré vzišli z opelovacích pokusov. Vzhľadom na rozdiely v produkcii plodov po opelovacích pokusoch sa úspešnosť reprodukcie cytotypov výrazne líšila. Tiež porovnali počet semien v plode. Diploidy tvorili viac semien na plod ako tetraploidy.

Porovnanie všetkých reprodukčných bariér u *Aster amellus* ukázalo, že najvýznamnejšie sú bariéry po opelení (izolácia gamét, nízka životnosť hexaploidných

semien a/alebo neschopnosť tetraploidných rastlín dokončiť životný cyklus) a druhým najvýznamnejším faktorom je priestorová segregácia (Castro *et al.* 2011). U *Gymnadenia conopsea* nebola okrem čiastočnej bariéry vyplývajúcej z fenológie kvitnutia nájdená ďalšia prekážka v krížení cytotypov. Z toho vyplýva, že u tohto druhu budú tiež prevládať postzygotické bariéry (Jersáková *et al.* 2010). U *Chamerion angustifolium* mali podľa Husband & Shemshke (2000) signifikantný vplyv na prezygotické bariéry v zmiešaných populáciách fenológia kvitnutia a správanie opelovačov. Veľmi zaujímavý pohľad na reprodukčné bariéry medzi ploidiami tohto taxónu ponúka review autorov Husband & Sabara (2003), ktorí reprodukčné bariéry rozdelili na viacero zložiek: geografická izolovanosť, rôzna doba kvitnutia, vernosť opelovačov, selekcia gamét a postzygotické bariéry; následne každú zložku vyjadrili pomocou koeficientu a výslednú úroveň reprodukčných bariér medzi ploidiami *Chamerion angustifolium* vyjadrili ako kombináciu týchto zložiek. Táto výsledná úroveň bola vysoká, k čomu najviac relatívne prispela priestorová izolovanosť a vernosť opelovačov.

Vyššie sa ukázalo, že reprodukčné bariéry sú zaujímavou témou. Preskúmaná je však len na niekoľko málo systémoch, aj to sa nie vždy skúmali všetky typy bariér, preto som sa rozhodla tiež zaoberať touto problematikou a ako modelový systém som si zvolila diploidno-tetraploidný komplex druhu *Vicia cracca*, pretože chcem nadviazať na prácu Eliášovej (2008), ktorá podrobne preskúmala areály rozšírenia jednotlivých cytotypov aj morfológické rozdiely v stavbe kvetu a tieto poznatky sú užitočné pri ďalšom skúmaní reprodukčných bariér.

## 1.2 Ciele práce

Cieľom tejto práce je pomocou štúdia reprodukčných bariér popísať najvýznamnejšie z nich medzi diploidnými a tetraploidnými jedincami *Vicia cracca*. Konkrétne by som rada zodpovedala nasledujúce otázky:

- (1) Je rozdiel v dobe kvitnutia oboch cytotypov?
- (2) Sú nejaké morfológické rozdiely medzi kvetmi cytotypov? Ak áno, dokážu ich opelovači rozoznať?
- (3) Je rozdiel v dennej produkcii a zložení nektáru medzi diploidnými a tetraploidnými kvetmi?



(4) Tvorí tetraploidy väčšie peľové zrná? Je rozdiel v počte peľových zrn u rôznych cytotypov?

(5) Aká je frekvencia vzniku krížencov v potomstve rastlín zo zmiešaných porastov? Aký je význam postreprodukčných bariér medzi cytotypmi?

## 2 Metodika

### 2.1 Študovaný taxón

Rod *Vicia* sa vyskytuje v miernom pásme severnej pologule a v trópoch Južnej Ameriky. Najvyššia druhová diverzita je sústredená v stredomorí a na Kaukaze, centrum pôvodného rozšírenia však nie je známy (El-Shanshoury & Soliman 1996). O taxonomické rozčlenenie tohoto rodu sa pred 38 rokmi pokúsila Kupichová (1976). Podľa prítomnosti nektárií a veľkosti súkvetí ho rozdelila na dva podrody *Vicia* L. a *Vicilla* (Schur) Rouy. Druhy s nektáriami na spodnej strane palistov, väčšinou jednokvetými súkvetiami vždy kratšími ako protiľahlý list zaradila do podrodu *Vicia* a druhy bez nektárií, s viackvetými súkvetiami rovnako dlhými alebo presahujúcimi protiľahlý list zaradila do podrodu *Vicilla*. Podrod *Vicia* podľa jej členenia obsahoval 32 druhov v 5 sekciách, podrod *Vicilla* 101 druhov v 17 sekciách. V jej ponímaní je podrod *Vicilla* špecializovanejší (El-Shanshoury & Soliman 1996). Tento koncept je až na malé úpravy, ktoré navrhol Jaaska (2005), zachovaný dodnes, pre podrod *Vicilla* sa však používa názov *Cracca*. V tomto podrode sú obsiahnuté tri štvrtiny celkovej variability rodu. Rozšírenie podrodu *Cracca* je takmer zhodné s rozšírením rodu (Eliášová 2008). Sekcia *Cracca* je druhovo najpočetnejšia sekcia podrodu. Do tejto sekcie patrí aj agerérat *Vicia cracca* agg., ktorý je predmetom výskumu tejto diplomovej práce. Do tohoto agregátu radíme 5 druhov: diploidné *V. incana* ( $2n=12$ ) a *V. dalmatica* ( $2n=12$ ), tetraploidné *V. tenuifolia* ( $2n=24$ ) a *V. oreophila* ( $2n=28$ ) a druh *Vicia cracca* s. str., ktorý sa vyskytuje v troch cytotypoch: diploidnom ( $2n=14$ ), tetraploidnom ( $2n=28$ ) a vzácné triploidnom ( $2n=21$ ). *V. cracca* je plazivá trvalka. Je pôvodná v celej Eurázii, jej súčasné rozšírenie je ale oveľa rozsiahlejšie, keďže bola introdukovaná do Severnej Ameriky, Austrálie a na Nový Zéland.

*V. cracca* (obr. 2) je vytrvalá popínavá rastlina, ktorá dorastá až do výšky 2 m (web 1, Aarssen 1986). Často tvorí husté porasty. Jasne zelené listy sú perovito zložené z 8-12 párov čiarovitých až úzko podlhovastých lístkov s končistým vrcholom dlhých 5-10 mm a páru úponkov na konci každého listu. Listy sú približne 3-8 cm dlhé. Početné fialové alebo modré bilaterálne symetrické kvety sú relatívne malé (1,5 cm) a nahusto usporiadané v jednostrannom strapci. Kvet má stavbu typickú pre *Fabaceae*: jeden korunný lupienok v tvare striešky, dva postranné v tvare krídel a dva zrastené do člku.

Hoci sa v pokusoch Eliášovej (2008) ukázalo, že *V. cracca* je autokompatibilná, existuje mechanizmus vynucujúci kríženie. Tyčinky sa u čelade *Fabaceae* otvárajú pred otvorením kvetu a peľ je uložený na konci člnku okolo vrchnej časti čnelky (Endress 1994). Keď opelovač pristáva na člnku, ten sa posunie nadol, aby sa blizna a tyčinky obnažili. Peľ je potom vymetený zo špičky člnku ochlpenou špičkou čnelky. Peľ obklopujúci bliznu však nemôže klíčiť, kým otvorený kvet nie je navštívený opelovačom, pretože blizna je pokrytá membránou, ktorá sa naruší až procesom opelovania (Endress 1994).



Obr. 2 *V. cracca* (foto: autorka)

Plodom *V. cracca* je plochý 2-3 cm dlhý svetlohnedý struk s malým počtom guľatých tmavých semien, ktorý keď dozrie, praskne do dvoch skrútených polovic. Semená majú 2,5-3,5 mm. Druh sa vyskytuje na otvorených priestranstvách a pozdĺž ciest (web 1, Aarssen 1986).

Rozšírenie cytotypov *V. cracca* v Českej republike, v Nemecku, Rakúsku a na Slovensku skúmali Trávníček *et al.* (2010). Vo voľnej prírode môžeme bežne nájsť tetraploidy a diploidy. V západnej časti skúmaného územia dominujú tetraploidy, vo východnej diploidy. Prechodné územie medzi cytotypmi, na ktorom sa nachádzalo 7% sledovaných populácií, leží na hraniciach Českej a Slovenskej republiky. Rozšírenie cytotypov druhu sa za posledných 40 rokov výrazne nezmenilo. Jedinou zmenou, ktorá bola zaznamenaná, je vyhynutie diplodov v južných Čechách. Triploidný cytotyp je u druhu *Vicia cracca* veľmi vzácny, Eliášová (2008) našla len osem jedincov vo vzorke 6613 skúmaných jedincov zo štyroch krajín. Tento fenomén chcela vysvetliť, preto umelo páрила diploida s tetraploidom, triploidné semená však nevznikli. Z toho vyplýva, že kríženiu medzi cytotypmi bránia silné prezygotické alebo postzygotické bariéry.

## 2.2 Reprodukčné bariéry

### 2.2.1 Určovanie úrovne ploidie

Úroveň ploidie bola zisťovaná prietokovou cytometriou. Postupovala som podľa protokolu Galbraith *et al.* (1983) s použitím Ottových pufrov (Otto 1990). Jadrá som uvoľnila sekaním 3 semien alebo 0,5 cm<sup>2</sup> čerstvého listu *V. cracca* a 0,5 cm<sup>2</sup> listu *Pisum sativum* (referenčný štandard, 2C=8.76 pg, Greilhuber *et al.* 2007) žiletkou v Petriho miske v 0,5 ml Ottovho pufri I (0,1 M kyseliny octovej, 0,5% Tween 20). Potom som suspenziu prefiltrovala cez nylonové plátno s otvormi 42 µm a nafarbila roztokom obsahujúcim 1 ml Ottovho pufri II (0,4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 4 mg.ml<sup>-1</sup> DAPI a 2 mg.ml<sup>-1</sup> β-merkaptoetanolu. Po piatich minútach inkubácie boli vzorky analyzované v Ploidy analyser II (Partec GmbH, Münster, Germany) so zdrojom svetla HBO UV mercury arc lamp s excitačným žiarením v UV spektre. Fluorescencia minimálne 3000 jadier bola analyzovaná programom FloMax (v. 2.4d, Partec GmbH).

### 2.2.2 Fenologická izolácia

Pre sledovanie fenológie som sa inšpirovala metodikou v článku Jersákovej *et al.* (2010). Za účelom určenia miery prekryvu doby kvitnutia diploidného a tetraploidného

cytotypu som pozorovala jedince so známou ploidiou pestované v botanickej záhrade Prírodovedeckej fakulty Univerzity Karlovej v Prahe. Zaznamenávala som pre každú rastlinu počet súkvetí v štádiu pukov, kvitnúcich súkvetí a čerstvo odkvitnutých súkvetí. Rastliny som pozorovala od 14. júna 2013 do 2. augusta 2013 2-krát týždenne.



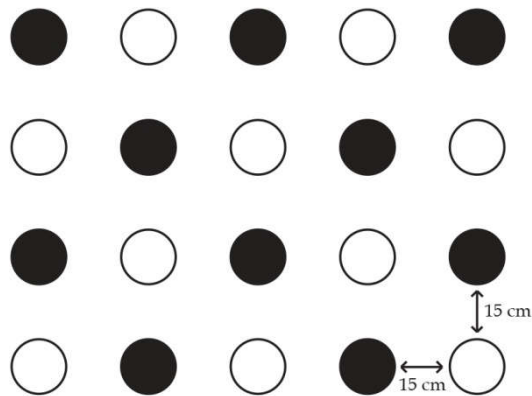
Obr. 3 Súmračník hrdzavý, *Ochlodes sylvanus* (foto: autorka)

### 2.2.3 Správanie opelovačov

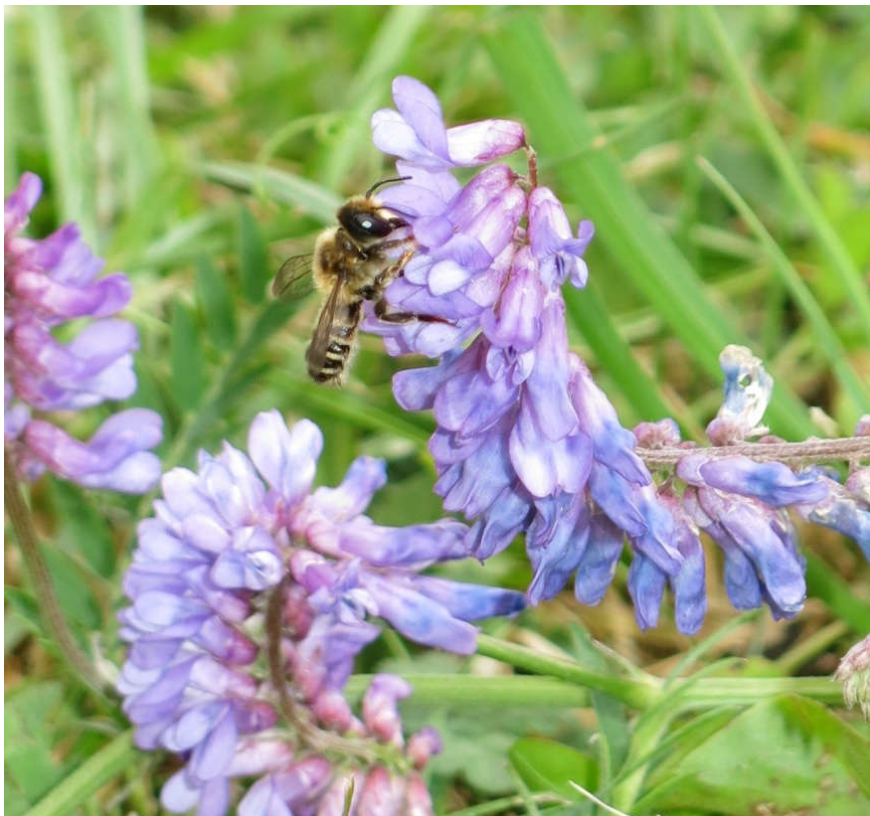
Opelovače boli pozorované vo vegetačných sezónach v rokoch 2013 a 2014 v Průhoniciach (Stredočeský kraj, Česká republika), kde sa prirodzene vyskytuje tetraploidný cytotyp a vo vegetačnej sezóne v roku 2014 na Budči (Banskobystrický kraj, Slovenská republika), kde sa prirodzene vyskytujú prevažne diploidy, v 6,5 km vzdialenom Trní bola nájdená aj lokalita so zmiešanou populáciou diploidov a tetraploidov (Eliášová 2008). V roku 2013 som náhodne rozmiestnila 10 diploidov a 14 tetraploidov, v roku 2014 boli kvetináče rozmiestnené podľa schémy znázornenej na obr. č. 4. V roku 2013 prebiehali pozorovania 5 dní v dopoludňajších hodinách v období medzi 28. 6. a 10. 7. Leto v roku 2013 bolo extrémne horúce a keďže som premiestňovala črepníky s pozorovanými vikami, ktorých korene boli vrastené do zeme pod črepníkom,



rastliny prišli o časť koreňov a už po prvom týždni začali vysychať. Preto boli pozorovania 10. 7. ukončené. Na Budči v roku 2014 boli opeľovače pozorované 21. 6. poobede a od 22. 6. do 25. 6. celé dni. V Průhoniciach v roku 2014 prebiehali pozorovania od 14. 7. do 17. 7. prevažne v doobedných hodinách, 15. 7. až do 13:30. Vždy bol zaznamenaný typ opeľovača, čas kedy priletel na prvý kvet, sekvencia rastlín, ktoré navštívil a ku každej navštívenej rastline počet opelených kvetov.



**Obr. 4 Schéma rozmiestnenia kvetináčov s jedincami *V. cracca* rôznej ploidie: prázdne koliesko, diploid; plné koliesko, tetraploid.**



**Obr. 5 Pieskárka, *Andrena* sp. (foto: autorka)**

## 2.2.4 Analýza semien zo zmiešanej populácie

Za účelom zistenia takmer celkovej miery reprodukčnej izolovanosti (okrem priestorovej) som analyzovala semená z umelej zmiešanej diploidno-tetraploidnej populácie *V. cracca*, ktorú založila Anežka Eliášová v Ostrave. Rastliny v tejto populácii boli vypestované zo semien, ktoré Eliášová zozbierala na lokalitách prirodzeného výskytu druhu. Rastliny pestované vo vegetačnej sezóne 2008 pochádzali z 21 lokalít, z ktorých bolo 9 diploidných, 8 tetraploidných a 3 zmiešané. Vo vegetačnej sezóne 2011 pochádzali rastliny z piatich zmiešaných populácií. Vybrala som 20 diploidných a 20 tetraploidných rastlín (zoznamy vybraných rastlín sú v tabuľkách č. 1 a 2) z každej z dvoch vegetačných sezón (2008 a 2011), desať semien každej z týchto rastlín som zmerala na cytometri a ďalších desať nechala naklíčiť v rastovej komore (cyklus 12 hod 7°C, 12 hod 20°C). Pred klíčením som semená asi 5 minút brúsila šmirgľovým papierom, aby som imitovala mechanické narušenie v prírode. Po šiestich týždňoch som zmerala ploidiu semenáčikov, ktoré vyklíčili. Ploidiu semien aj semenáčikov z vegetačnej sezóny 2008 som merala v Botanickom ústave v Průhoniciach 6. 2. 2012. Ploidiu semien z vegetačnej sezóny 2011 som merala na Univerzite v Innsbrucku v máji 2013 a ploidiu semenáčikov z tejto sezóny som určila v Průhoniciach 21. 6. 2013.

**Tabuľka 1** Kódy a ploidia materských rastlín zo zmiešanej populácie v Ostrave z vegetačnej sezóny 2008, prvé číslo v kóde rastliny označuje populáciu, z ktorej pochádza

kód rastliny	ploidia	kód rastliny	ploidia	kód rastliny	ploidia
10_4	2	301_8B	2	59_11	4
10_11	4	301_9A	2	59_13	4
10_12	2	301_9B	2	59_16	4
10_13	2	303_1	2	59_17	4
10_15	2	303_3	2	59_17B	4
10_17	2	303_5	2	59_18	4
10_25	2	34_4	2	59_19	4
10_27	2	34_6	2	59_6	4
10_28	2	34_7	2	59_9	4
10_6	2	36_3	4	88_4B	4
10_7	2	43_2	4	M2	4
15_1	4	45_1	4	M3	4
301_8A	2	46_1	4	M4	4
				M5	4

**Tabuľka 2 Kódy a ploidia materských rastlín zo zmiešanej populácie v Ostrave z vegetačnej sezóny 2011, prvé 3 písmená v kóde rastliny označuje populáciu, z ktorej pochádza**

kód rastliny	ploidia	kód rastliny	ploidia	kód rastliny	ploidia
Mach17Z	2	Mak4N	4	Svr31N	4
Mach22Z	2	Mak4Z	4	Svr43Z	4
Mach33Z	2	Rak19N	4	Svr44Z	4
Mach39Z	2	Rak19Z	4	Vys11Z	2
Mak14N	4	Rak23Z	2	Vys17Z	2
Mak14Z	4	Rak24Z	4	Vys1Z	2
Mak19Z	4	Rak26Z	4	Vys25Z	2
Mak25Z	2	Rak27Z	2	Vys33N	4
Mak27Z	2	Rak32N	2	Vys33Z	4
Mak29N	2	Rak32Z	2	Vys36N	4
Mak31Z	2	Rak7Z	2	Vys36Z	4
Mak33Z	2	Svr12Z	4	Vys37Z	4
Mak36Z	4	Svr19Z	4	Vys38Z	4
				Vys4Z	2

### 2.2.5 Produkcia nektáru

Kvety, ktorých produkciu nektáru som skúmala, som jeden deň zabalila do nylonového vrecúška a na druhý deň alebo na tretí deň v tom istom čase odobrala mikrokapilárnou pipetou nektár. Takto som zistila produkciu nektáru za deň (príp. dva dni). Produkciu nektáru som merala u diploidov a tetraploidov, na každej rastline vždy v troch kvetoch. 26. júna 2014 som merala 2-dňovú produkciu nektáru na dvoch diploidných a dvoch tetraploidných rastlinách a 1-dňovú na dvoch tetraploidných rastlinách. 5. júla 2014 som merala 1-dňovú produkciu nektáru na desiatich diploidných a siedmich tetraploidných rastlinách. Prípadný rozdiel v produkcii nektáru by mohol vysvetliť správanie opelovačov.

### 2.2.6 Veľkosť peľových zrn a ich množstvo

Zo štyroch diploidných a štyroch tetraploidných jedincov z rôznych populácií som odobrala po jednom súkvetí a našla na ňom pod lupou OLYMPUS S261 dva vhodné kvety, tj. také, ktorých peľnice ešte neboli rozpuknuté, ale už v nich bol vyvinutý peľ. Boli to puky tesne pred rozkvitnutím. Z týchto kvetov som odstránila korunné lupienky a z každého kvetu som odobrala niekoľko peľníc (dve až päť) a tie som jednotlivo umiestnila na podložné sklíčka. Následne som pridala kvapku fuchsínu a nechala 10 minút pôsobiť. Keď boli peľové zrná nafarbené, položila som na preparát krycie sklíčko a roztláčila peľnicu poľukaním ihly. Na takto pripravených preparátoch som spočítala



peľové zrná pod mikroskopom OLYMPUS BX 53 pri 200-násobnom zväčšení. Podobne som pripravila preparáty na meranie veľkosti peľových zŕn, použila som však kvitnúce kvety, v ktorých je peľ už zrelý a má teda maximálnu veľkosť. Pri príprave jedného sklíčka som použila viac peľníc z jedného kvetu. U 15 peľových zŕn z každého kvetu som odmerala najmenší a najväčší priemer.

### 2.2.7 Umelé kríženie

Opelovala som diploidy a tetraploidy v rámci ploidií tak, že som krížila vždy rastliny z rôznych populácií a robila som aj medzicytotypové kríženie. Súkvetia sa v čase, keď sú ešte kvety v štádiu pukov, zabalia do nylonových vrecúšok, aby sa zabránilo prístupu opelovačov. V deň opelovania sa odstránili vrecúška zo súkvetí, ktoré mali byť vzájomne opelené a zo súkvetí sa odstránili všetky kvety okrem piatich práve kvitnúcich. Počet odstránených kvetov bol zaznamenaný. Z piatich kvetov bola kvôli lepšiemu prístupu k pohlavným častiam kvetu odstránená strieška (najväčší korunný lupienok). Potom bol na každý z dvoch štetcov nabratý peľ z prvej dvojice kvetov a následne nanosený na bliznu druhého kvetu. To sa zopakovalo s ďalšími štyrmi dvojicami kvetov a štetcov. Opelené kvety boli znovu zabalené do nylonových vrecúšok až do doby, kým sa nevyvinuli plody. Umelé opelovanie som robila 12. a 13. júna 2014. Jednotlivé kríženia sú zaznamenané v tabuľke č. 3.

**Tabuľka 3 Umelé opelovanie rastliny 1 a rastliny 2, ploidiá 1 a 2- ploidiá rastliny 1 a 2, odstr. kv. 1 a 2- počet odstránených kvetov z opelovaného súkvetia nad (h) a pod (d) opelovanými kvetmi**

dátum	rastlina 1	ploidiá 1	odstr. kv. 1	rastlina 2	ploidiá 2	odstr. kv. 2
12. 6.	4VCN 2/2/3	4	11h+12d	2VC3/8/3	2	1h+12d
12. 6.	4VCN 2/2/3	4	11h+13d	2VC2/4/3	2	4h+22d
12. 6.	4VCN 2/2/3	4	32h+13d	4VCN1/6/3	4	9h+14d
12. 6.	2VC2/2/1	2	33h+17d	2VC4/1/3	2	11h+22d
12. 6.	2VC2/2/1	2	13h+16d	2VC5/7/1	2	26h+7d
12. 6.	2VC4/6/1	2	25h+21d	4VCN2/2/3	4	10h+19d
13. 6.	2VC3/8/2	2	62h	2VC2/4/3	2	8h+27d
13. 6.	2VC2/4/1	2	35h+2d	2VC4/4/1	2	12h+20d

## 2.3 Analýza dát

### 2.3.1 Fenologická izolácia

Podľa Husband & Schemske (2000) som vypočítala koeficient prekryvu kvitnutia cytotypov a graficky znázornila fenológiu cytotypov. Aby som graficky znázornila krivky kvitnutia, vyjadrila som počet kvitnúcich kvetov na cytotyp počas jedného pozorovania ako percento z maximálneho počtu kvitnúcich kvetov v jedno pozorovanie na cytotype. Koeficient prekryvu kvitnutia som spočítala tak, že som si najskôr pre každé pozorovanie a pre oba cytotypy vyjadrila počet kvitnúcich kvetov daného cytotypu ako percento zo všetkých kvetov tohto cytotypu kvitnúcich naprieč všetkými pozorovaniami. Potom som vzala pre každé pozorovanie hodnotu toho cytotypu, ktorý mal nižšie percento kvitnúcich kvetov a tieto hodnoty som sčítala. Tento koeficient, ktorý vyjadruje časť krivky kvitnutia, ktorá sa prekrýva, sa rovná nule, keď je kvitnutie úplne asynchrónne a jednotke, keď sa kvitnutie úplne prekrýva.

### 2.3.2 Správanie opelovačov

Jednotlivé pozorovania som pre lepšiu orientáciu označila "Prúhonice 1" (pozorovania v roku 2013), "Prúhonice 2" (pozorovania v roku 2014) a "Budča". Výsledky každého z týchto pozorovaní boli analyzované zvlášť. Prvou štatistickou analýzou som zisťovala, či sú opelovače verné plodii (či ak opelovali napr. diploida, preleteli potom znovu na diploida). Najskôr som pomocou kontingenčnej tabuľky v programe Microsoft Excel 2007 vypísala pre každé z 3 pozorovaní koľko bolo zaznamenaných preletov medzi jednotlivými plodiami. Potom som v programe Statistica (ver. 7) Yatesovým korigovaným Chi-kvadrát testom a Fisherovým presným jednostranným testom testovala hypotézu  $H_{01}$ : Opelovače si vyberajú kvety čo sa týka ploidie náhodne.

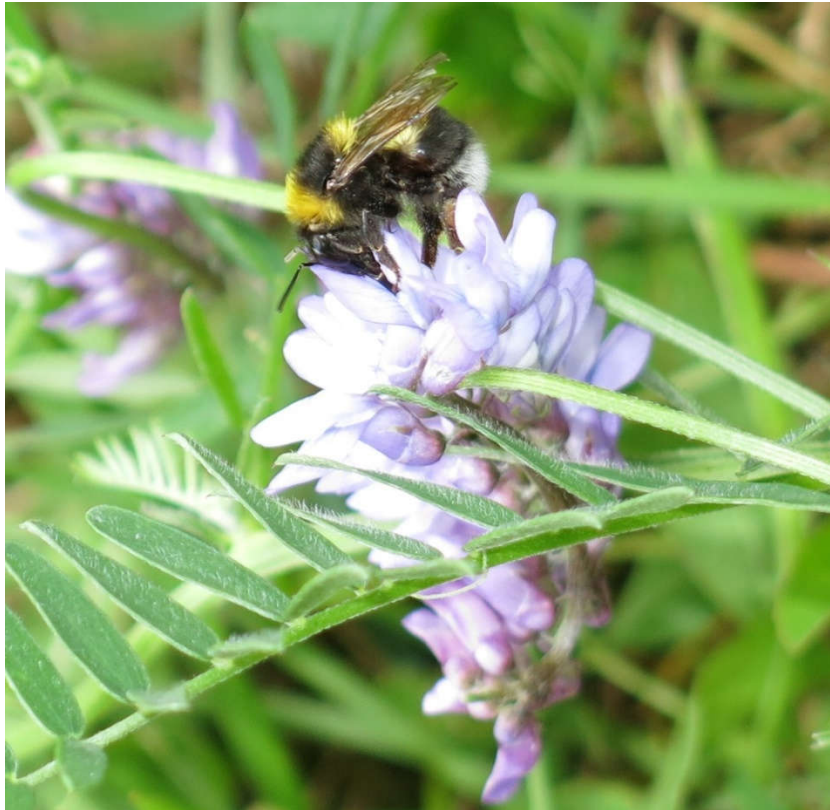


Obr. 6 Čmel *Bombus pascuorum* (foto: autorka)

Ďalším testom som zisťovala pre každé pozorovanie, či z niektorého cytotypu častejšie odletel opelovač preč z pozorovaného záhonu oproti náhodnému správaniu. Znovu som použila kontingenčnú tabuľku (Microsoft Excel 2007), do ktorej som vypísala počty letov z diploida na ďalšiu rastlinu, z diploida von zo záhonu a rovnako pre tetraploidov. Následne som Yatesovým korigovaným Chi-kvadrát testom testovala hypotézu  $H_{02}$ , že sa opelovače, čo sa týka preletov a odletov správali náhodne. Týmto testom môžem zistiť (ak by som hypotézu  $H_{02}$  zamietla), že niektorý cytotyp je atraktívnejší, a preto po jeho návšteve ostane opelovač na záhone so signifikantne väčšou pravdepodobnosťou ako keď navštívi druhý cytotyp.

Ďalšia zaujímavá otázka, je či sú diploidné alebo tetraploidné rastliny navštevované signifikantne častejšie a či je priemerný počet navštívených kvetov u jednej ploidy výrazne vyšší. Stanovila som si dve hypotézy  $H_{03}$ : Obidve ploidy sú navštevované rovnako často; a  $H_{04}$ : Priemerný počet navštívených kvetov pri jednej návšteve opelovača nie je závislý na ploidi. Pomocou kontingenčnej tabuľky (Microsoft Excel 2007) som si vypísala pre každú rastlinu v rámci každého z troch pozorovaní počet návštev a priemerný počet navštívených kvetov a potom som v programe R (ver. 3.1.1.) robila zobecnený lineárny model (GLM) oboch veličín v závislosti na ploidi. Pre počet

návštev som použila Poissonove rozdelenie a pre priemerný počet kvetov Gamma rozdelenie.



Obr. 7 Čmel' *Bombus lucorum* (foto: autorka)

Ďalšia otázka, na ktorú sa môžeme s takto zozbieranými dátami pýtať je, či jednotlivé druhy opelovačov preferujú niektorý z cytotypov *V. cracca*. Stanovila som si hypotézu  $H_0_5$ : Testovaný druh opelovača nemá žiadnu preferenciu voči ploidii. Do kontingenčnej tabuľky (Microsoft Excel 2007) som pre 2 pozorovania (Průhonice 2 a Budča) vypísala pre každý druh opelovača pozorovaný počet návštev diploidných a tetraploidných rastlín. Potom som si vypočítala očakávané hodnoty a Chí-kvadrát testom testovala pre každý druh opelovača hypotézu  $H_0_5$ .

Ďalšia otázka, ktorú sa na základe dát z pozorovania opelovačov pokúsim zodpovedať, je či niektorý druh opelovača preferuje jeden z cytotypov. Hypotéza  $H_0_6$  predpokladá, že každý opelovač si vyberá opelovanú rastlinu náhodne. Túto hypotézu som testovala na dátach z pozorovaní "Průhonice 2" a "Budča". Pomocou kontingenčnej tabuľky (Microsoft Excel 2007) som si vypísala pre každého opelovača počet návštev na diploidných a tetraploidných rastlinách. Potom som vypočítala očakávaný počet návštev a Chí-kvadrát testom testovala, či sa očakávané a pozorované hodnoty líšia.





Obr. 8 Čmeľ *Bombus humilis* (foto: autorka)

Dáta z lokality Budča som analyzovala aj podľa druhu opeľovača. Vybrala som troch najčastejších opeľovačov (*Bombus pascuorum*, *B. leucorum* a *Andrena* sp.) a testovala dve hypotézy: H0<sub>7</sub>: Proporcie preletov medzi ploidiemi ku všetkým preletom sú u všetkých druhov opeľovačov rovnaké. a H0<sub>8</sub>: Proporcia navštívených tetraploidných rastlín je u všetkých druhov opeľovačov rovnaká. Z dôvodu prevahy jedného druhu opeľovača sa na ostatných lokalitách nedali dáta spracovať týmto spôsobom. Skôr, ako som dáta testovala som upravila počet preletov medzi rôznymi ploidiemi z dôvodu nerovnakých vzdialeností k okolitým jedincom. Rastliny rovnakej ploidiie boli  $\sqrt{2}$ -krát ďalej (viď obr. 4), preto som počet preletov medzi rôznymi ploidiemi vydělila  $\sqrt{2}$ . Hypotézy som potom testovala v programe R (ver. 3.1.1.) Kruskal-Wallisovým chí kvadrát testom. Proporcie navštívených tetraploidných rastlín som testovala aj po dvojiciach (vždy dva opeľovače medzi sebou), aby som zistila, kde je variabilita.



Obr. 9 Modráčik čiernoškvorný, *Phengaris arion* (foto: autorka)

### 2.3.3 Produkcia nektáru

Výsledky meraní jednodňovej a dvojdňovej produkcie som analyzovala každé zvlášť. Podľa hypotézy  $H_0_9$  by sa produkcia (jednodňová aj dvojdňová) nektáru diploidov a tetraploidov nelíšila. Túto hypotézu som testovala v programe R (ver. 3.1.1.) pomocou zovšeobecného lineárneho modelu (GLM) oboch veličín v závislosti na ploidii. Použila som Gamma rozdelenie.

### 2.3.4 Veľkosť peľových zrn a ich množstvo

Veľkosť peľových zrn je charakterizovaná dvoma odmeranými veličinami (dĺžka a šírka, resp. najdlhší a najkratší priemer) a jednou vypočítanou – plošný obsah elipsy ( $S=ab\pi$ ). Hypotéza  $H_0_{10}$ , ktorú som testovala v programe R (ver. 3.1.1.) zovšeobecným lineárnym modelom, znie: Veličiny dĺžka, šírka a obsah peľového zrna nie sú závislé na ploidii. Použila som normálne rozdelenie. Hypotézu  $H_0_{11}$  (počet peľových zrn v jednej peľnici je nezávislý na ploidii) som tiež testovala v programe R (ver. 3.1.1.) zovšeobecným lineárnym modelom, použila som však Poissonovo rozdelenie.



Obr. 10 Mlynárik repový, *Pieris rapae* (foto: autorka)

### 2.3.5 Zložky reprodukčnej izolácie

Podľa Husband & Sabara (2003) som vypočítala koeficienty reprodukčnej izolácie:

- priestorovej  $RI_{\text{geogr}}=RI_1=1-\frac{\text{zmiešané}}{\text{všetky}}$ , kde *zmiešané* je počet zmiešaných diploidno-tetraploidných populácií a *všetky* je počet všetkých populácií;
- časovej  $RI_{\text{phen}}=RI_2=1-\frac{\text{spolu}}{\text{všetky}}$ , kde *spolu* je počet dní, kedy kvitli obidve ploidie a *všetky* je počet všetkých dní, kedy kvitli
- a zapríčinenej správaním opelovačov  $RI_{\text{pollinator}}=RI_3=1-\frac{\text{rôzne}}{\text{všetky}}$ , kde *rôzne* je upravený počet preletov medzi rôznymi ploidiemi, aby sa vyvážila nerovnomernosť rozmiestnenia v pokuse s pozorovaním opelovačov a *všetky* je počet všetkých preletov medzi rastlinami.

Podľa Ramsey *et al.* (2003) som vypočítala koeficient celkovej reprodukčnej izolácie  $RI_{\text{total}}=\sum_{i=1}^n A C_i$ , kde  $AC_n=RI_n(1-\sum_{i=1}^{n-1} AC_i)$ .



## 3 Výsledky

### 3.1 Reprodukčné bariéry

#### 3.1.1 Analýza semien a semenáčikov zo zmiešanej populácie

Výsledky analýz ploidiie sú uvedené v tabuľkách č. 4 a 5.

Tabuľka 4 Výsledky merania ploidiie semien zo zmiešanej populácie diploidnej a tetraploidnej *V. cracca* získané metódou prietokovej cytometrie

Ploidia materskej rastliny	Počet rastlín	Celkový počet skúmaných semien	Ploidia semien
Vegetačná sezóna 2009			
diploid	20	180	diploidy: 180
tetraploid	20	180	tetraploidy: 179 aneuploid: 1
Vegetačná sezóna 2011			
Diploid	20	200	diploidy: 200
Tetraploid	20	200	tetraploidy: 197 aneuploidy: 3

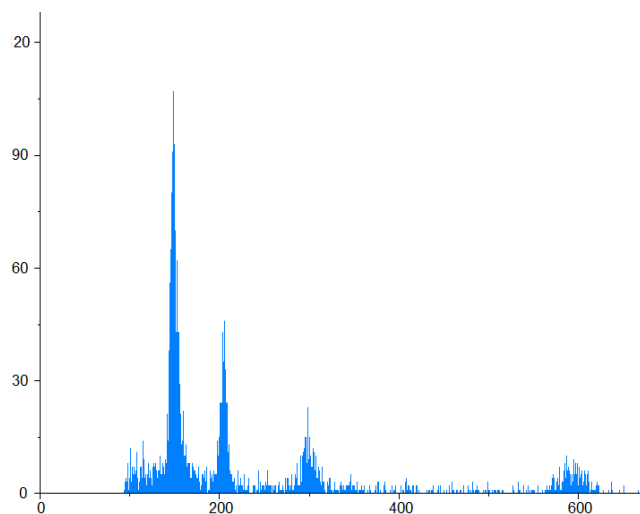
Tabuľka 5 Výsledky merania ploidiie semenáčikov zo zmiešanej populácie diploidnej a tetraploidnej *V. cracca* získané metódou prietokovej cytometrie

Ploidia materskej rastliny	Počet rastlín	Počet vyklíčených semenáčikov	Ploidia semenáčikov
Vegetačná sezóna 2009			
Diploid	20	145	diploidy: 145
tetraploid	16 *	74	tetraploidy: 72 aneuploidy: 2
Vegetačná sezóna 2011			
Diploid	20	107	diploidy: 99 tetraploidné: 8
Tetraploid	20	164	tetraploidy: 163 aneuploidy: 1

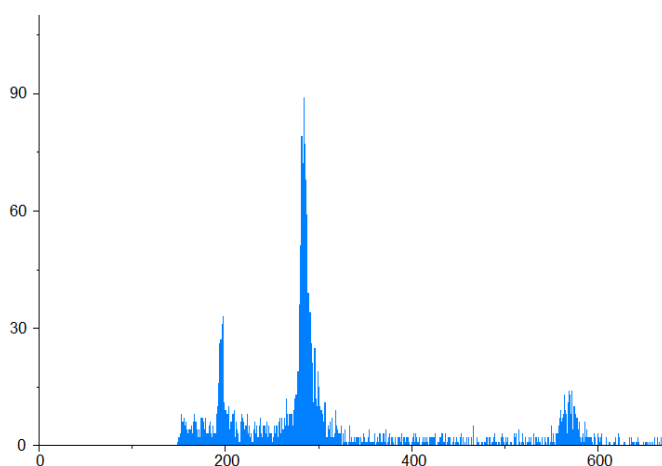
\*od 4 materských rastlín žiadne semeno nevyklíčilo



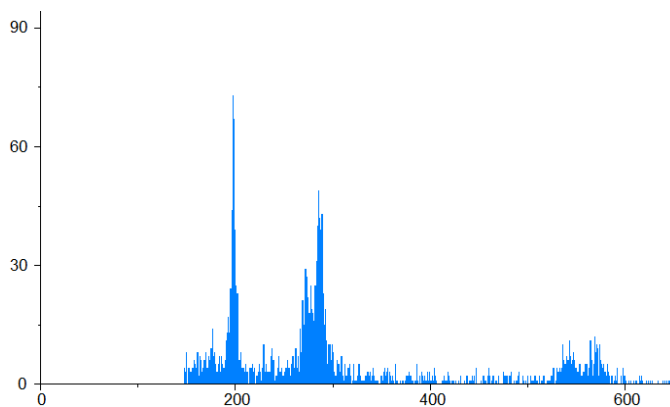
Na obrázkoch č. 11, 12 a 13 sú výstupné grafy z programu Flomax (ver. 2.4d) zobrazujúce diploida, tetraploida a aneuploida so štandardom *Pisum sativum* na hodnote 200.



**Obr. 11** Analýza semien diploidnej *V. cracca*



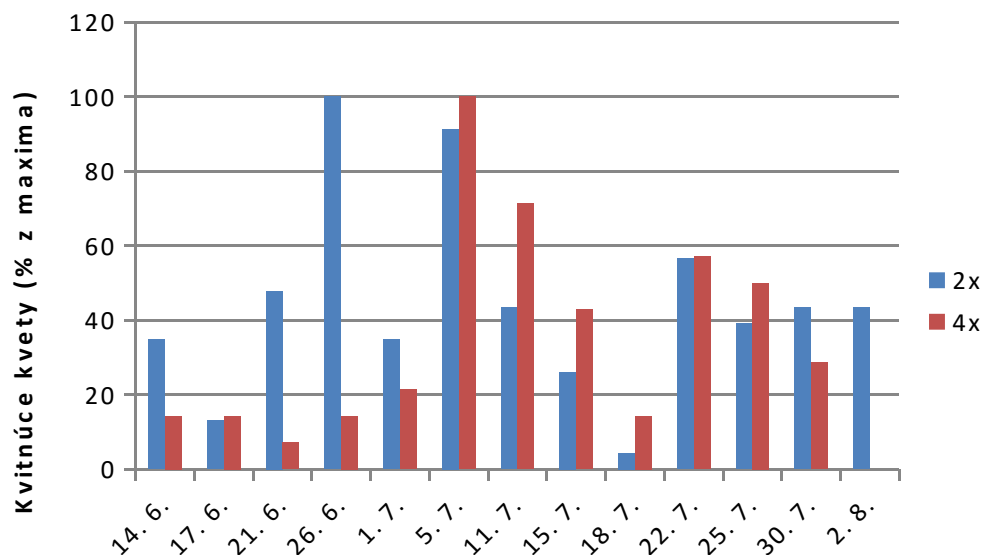
**Obr. 12** Analýza semien tetraploidnej *V. cracca*



**Obr. 13** Analýza semien tetraploidnej a aneuploidnej *V. cracca*

### 3.1.2 Fenologická izolácia

Koeficient prekryvu kvitnutia diploidov a tetraploidov je 64%. Fenológia je znázornená na grafe č. 1. Diploidy a tetraploidy začali kvitnúť spolu, ale maximum otvorených kvetov je u tetraploidov o 9 dní neskôr ako u diploidov. Diploidy kvitli o jedno pozorovanie dlhšie.



Graf 1 Fenológia kvitnutia diploidov (modré stĺpce) a tetraploidov (červené stĺpce) na základe pozorovaní zmiešanej populácie *Vicia cracca* dva krát týždenne v kontrolovaných záhradných podmienkach. Počet kvitnúcich kvetov každý pozorovaný deň je vyjadrený ako percentuálna časť z maximálneho počtu kvetov kvitnúcich pri jednom pozorovaní (pre diploidy to bolo 26. 6., pre tetraploidy 5. 7.).

### 3.1.3 Priestorová izolácia

Eliášová (2008) určila ploidiu celkovo u 6 613 rastlín z 261 populácií. 180 populácií (68,96 %) bolo tetraploidných a 61 populácií (23,37 %) bolo diploidných. 18 populácií (6,9 %) pozostávalo z jedincov oboch ploidii. V ďalších dvoch diploidných populáciách (0,77 %) bolo nájdených 8 triploidov. Koeficient priestorovej izolácie je podľa týchto dát  $RI_{\text{geogr}}=0,931$ .

### 3.1.4 Správanie opelovačov

Hypotézu  $H_{01}$ : Opelovače si vyberajú kvety čo sa týka ploidiu náhodne. zamietam na hladine významnosti  $p < 0.05$  v oboch pozorovaniach, ktoré prebehli v roku 2014 na základe výsledkov Yatesovho korigovaného Chí-kvadrát testu (viď tabuľka č. 8). V žiadnom prípade sa avšak nepodarilo potvrdiť alternatívnu hypotézu, tj. že opelovače preferenčne preletujú medzi rastlinami rovnakej ploidiu. Z kontingenčných tabuliek

(tabuľka č. 6 a 7) totiž vidíme, že v týchto dvoch prípadoch (Prúhonice 2 a Budča) signifikantne viac opelovačov prelietavalo medzi rastlinami rôznych ploidií ako v rámci ploidiie. Pre pozorovanie "Prúhonice 1" nebol ani jeden test signifikantný, čo znamená že som neobjavila žiadny "pattern", podľa ktorého si opelovače vyberajú cytotyp ďalšej navštívenej rastliny.

**Tabuľka 6 Kontingenčná tabuľka pre lokalitu Prúhonice 2 ukazuje výrazne vyšší počet preletov medzi ploidiami na vedľajšej diagonále ako v rámci ploidiie, v zátvorke sú uvedené počty preletov po korekcii vydelením číslom  $\sqrt{2}$  kvôli nerovnakej vzdialenosti medzi rastlinami rovnakej a rôznej ploidiie**

Selekcia cytotypov	Ploidia východzej rastliny		Celkový súčet
	Ploidia cieľovej rastliny		
	2x	4x	
2x	49	102 (72)	151 (121)
4x	94 (66)	58	152 (124)
Celkový súčet	143 (105)	160 (130)	303 (235)

**Tabuľka 7 Kontingenčná tabuľka pre lokalitu Budča ukazuje výrazne vyšší počet preletov medzi ploidiami na vedľajšej diagonále ako v rámci ploidiie, v zátvorke sú uvedené počty preletov po korekcii vydelením číslom  $\sqrt{2}$  kvôli nerovnakej vzdialenosti medzi rastlinami rovnakej a rôznej ploidiie**

Selekcia cytotypov	Ploidia východzej rastliny		Celkový súčet
	Ploidia cieľovej rastliny		
	2x	4x	
2x	127	288 (204)	415 (331)
4x	294 (208)	126	420 (334)
Celkový súčet	421 (335)	414 (330)	835 (665)

**Tabuľka 8 Výsledky testov selekcie cytotypov, hodnoty označené hviezdikami sú signifikantné**

Test Lokalita	Selekcia cytotypov	
	Yatesov kor. Chi-kvadrat	p hodnota
Prúhonice 1	0.62	0 .4304
Prúhonice 2	25.09	< <b>0.001</b> ***
Budča	128.04	< <b>0.001</b> ***

Na základe testovania odletov a preletov sa nedá povedať, že by bol niektorý cytotyp atraktívnejší pre opelovače tak, že by ich inšpiroval zostať na záhone namiesto

toho, aby odletel. Ani na jednej lokalite ani v jednej sezóne nebol použitý Yatesov korigovaný Chí-kvadrát test signifikantný (viď tabuľka č. 9).

**Tabuľka 9 Výsledky testov atraktivity cytotypu pre jednotlivé pozorovania**

Test Lokalita	Atraktivita cytotypu	
	Yatesov kor. Chi-kvadrat	p hodnota
Průhonice 1	0.13	0.7173
Průhonice 2	0.12	0.7297
Budča	2.51	0.1129

Hypotézy H0<sub>3</sub>: Obidve ploidie sú navštevované rovnako často. a H0<sub>4</sub>: Priemerný počet navštívených kvetov pri jednej návšteve opelovača nie je závislý na ploidi. nemožno zamietnuť ani pre jedno pozorovanie (viď tabuľka č. 10). Opelovače sa teda z celkového pohľadu nesprávali výrazne inak ako náhodne.

**Tabuľka 10 Výsledky ANOVY testujúcej vplyv ploidiu na počet návštev na rastline a na priemerný počet navštívených kvetov**

Pozorovanie	Testovaná veličina	Deviance	Resid. Df	p(chi)
Průhonice 1	počet návštev na rastline	3,063	21	0,08000
Průhonice 1	priemerný počet navštívených kvetov	0,3472	21	0,28440
Průhonice 2	počet návštev na rastline	1,942	16	0,16300
Průhonice 2	priemerný počet navštívených kvetov	0,08475	16	0,47053
Budča	počet návštev na rastline	0,13	19	0,72000
Budča	priemerný počet navštívených kvetov	0,0208	19	0,76730

**Tabuľka 11 Výsledky Chí-kvadrát testu testujúceho rozdiel v počte návštev rastlín medzi diploidnými a tetraploidnými rastlinami pre jednotlivých opelovačov na lokalite Budča (pozorovaný počet návštev diploidov - o<sub>2</sub> a tetraploidov - o<sub>4</sub>, očakávaný počet návštev diploidov- e<sub>2</sub> a tetraploidov- e<sub>4</sub>)**

Opelovač	o <sub>2</sub>	o <sub>4</sub>	e <sub>2</sub>	e <sub>4</sub>	p(chi)
<i>Bombus pascuorum</i> (obr. 7)	148	186	173.162916	160.83708	<b>0.005859**</b>
<i>B. lucorum</i> (obr. 8)	37	37	38.3654365	35.634563	0.750732
<i>B. humilis</i> (obr. 9)	7	8	7.77677768	7.2232223	0.688126
<i>Hymenoptera</i>	2	2	2.07380738	1.9261926	0.941124
<i>Phengaris arion</i> (obr. 10)	9	8	8.81368137	8.1863186	0.927938
<i>Ochlodes sylvanus</i> (obr. 3)	4	4	4.14761476	3.8523852	0.916812
<i>Pieris rapae</i> (obr. 11)	4	2	3.11071107	2.8892889	0.467473
<i>Andrena</i> sp. (obr. 5)	365	288	338.549055	314.45095	<b>0.038301*</b>

Signifikatne sa oproti očakávaným hodnotám líši správanie dvoch druhov na lokalite "Budča": čmeľa *Bombus pascuorum* a pieskárky *Andrena* (viď tab. 11). Čmeľ navštevuje častejšie tetraploidné rastliny a pieskárka diploidné. Na lokalite "Průhonice 2" sa správali jednotlivé druhy opelovačov náhodne (viď tab. 12).

**Tabuľka 12** Výsledky Chí-kvadrát testu testujúceho rozdiel v počte návštev rastlín medzi diploidnými a tetraploidnými rastlinami pre jednotlivých opelovačov na lokalite Průhonice 2 (pozorovaný počet návštev diploidov – o2 a tetraploidov – o4, očakávaný počet návštev diploidov- e2 a tetraploidov- e4)

Opelovač	e2	e4	o2	o4	p(chi)
<i>Lepidoptera 1.</i>	0	1	0.465347	0.534653	0.524506
<i>Hymenoptera 1</i>	0	1	0.465347	0.534653	0.524506
<i>Hymenoptera 2</i>	1	0	0.465347	0.534653	0.43318
<i>Bombus sp. 1</i>	164	185	162.4059	186.5941	0.864171
<i>Bombus sp. 2</i>	16	21	17.21782	19.78218	0.688139
<i>Bombus sp. 3</i>	2	2	1.861386	2.138614	0.889491
<i>Hymenoptera 3</i>	0	1	0.465347	0.534653	0.524506
<i>Lepidoptera 2</i>	1	1	0.930693	1.069307	0.921733
<i>Lepidoptera 3</i>	1	1	0.930693	1.069307	0.921733
<i>Lepidoptera 4</i>	1	0	0.465347	0.534653	0.43318
<i>Hymenoptera 4</i>	2	2	1.861386	2.138614	0.889491
<i>Hymenoptera 5</i>	0	1	0.465347	0.534653	0.524506

Hypotézu H0<sub>7</sub>: Proporcie preletov medzi ploidiemi ku všetkým preletom sú u všetkých druhov opelovačov rovnaké. sa nepodarilo zamietnuť (viď tabuľka č. 13). Hypotézu H0<sub>8</sub>: Proporcía navštívených tetraploidných rastlín je u všetkých druhov opelovačov rovnaká. som však Kruskal-Wallis chí kvadrát testom zamietla (viď tabuľka č. 14). Keďže sme porovnávali tri druhy opelovačov, testovala som túto hypotézu znovu pre každú dvojicu opelovačov a zamietla som ju pre dvojicu *Bombus pascuorum* a *Andrena* sp., čo znamená, že proporcía navštívených tetraploidných rastlín bola u týchto druhov signifikantne odlišná. Podľa predchádzajúcich výsledkov navštevoval čmeliak *B. pascuorum* prevažne tetraploidné jedince a *Andrena* sp. preferovala diploidné.

**Tabuľka 13** Výsledok Kruskal-Wallis chí-kvadrát testu testujúceho proporciu preletov medzi rovnakými ploidiemi ku všetkým preletom pre najčastejšie druhy opelovačov (*Bombus pascourum*, *B. lucorum* a *Andrena* sp.) na lokalite Budča

Proporcía preletov medzi rovnakými ploidiemi		
test	chí kvadrát	p hodnota
Kruskal Wallis chí kvadrát	0,1546	0,9256

Tabuľka 14 Výsledky Kruskal-Wallis chí-kvadrát testu testujúceho proporciu navštívených tetraploidných rastlín pre najčastejšie druhy opelovačov (*Bombus pascourum*, *B. lucorum* a *Andrena* sp.) na lokalite Budča, významné hodnoty sú označené hviezdikou

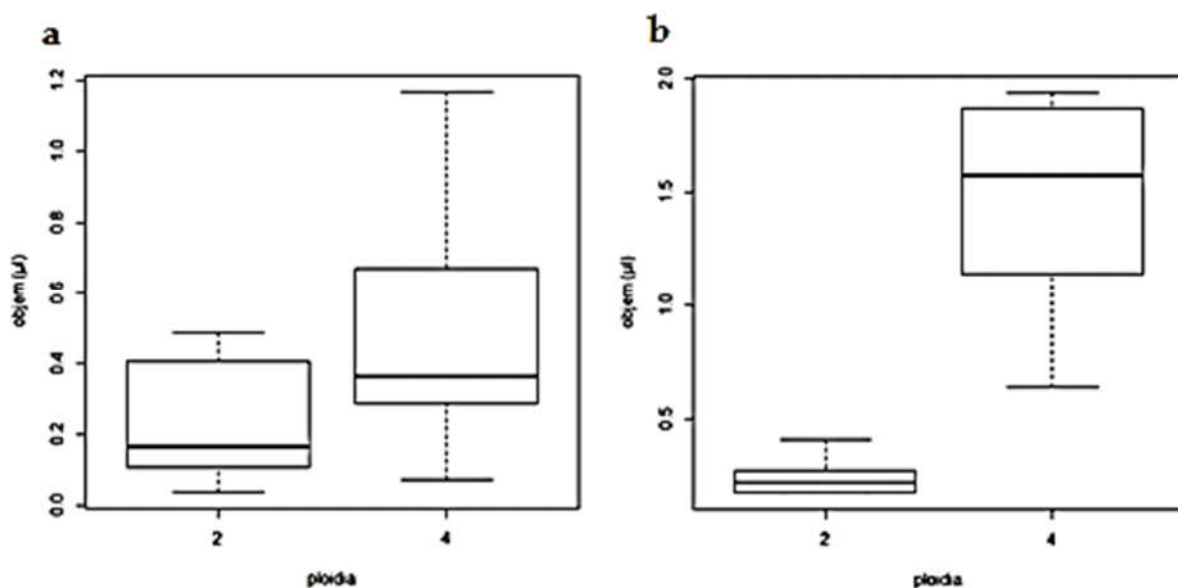
Proporcia navštívených tetraploidných rastlín		
dáta	chí kvadrát	p hodnota
všetky	17,8558	<0,001***
<i>B. pascuorum</i> a <i>B. lucorum</i>	2,0331	0,1539
<i>B. pascuorum</i> a <i>Andrena</i> sp.	17,4823	<0,001***
<i>B. lucorum</i> a <i>Andrena</i> sp.	1,9393	0,1637

### 3.1.5 Produkcia nektáru

Podľa výsledkov ANOVY sa jednodňová aj dvojdňová produkcia nektáru u diploidov a tetraploidov významne líši na hladine pravdepodobnosti  $p=0,001$  (viď tab. 15). Tetraploidy produkujú viac nektáru (obr. 14).

Tabuľka 15 Výsledky ANOVY testujúcej vplyv ploidie na 1-dňovú a 2-dňovú produkciu nektáru

produkcia nektáru	Deviance	Resid. Df	P(> Chi )
1-dňová	151.94	148	< 0.001***
2-dňová	6.5807	50	< 0.001***



Obr. 14 Boxploty znázorňujúce jednodňovú (a) a dvojdňovú (b) produkciu nektáru *V. cracca* v závislosti na ploidii

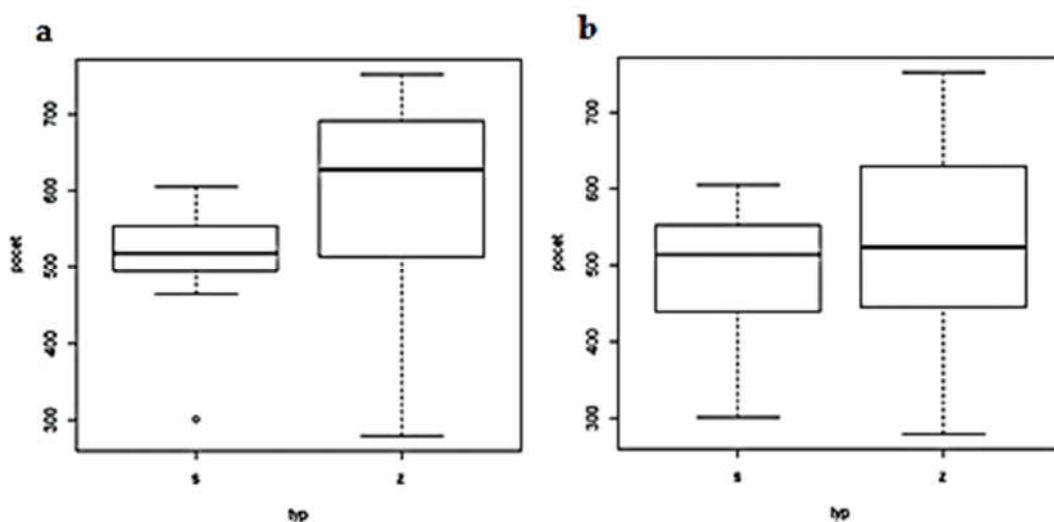
### 3.1.6 Veľkosť peľových zŕn a ich množstvo

Veľkosť peľových zŕn sa podľa výsledkov ANOVY signifikantne líši v rámci ploidie v každej testovanej veličine (viď tab. 16). Tetraploidy majú peľové zrná väčšie (obr. 16 a, b, c).

Tabuľka 16 Výsledky ANOVY testujúcej vplyv ploidie na dĺžku, šírku a obsah peľového zrna

peľové zrná	Deviance	Resid. Df	Pr(>Chi)
dĺžka	1353.5	148	< 0.001***
šírka	151.94	148	< 0.001***
obsah	1328536	148	< 0.001***

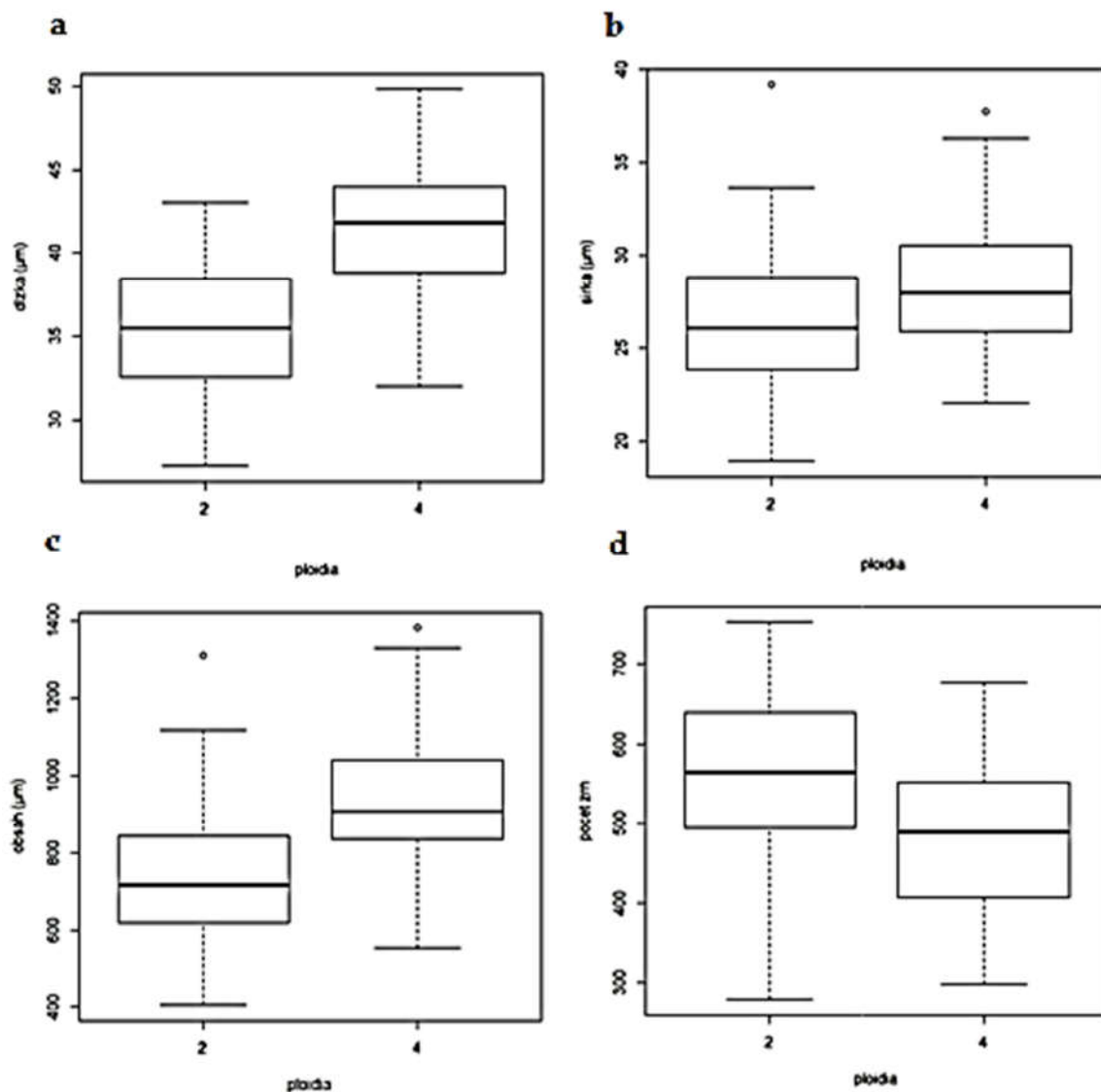
Analýza rozptylu ukázala, že sa počet peľových zŕn líši v závislosti na ploidi (tab. 16). Typ tyčinky je rozhodujúci iba u diploidných jedincov, u tetraploidov nie je rozdiel medzi počtom peľových zŕn, ktoré sa vyvinú na voľnej tyčinke a jednej zo zrastených. Diploidy produkujú viac peľových zŕn ako tetraploidy (viď obr. 16 d). U diploidov aj u tetraploidov je na zrastenej tyčinke vyšší počet peľových zŕn ako na voľnej (obr. 15 a, b).



Obr. 15 Boxploty znázorňujúce závislosť počtu peľových zŕn na type tyčinky (s-voľná, z-zrastená) pre diploidný (a) a tetraploidný (b) cytotyp.

Tabuľka 17 Výsledky ANOVY testujúcej vplyv ploidie, typu (zrastená/voľná) a kombinácie týchto dvoch premenných na počet peľových zŕn a typu tyčinky v rámci ploidie na počet peľových zŕn v jednej peľnici

počet peľ. zŕn	Deviance	Resid. Df	Pr(>Chi)
ploidia	191.2	59	< 0.001***
typ	57.88	58	< 0.001***
ploidia:typ	24.30	57	< 0.001***
typ (dipl.)	79.771	26	< 0.001***
typ (tetrapl.)	2.4095	31	0.1206



Obr. 16 Boxploty znázorňujúce závislosť dĺžky (a), šírky (b) a obsahu (c) peľového zrna a počtu peľových zŕn v jednej peľnici (d) *V. cracca* v závislosti na ploidii (2-diploid, 4-tetraploid)

### 3.1.7 Umelé kríženie

Pokus sa nepodaril, po opelení nevznikli semená, ktoré by som mohla analyzovať. Dôvodom mohlo byť nesprávne načasovanie pokusu (nezrelé alebo staré



peľové zrná, príp. nereceptívne blizny) z dôvodu mojej neskúsenosti. Kvety viky sú zároveň malé a ich rozmnožovacie orgány ťažko prístupné, takže sa mohli pri opeľovaní mechanicky poškodiť, čo mohlo zabrániť správne vývinu semien.

### **3.1.8 Zložky reprodukčnej izolácie**

Najväčší podiel na reprodukčnej izolácii má priestorová izolovanosť ( $RI_{\text{geogr}} = 0,931$ ), menší podiel správanie opeľovačov ( $RI_{\text{pollinator}} = 0,400$ ) a zanedbateľný podiel má fenológia ( $RI_{\text{phen}} = 0,077$ ). Koeficient celkovej reprodukčnej izolácie  $RI_{\text{total}} = 0,990$  (99%).

## 4 Diskusia

Doba kvitnutia diploidov a tetraploidov druhu *Vicia cracca* sa podľa mojich pozorování skoro úplne prekrývala, pričom tetraploidy dokvitali 30. 7. a diploidy 2. 8. Vrchol kvitnutia bol u tetraploida o 9 dní neskôr. Koeficient prekryvu kvitnutia cytotypov predstavoval 64 %. Segraves & Thompson (1999) konštatujú, že trvanie sezóny kvitnutia *Heuchera grossulariifolia* sa podobne ako u viky medzi ploidiami nelíšilo. Dĺžka kvitnutia sa nelíšila, ale doba kvitnutia sa nikdy úplne neprekrývala. Petit (1997) zaznamenal rozdiel v začiatku kvitnutia medzi parapatrickými diploidmi a tetraploidmi druhu *Arrhenatherum elatius* pozorovanými v kontrolovaných podmienkach v oboch režimoch (plne osvetlené slnečným svetlom aj 50% zatienené). Allopatrické tetraploidy a diploidy sa v plne osvetlenom režime v kvitnutí na rozdiel od viky prekrývali len mierne. Doba kvitnutia parapatrických diploidov a tetraploidov sa na rozdiel od terénnych podmienok signifikantne nelíšila ani v jednom režime. Jersáková *et al.* (2010) zaznamenala signifikantný rozdiel vo vrchole kvitnutia medzi cytotypmi rodu *Gymnadenia*: tetraploidná *G. conopsea* kvitla signifikantne skôr ako oktoploidná *G. conopsea* aj tetraploidná *G. densiflora*. Kvitnutie *G. conopsea* je podobné vike v tom, že cytotyp s menším počtom chromozómov má vrchol kvitnutia skôr. Husband & Schemske (2000) zistili, že diploidy druhu *Chamerion angustifolium* začali kvitnúť o jedno pozorovanie skôr, oba cytotypy kvitli naraz počas 4 pozorování. Koeficient prekryvu, ktorý berie do úvahy proporcie z celkového počtu kvitnúcich rastlín, bol 51%, čo je o 13 % percent menej ako u viky podľa mojich pozorování.

Práve v dobe fenoloického prekryvu som v zmiešanej diploidno-tetraploidnej populácii *V. cracca* pozorovala opeľovače. Pri pozorování "Budča" sa dva druhy opeľovačov správali inak ako náhodne: *Bombus pascuorum* preferoval tetraploidné rastliny a *Andrena* sp. diploidné. V kontraste s mojimi výsledkami Jersáková (2010) uvádza, že ani jedna zo skupín opeľovačov nemala preferenciu voči niektorému z cytotypov rodu *Gymnadenia*, ale boli zaznamenané rozdiely v ich správaní: nočné motýle z rádu Sphingidae mali správanie signifikantne odlišné od náhodného, zatiaľčo príslušníci rádu Noctuidae sa správali náhodne. Tiež je zaujímavé, že motýle z rádu Sphingidae navštívili behom pozorovania viac súkvetí ako jedinci z rádu Noctuidae. Keď som u viky hodnotila správanie všetkých opeľovačov naraz, nebol ani jeden cytotyp navštevovaný signifikantne častejšie. V kontraste s týmito výsledkami Husband &

Schemske (2000) zistili, že jednotlivé druhy opelovačov aj všetky druhy spolu navštevovali častejšie tetraploidy *Chamerion angustifolium* ako bolo očakávané, keby sa správali náhodne. Poradie opelovaných rastlín bolo tiež nenáhodné, bolo viac letov medzi tetraploidmi a menej medzi cytotypmi oproti očakávanému počtu podľa frekvencie cytotypov (lety u viky boli častejšie medzi ploidiami ako v rámci ploidii). Dva z troch druhov opelovačov *Ch. angustifolium* vykazovali túto heterogenitu; keď sa hodnotili všetky druhy spolu, nebol rozdiel signifikantný. Pomocou počítačových simulácií testovali, či samotné rozmiestnenie rastlín počas pokusu a vzdialenosti, ktoré hmyz počas opelovania prekonával by nemohli vysvetliť preferenciu tetraploidov. Aj po odfiltrovaní vplyvu týchto veličín, pozorované frekvencie návštevy tetraploidov boli stále neproporčne častejšie. Všetky tri druhy mali menšiu odchýlku v poradí navštívených rastlín od náhodného očakávaného správania a iba jeden druh opelovača vykazoval signifikantný rozdiel. Opelovače častejšie navštívili viac ako jeden kvet u tetraploidov. Veľkosť kvetu, počet otvorených kvetov a výška súkvetia spolu vysvetlili signifikantnú časť variability v počte návštev na každom súkvetí a v počte navštívených kvetov na súkvetie. Podobne ako u mnou skúmanej viky, kde priemerný počet návštev nebol signifikantne rozdielny medzi ploidiami, sa podľa Segraves & Thompson (1999) počet návštev za hodinu medzi ploidiami *Heuchera grossulariifolia* nelíšil. Rozdiel však zaznamenal v druhovom zložení skupiny opelovačov, ktoré navštevovali jednotlivé plodie. Toto zloženie sa dokonca menilo počas vegetačnej sezóny. Z 15-tich druhov opelovačov šesť navštevovalo iba jeden cytotyp alebo navštevovalo jeden cytotyp častejšie. U viky žiadny pravidelný opelovač (viac ako tri návštevy počas celého pozorovania) nebol cytotypovo špecifický, dva však mali preferenciu voči niektorému z cytotypov. Z mojich dát vyplýva, že opelovače na lokalitách "Průhonice 2" a "Budča" sa správajú inak ako náhodne pri preletoch medzi rastlinami z hľadiska ploidie, ale na lokalite "Průhonice 1" bolo správanie náhodné. To, že pri pozorovaniach "Průhonice 2" a "Budča" opelovače preferujú prelety medzi ploidiami a pri pozorovaní "Průhonice 1" nebol zaznamenaný žiadny "pattern" môže byť zapríčinené viacerými faktormi. Jednak počas pozorovania "Průhonice 1" boli rastliny rozmiestnené náhodne a pri oboch pozorovaniach v roku 2014 boli v pravidelnej štvorcovej mriežke (viď obr. 4), takže opelovač to mal asi 1,4-krát ( $\sqrt{2}$ ) ďalej na rastlinu rovnakej ploidie ako na rastlinu inej. Schéma rozmiestnenia by sa pri ďalších pozorovaniach mohla upraviť tak, aby boli rovnaké vzdialenosti a zároveň polovica susedov bola diploidná a polovica tetraploidná. Ďalší rozdiel medzi pozorovaním "Průhonice 1" a ďalšími dvoma bol v počte

zaznamenaných preletov, pre "Průhonice 1" mám výrazne menej záznamov. Tento potencionálny nedostatok by však mala odfiltrovať použitá Yatesova korigácia Chí-kvadrát testu.

Pri ďalšom výskume v tejto oblasti by bolo vhodné sledovať čas, ktorý strávi opelovač na jednom kvete (Dafni 1992). Tým by sa dala ešte lepšie odhadnúť atraktivita kvetov pre opelovače, pretože by to odrážalo informáciu, či opelovač našiel odmenu, ktorú hľadal (nektár, peľ). Ďalším spresnením by bolo spočítať každý pozorovací deň počet kvitnúcich súkvetí na každej rastline (Dafni 1992). Tým by sme získali lepšiu predstavu o pomere dostupných odmien ponúkaných jednotlivými ploidiemi. Tak by sa dalo presnejšie určiť, či nie sú v niektorom časovom období jedince jednej ploidiie atraktívnejšie len preto, že ich kvitne viac.

To, že na rozdiel od iných štúdií podľa mojich pozorovaní opelovače jednoznačne nepreferujú tetraploidné rastliny by mohlo byť spôsobené tým, že v iných systémoch sú peľové zrná tetraploidov väčšie a zároveň ich je rovnako alebo viac. Mne však vyšlo, že peľové zrná tetraploidov sú síce väčšie ako u diploidov, ale je ich signifikatne menej. V práci Tate & Simpson (2004) bol naopak pozorovaný menší peľ u tetraploidov rodu *Tarasa* (*Malvaceae*). Táto skutočnosť vysvetľujú zmenou životnej formy z trvaliek u diploidov na jednoročné rastliny u tetraploidov a zmenou spôsobu opelovania z xenogamie u diploidov na autogamiu u tetraploidov. Ďalším faktorom, ktorý by mohol vysvetliť tento stav, je posun areálu od nižších polôh, v ktorých sa vyskytujú diploidné druhy k vyšším polohám s extrémnejšími podmienkami (chladnejšie a suchšie prostredie vystavené vyšším dávkam UV žiarenia), kde rastú tetraploidy. Na novo-osídlených stanovištiach s krátkou vegetačnou sezónou a vzácnejším výskytom opelovačov im prechod z xenogamie ku autogamii mohol zvýšiť úspešnosť reprodukcie. Dôsledkom autogamie pravdepodobne je výrazná redukcia veľkosti kvetov. Zmeny ako u rodu *Tarasa* sa však počas polyploidizácie *Vicia cracca* nestali, obidve úrovne ploidiie sú xenogamné trvalky. Peľové zrná majú tetraploidy signifikatne väčšie ako diploidy v súlade s očakávaním, pretože veľkosť buniek je u vyšších ploidií väčšia (Stebbins 1971). Aj Marinho *et al.* (2014) študoval závislosť veľkosti peľových zŕn na ploidiu u dvoch druhov rodu *Eriotheca*. Tiež zaznamenal signifikantne väčšie peľové zrná u rastlín s vyššou ploidiou. Počet peľových zŕn v jednej peľnici u *V. cracca* bol u tetraploidov menší, čím sa atraktivita diploidov a tetraploidov z hľadiska peľu vyrovnáva.

Ďalšia vlastnosť tetraploidov, ktorá by mohla zvýšiť ich atraktivitu pre opelovače, je vyššia produkcia nektáru. Tú sa mi podarilo ukázať u študovaného taxónu. Napriek tomu, že tetraploidy by mali byť vďaka väčšiemu množstvu nektáru pre opelovačov atraktívnejšie, väčšina štatistických analýz správania opelovačov to neodráža: (1) pri preletoch z rastliny na rastlinu buď preferovali opačnú ploidiu alebo sa správali náhodne; (2) ani jeden cytotyp nebol atraktívnejší tak, že by po jeho návšteve zostali signifikantne častejšie v záhone ako odleteli preč; (3) počet návštev na rastline ani priemerný počet navštívených kvetov nebol u tetraploidov signifikantne vyšší (len pri pozorovaní "Prúhonice 1" je viac návštev na tetraploidných rastlinách, nie je to však signifikantné ( $p=0.08$ )). Keď som skúmala správanie z hľadiska druhov hmyzu, zistila som, že na lokalite "Budča" sa dva druhy opelovačov správajú nenáhodne: *Bombus pascuorum* preferoval tetraploidné rastliny a *Andrena* sp. diploidné. To by mohlo súvisieť s veľkosťou opelovačov. Väčší *B. pascuorum* potrebuje viac potravy a tetraploidné kvety majú vyššiu produkciu nektáru. Menšej *Andrena* sp. sa možno k nektáru dostane ľahšie v diploidnom kvete. Eliášová (2008) zistila, že veľkosť striedky, dĺžka člnku a šírka krídla sú vlastnosti, ktoré sa najvýraznejšie líšia medzi cytotypmi. Tieto rozdiely však sú veľmi malé, pravdepodobne nerozlišiteľné ani pre opelovačov. To by mohlo vysvetliť prečo aj napriek väčším ponúkaným odmenám u tetraploidov sa nepodarilo okrem jedného druhu opelovača zaznamenať signifikantnú preferenciu tohto cytotypu. Davis *et al.* (1994) skúmali množstvo cukrov v nektári jedného kvetu a objem nektárií haploidnej, diploidnej a tetraploidnej *Brassica rapa* a allotetraploida *B. napus*. Priemerný objem nektárií haploidnej *B. rapa* bol signifikantne nižší ako primerané objemy nektárií ostatných ploidí. Napriek rozdielom vo veľkosti kvetov sa objem nektárií *B. napus* a diploidnej a tetraploidnej *B. rapa* signifikantne nelíšil. Podobne aj množstvo cukrov v nektári z jedného kvetu bolo signifikantne nižšie u haploidnej *B. rapa* ako u diploidného a tetraploidného cytotypu, ale medzi diploidným a tetraploidným cytotypom sa signifikantne nelíšilo. Gao *et al.* (2014) zistili, že tetraploidný druh *Hedychium villosum* produkuje dvojnásobok nektáru ako jeho diploidný predok *H. tenuiflorum*. Obe tieto štúdie teda potvrdzujú moje výsledky.

Neúspešné ručné opelovanie mohlo mať rôzne príčiny. Stone *et al.* (1995) uvádzajú, že životnosť peľu rýchlo klesá, keď starne a aj keď je vystavený vplyvu prostredia. Kvôli týmto negenetickým vplyvom na schopnosť peľu oplodniť vaječnú bunku, je potrebné kontrolovať čerstvosť peľu používaného pri ručnom opelovaní.

Menej ako tretina článkov vydaných v rokoch od 1980 do polovice 1994 podľa tejto review zvažila čerstvosť alebo životaschopnosť peľu, zatiaľčo viac ako polovica skontrolovala receptivitu blizny (Stone *et al.* 1995). Na druhej strane Fazzino *et al.* (2011) použili ručné opelenie pri skúmaní správania opelovačov druhu *Balsamorhiza deltoidea* a zistili, že pri ručnom opelení vzniká viac ako dvakrát viac potencionálnych semien na súkvetie ako keď sú kvety opelované hmyzom. V mojom prípade mohlo byť príčinou neúspechu zanedbanie kontroly peľu a receptivity blizny, ale aj nesprávny postup pri opelení, keďže kvety čeľade *Fabaceae* majú komplikovanú stavbu kvetu a prístup ku generatívnym častiam nie je jednoduchý. Mohla som aj poškodiť kvet natoľko, že napriek úspešnému opeleniu uschol.

Pri analýze ploidie semien a semenáčikov som zaznamenala štyri aneuploidné semená a tri aneuploidné semenáčiky, ktoré vznikli na tetraploidnej materskej rastline. Na jednej diploidnej materskej rastline vzniklo osem tetraploidných semien, ktoré vyklíčili (boli analyzované ako semenáčiky). Qu *et al.* (2010) skúmali tri prevažne tetraploidné populácie druhu *Hypericum perforatum* a ploidiu semenáčikov produkované v týchto populáciách pomocou prietokovej cytometrie. Vzorky semien mali prevažne tetraploidný cytotyp, ale s nižšou frekvenciou vznikali aj hexaploidy a v jednej populácii aj diploidy. Väčšina semenáčikov bola tetraploidná a niekoľko hexaploidných. Hexaploidné zárodky najpravdepodobnejšie vznikli z neredukovanej gaméty z tetraploida oplodnenej normálnou, redukovanou samčou gamétou. Tieto hexaploidy ale pravdepodobne produkujú nestabilné gaméty, pretože obsahujú chromozómové sady z dvoch triploidných súprav chromozómov pôvodne odvodených z dvoch rôznych druhov (Qu *et al.* 2010). Takýmto spôsobom by mohli v diploidno-tetraploidnom komplexe vznikať triploidné jedince, ktoré Eliášová (2008) našla. Aneuploidy majú buď jeden alebo viac chromozómov navyše alebo im chýbajú oproti normálnemu chromozómovému počtu (Acquaah 2007, Ramsey & Schemske 1998). Aneuploidy, ktoré som identifikovala medzi semenami a semenáčikmi zo zmiešanej populácie mali pravdepodobne  $4n-1$  alebo  $4n-2$  chromozómov. Aneuploidy vznikajú pri formácii univalentov a multivalentov počas meiózy u jedincov s normálnym počtom chromozómov (Acquaah 2007). Comai (2005) ukázal, že 30-40% potomkov odvodených z autotetraploidnej kukurice je aneuploidných. Keďže nie sú mechanizmy rozdelenia univalentov rovnomerne medzi dcérske bunky počas anafázy I, niektoré bunky zdedia viac genetického materiálu ako iné. (Ramsey and Schemske, 1998). Podobne sa môže

stat, že multivalenty homológnych chromozómov zlhajú pri oddeľovaní sa počas meiózy, čo vedie k nerovnomernej migrácii chromozómov k opačným pólom (Acquah 2007). Rastliny, ktoré takto vzniknú majú nižšiu schopnosť sa ďalej rozmnožovať. Ďalším zaujímavým výsledkom pokusov na prietokovom cytometri bolo objavenie tetraploidných semenáčikov z diploidnej materskej rastliny. Autopolyploidy v prírode vznikajú splynutím neredukovaných gamét (Chen 2010).

## 5 Záver

Reprodukčné bariéry medzi diploidným a tetraploidným cytotypom druhu *V. cracca* sú veľmi silné. Najviac k tomu prispieva priestorová izolácia. Napriek tomu, že som pozorovala určitý fenologický posun, stále existuje nezanedbateľný prekryv v kvitnutí cytotypov. Navyše oba cytotypy navštevujú rovnaké druhy opelovačov, čím sa umožňuje prenos peľu medzi jedincami rôznych ploidii, a teda prezygotické bariéry v zmiešaných populáciách nie sú rozhodujúce. Jedince s triploidným cytotypom ale vznikajú len veľmi vzácné. Mne sa ich v skúmanej populácii vôbec nepodarilo identifikovať, Eliášová (2008) však našla osem triploidov medzi 6 613 jedincami z rôznych lokalít v Českej republike a na Slovensku. Mechanická izolácia – rozdiely v stavbe kvetu, ktoré zabraňujú prenosu peľu vzhľadom k malým rozdielom vo veľkosti korunných lupienkov, ktoré sú síce signifikantné, ale voľným okom nerozlíšiteľné (Eliášová 2008) pravdepodobne tiež nie sú príčinou, že vzniká tak málo triploidov. To ukazuje na existenciu postzygotických bariér, medzi ktoré patria (1) gametická izolácia – samčia a samičia gaméta nesplynú alebo sú neživotaschopné, (2) znížená životaschopnosť zygóty (zygóty krížencov sa nevyvinú), (3) znížená životaschopnosť jedinca (nedospeje do štádia pohlavnej zrelosti), (4) znížená plodnosť krížencov (neprodukujú funkčné gaméty). Vzhľadom k tomu, že nejaké triploidné jedince v zmiešaných populáciách vznikajú, bariéra (1) nie je úplne účinná. Dospelých triploidov však je len minimálne množstvo, takže vývin sa zastaví niekde medzi bariérami (1) až (3). Keďže majú triploidy ( $3x = 21$ ) nepárny počet chromozómov, len veľmi ťažko môžu vznikáť funkčné gaméty (4) a triploidy sa teda veľmi pravdepodobne môžu rozmnožovať len nepohlavne (výhonkami z koreňov, Aarssen *et al.* 1986) a šíriť sa len pomaly.



## 6 Použitá literatura:

Aarssen L. W., Hall I. V. & Jensen K. I. N. (1986) The biology of Canadian weeds 76. *Vicia angustifolia*, *Vicia cracca*, *Vicia sativa*, *Vicia tetrasperma*, and *Vicia villosa*. *Canadian Journal of Plant Science*, **66(3)**: 711-738.

Acquaah G. (2007) Principles of plant genetics and breeding. Wiley-Blackwell, Malden.

Baack E. J. (2005) Ecological factors influencing tetraploid establishment in snow buttercups (*Ranunculus adoneus*, Ranunculaceae): minority cytotype exclusion and barriers to triploid formation. *American Journal of Botany*, **92(11)**: 1827–1835.

Barton NH, Hewitt GM (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 113–148.

Barton NH, Hewitt GM (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* **341**: 497–503.

Borges L. A., Souza L. G. R., Guerra M., Machado I. C., Lewis G. P. & Lopes A. V. (2012) Reproductive isolation between diploid and tetraploid cytotypes of *Libidibia ferrea* (= *Caesalpinia ferrea*) (Leguminosae): ecological and taxonomic implications. *Plants Systematics and Evolution*, **298**: 1371–1381.

Brochmann C. (1992) Pollen and seed morphology of Nordic *Draba* (*Brassicaceae*): phylogenetic and ecological implications. *Nordic Journal of Botany*, **12**: 657-673.

Butterfass Th. (1987) Cell volume ratios of natural and of induced tetraploid and diploid flowering plants. *Cytologia* **52**: 309-316.

Castro S., Münzbergová Z., Raabová J. & Loureiro J. (2011) Breeding barriers at a diploid–hexaploid contact zone in *Aster amellus*. *Evolution & Ecology*, **25**: 795–814.

Chen Z. (2010) Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in plant science* **15**: 57-71.

Comai L. (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* **6**:836-846.

Córdoba S.A. & Cocucci A.A. (2011) Flower power: its association with bee power and floral functional morphology in papilionate legumes. *Annals of Botany*, **108**: 919–931.

Coyne J. A. & Orr H. A. (1998) The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*, **353**: 287-305.

Coyne J. A. & Orr H. A. (1989) Patterns of speciation in *Drosophila*. *Evolution* **43**: 362–381.

Dafni A. (ed.) (1992) Pollination ecology: A practical approach. Oxford University Press, New York, s. 250.

Davis A. R., Sawhney V.H., Fowke L. C. & Low N. H. (1994) Floral nectar secretion and ploidy in *Brassica rapa* and *B. napus* (*Brassicaceae*). I. Nectary size and nectar carbohydrate production and composition. *Apidologie*, **25**: 602-614.

Davis A. R., Sawhney V.H., Fowke L. C. & Low N. H. (1996) Floral nectar secretion and ploidy in *Brassica rapa* and *B. napus* (*Brassicaceae*). II. Quantified variability of nectary structure and function in rapid-cycling lines. *Annals of Botany*, **77**: 223-234.

El-Shanshoury A. R. and Soliman S. A. (1996) Electrophoretic evidence for subgeneric and sectional relationships of some species in *Vicia* L. *Pakistan Journal of Botany*, **28** (2): 173-182.

Elišová A. *Evaluation of cytotype and morphological variability of Vicia cracca L. (Fabaceae) in central Europe*. Prague, 2008. 84 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.

Endress P. K. (1994) Diveristy & evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press. Cambridge (UK).

Fazzino L., Kirkpatrick H. E. & Fimbel Ch. (2011) Comparison of Hand-Pollinated and Naturally-Pollinated Puget Balsamroot (*Balsamorhiza deltoidea* Nutt.) to Determine Pollinator Limitations on South Puget Sound Lowland Prairies. *Northwest Science* **85**(2): 352-360.

Gao J. Y., Liu Q. & Li Q. J. (2014) The comparative reproductive biology of a tetraploid species, *Hedychium villosum*, and its diploid progenitor *H. tenuiflorum* (Zingiberaceae). *Plant Biology* **16(3)**: 683-689.

Galbraith D., Harkins K., Maddox J., Ayres N., Sharma D. & Firoozabady E. (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, **220**: 1049–1051.

Greilhuber J., Temsch E., Loureiro J. (2007) Nuclear DNA content measurement. In: Doležel J., Greilhuber J., Suda J. [ed.] *Flow cytometry with plant cells*, 67-101. Weinheim: Wiley-VCH.

Harrison R. G. (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. In: Futuyma, D. and Antonovics, J. (eds) *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, vol. 7: 69–128. Oxford University Press, Oxford.

Harrison R. G. (1993) *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press: Oxford.

Hewitt G. M. (2011) Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica* **139**: 617-638.

Hu X. S. & Yeh F. C. (2014) Assessing postzygotic isolation using zygotic disequilibria in natural hybrid zones, *Plos one*, **9(6)**: 1-16.

Husband B. C. & 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. & Schemske D.W. (1998) Cytotype distribution at a diploid–tetraploid contact zone in *Chamerion*(*Epilobium*) *angustifolium* (Onagraceae). *American Journal of Botany* **85(12)**: 1688-1694.

Husband B.C. & Schemske D.W. (2000) Ecological mechanisms of reproductive isolation between diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium*. *Journal of Ecology*, **88**: 689–701.

Jersáková J., Castro S., Sonk N., Milchreit K., Schödelbauerová I., Tolasch T. & Dötterl S. (2010) Absence of pollinator-mediated pre-mating barriers in mixed-ploidy

populations of *Gymnadenia conopsea* s.l. (*Orchidaceae*). *Evolution & Ecology*, **24**: 1199–1218.

Lewis W. H. (1980) Polyploidy in species populations. In W. H. Lewis [ed.], *Polyploidy biological relevance*, 103–144. Plenum Press, New York, New York, USA.

Marinho R. C., Mendes-Rodrigues C., Bonetti A. M. & Oliveira P. E. (2014) Pollen and stomata morphometrics and polyploidy in *Eriotheca* (*Malvaceae-Bombacoideae*). *Plant Biology*, **16**: 508–511.

Mayr E. (1942) *Systematics and the Origin of Species*, Columbia University Press, New York.

Mayr E. (1963) *Animal Species and Evolution*. Belknap Press, Cambridge, MA.

Nagl W. (1978) Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution: towards an understanding of quantitative and qualitative variation of nuclear DNA in ontogeny and phylogeny. North-Holland Publishing, New York, New York, USA.

Otto F. (1990) DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Crissman D.Z. (ed) *Methods in cell biology*. Academic Press, New York, s. 105–110.

Petit Ch., Lesbros P., Ge X. & Thompson J. D. (1997) Variation in flowering phenology and selfing rate across a contact zone between diploid and tetraploid *Arrhenatherum elatius* (*Poaceae*). *Heredity*, **79**: 31–40.

Pettengill J. B. & Moeller D. A. (2012) Phylogeography of speciation: allopatric divergence and secondary contact between outcrossing and selfing *Clarkia*. *Molecular Ecology* **21(18)**: 4578–4592.

Qu L., Widrechner, M. P. & Rigby S. M. (2010) Analysis of breeding systems, ploidy, and the role of hexaploids in three *Hypericum perforatum* L. populations. *Industrial Crops and Products* **32**: 1–6.

Ramsey J., Bradshaw H. D. & Schemske D. W. (2003) Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (*Phrymaceae*), *Evolution*, **57(7)**: 1520–1534.

Ramsey J. & Schemske D. W. (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 467-501.

Rieseberg L. H., Carney S. E. (1998) Plant hybridization. *New Phytologist*, **140**: 599–624.

Rieseberg L. H., Willis J. H. (2007). Plant speciation. *Science* **317**: 910–914.

Segraves A. & Thompson J.N. (1999) Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution*, **53(4)**: 1114-1127.

Simpson B. B. & Neff J. N. (1983) In *Handbook of Experimental Pollination Biology* (ed. Jones C. E. & Little R. J.), s. 142, Van Nostrand Reinhold, New York.

Small E. (1983) Pollen ploidy-prediction in the *Medicago sativa* complex. *Pollen et Spores* **25**: 305-320.

Sonnleitner M., Flatscher R., García P. E., Rauchová J., Suda J., Schneeweiss G. M., Hülber K. & Schönswetter P. (2010) Distribution and habitat segregation on different spatial scales among diploid, tetraploid and hexaploid cytotypes of *Senecio carniolicus* (Asteraceae) in the Eastern Alps. *Annals of Botany* **106(6)**: 967-977.

Stebbins G. L. (1950) Variation and evolution in plants. Columbia University Press, New York, New York, USA.

Stebbins G. L. (1971): Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley, London.

Stone J. L., Thomson J. D. & Dent-Acosta S. J. (1995) Assessment of Pollen Viability in Hand-Pollination Experiments: A Review, *American Journal of Botany* **82(9)**: 1186-1197.

Stuessy T. F., Weiss-Schneeweiss H., Keil D. J. (2004) Diploid and polyploid cytotype distribution in *Melampodium cinereum* and *M. leucanthum* (Asteraceae, Heliantheae). *American Journal of Botany* **91**: 889–898.

Tate J. A. & Simpson B. B. (2004) Breeding system evolution in *Tarasa* (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploid species. *American Journal of Botany*, **91(2)**: 207–213.

Trávniček P., Eliášová A. and Suda J. (2010) The distribution of cytotypes of *Vicia cracca* in Central Europe: the changes that have occurred over the last four decades. *Preslia*, **82**: 149-163.

Wolf D. (2006) Nectar sugar composition and volumes of 47 species of Gentianales from a southern Ecuadorian mountain forest. *Annals of botany* **97**: 767-777.

Web 1: [http://en.wikipedia.org/wiki/Vicia\\_cracca](http://en.wikipedia.org/wiki/Vicia_cracca), 28. 4. 2013

Web 2: [http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence\\_in\\_situ\\_hybridization](http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_in_situ_hybridization), 1. 8. 2014

Web 3:  
<http://huntinghills.rdpsd.ab.ca/docs/homework/Thursday%20Nov%203%20-%20AP%20Bio%2020.pdf>, 1. 8. 2014