

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra botaniky

Studijní program: Biologie (navazující magisterské studium)

Studijní obor: Botanika - cévnaté rostliny



Bc. Veronika Vlčková

**Experimentální studium reprodukčních způsobů komplexu  
*Arabidopsis arenosa***

Experimental studies of reproduction in *Arabidopsis arenosa* complex

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Magdalena Lučanová

Praha 2016

## **Prohlášení**

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

V Praze dne 5.8.2016.....



Ráda bych zde poděkovala své školitelce Majdě Lučanové za vedení této práce a pomoc s vyhodnocováním dat.

Za pomoc s analýzami děkuji také Martinu Čertnerovi a Filipu Kolářovi, jemuž vděčím i za další přínosné konzultace.

Veliký dík patří Terce Mandákové za vypěstování pokusných rostlin a za poskytnutí skleníku a fytotronů, bez kterých by nebylo možné uskutečnit opylovací pokusy.

Dále děkuji Luce Jankolové a Jance Smatanové za pomoc s opylovacím pokusem.

Tato práce byla financována z prostředků GAUK - projekt č. 391315

## Abstrakt

U druhu *Arabidopsis arenosa* jsou časté hybridizace a polyploidizace, které komplikují jeho vnitřní stavbu. Přesto bylo tomuto taxonu dosud věnováno minimum pozornosti a v mnoha studiích jsou stále opakovány údaje, které ale dosud nebyly experimentálně ověřeny. Většina experimentů a studií se zaměřuje na již dobře prozkoumaný modelový druh *Arabidopsis thaliana*, ale o jeho divoce žijících příbuzných, mezi něž patří i *Arabidopsis arenosa*, je stále málo informací. Tento druh by přitom mohl také dobře posloužit jako modelový druh pro zkoumání formování a evoluce alopolyloidizace, rostlinných adaptací a dalších evolučních procesů, které by na jednoletém samosprašném druhu *A. thaliana* bylo velmi komplikované až nemožné zkoumat.

Tato diplomová práce je součástí rozsáhlého výzkumu zaměřeného na divoce žijící taxony rodu *Arabidopsis*. Ve středu zájmu této práce je dosud jasně nerozlišený komplex *Arabidopsis arenosa*. Práce přináší poznatky o míře jeho samosprašnosti, která je v tomto komplexu do jisté míry zastoupena, a porovnává její produkci semen s množstvím semen vyprodukovaných cizosprašností. Dále poukazuje na nepřítomnost výrazných reprodukčních bariér mezi genetickými liniemi a ploidiemi v rámci komplexu a taktéž na nepřítomnost rozdílů v biologické zdatnosti v závislosti na linii a ploidii.

Porovnány jsou zde také morfologické rozdíly linií, které vykazují určité odlišnosti v life-history znacích v rámci diploidních linií a odchylky v závislosti na nadmořské výšce u tetraploidních linií.

Klíčová slova: reprodukční způsoby, autogamie, alogamie, inkompatibilita, hybridizace, opylovací pokusy, ploidie, průtoková cytometrie, *Arabidopsis arenosa*.

## Abstract

There are frequent hybridizations and polyploidizations in genus *Arabidopsis*, which complicate its inner structure. Nevertheless, minimum of attention was dedicated to this taxon and much informations which were not experimentally verified are still repeated in papers. Most of papers are focused on well studied species *Arabidopsis thaliana*, but only a few studies are focused on its wild relatives, including *Arabidopsis arenosa*. This species could be also successfully used as model for research of forming and evolution of alopolyloidization, plant adaptations and another evolution processes, which would be very complicated or even impossible to investigate on annual selfer *Arabidopsis thaliana*.

This diploma thesis is part of extensive research of wild *Arabidopsis* species. In the spotlight of this thesis is still unclearly separated *Arabidopsis arenosa* complex. This paper is focused on autogamy possibilities, which are partially represented in *Arabidopsis arenosa* complex, and compares production of autogamy seeds with production from outcrossing. This paper also points out absence of strong reproductive barriers among genetic lineages and ploidies in this complex. Absence of differences among genetic lineages and ploidies was also revealed in this complex.

Morphological differences of genetic lineages are also compared. There are some differences in life-history traits in diploid lineages and some differences depend on altitude in tetraploid lineages.

Key words: reproduction, autogamy, allogamy, incompatibility, hybridization, pollination experiments, ploidy, flow cytometry, *Arabidopsis arenosa*



<b>ÚVOD</b> .....	<b>2</b>
<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>4</b>
<b>JIŽ ZNÁMÁ FKATA</b> .....	<b>4</b>
<b>CHARAKTERISTIKA RODU A TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ</b> .....	<b>4</b>
<b>ARABIDOPSIS ARENOSA</b> .....	<b>7</b>
<b>OD AUTOINKOMPATIBILITY K SAMOSPRAŠNOSTI</b> .....	<b>10</b>
<b>DOPADY REPRODUKČNÍCH SYSTÉMŮ NA EVOLUCI POPULACE</b> .....	<b>14</b>
<b>POLYPLOIDIZACE V KONTEXTU REPRODUKČNÍHO SYSTÉMU A HYBRIDIZACE</b> .....	<b>16</b>
<b>METODIKA A MATERIÁL</b> .....	<b>18</b>
<b>OPYLOVACÍ POKUSY</b> .....	<b>20</b>
Kontrola.....	21
Samosprášení .....	21
Cizosprášení populacemi z téže linie .....	22
Cizosprášení populacemi z jiné linie .....	23
Meziploidní hybridizace .....	23
<b>MĚŘENÍ LIFE-HISTORY ZNAKŮ</b> .....	<b>23</b>
<b>HODNOCENÍ KLÍČIVOSTI SEMEN A VIABILITY POTOMSTVA</b> .....	<b>25</b>
<b>PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE</b> .....	<b>25</b>
<b>MĚŘENÍ A VÁŽENÍ SEMEN</b> .....	<b>27</b>
<b>VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ</b> .....	<b>28</b>
<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>29</b>
<b>PRODUKCE SEMEN</b> .....	<b>29</b>
Model 1.....	30
Model 2.....	31
Model 3.....	32
<b>PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE</b> .....	<b>33</b>
<b>VIABILITA POTOMSTVA</b> .....	<b>34</b>
<b>VÁHA A VELIKOST SEMEN</b> .....	<b>37</b>
<b>LIFE HISTORY</b> .....	<b>38</b>
<b>DISKUZE</b> .....	<b>41</b>
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>44</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>45</b>

## ÚVOD

Poznání rozmnožovacích systémů a hybridizačních možností je klíčové pro pochopení vnitřního členění taxonomické jednotky. Rod *Arabidopsis* Heynh. in Holl & Heynh. (huseníček) je z tohoto hlediska komplikovaný.

Na rozdíl od nejznámějšího druhu tohoto rodu, *Arabidopsis thaliana*, který je dobře prozkoumaným modelovým organizmem, jsou reprodukční způsoby většiny ostatních druhů tohoto rodu nedostatečně známé. Studie, které se jich týkají, se zaměřují spíše na rozšíření, ekologii a morfologii (např. Al-Shehbaz & O’Kane, 2002; Al-Shehbaz & Ihsan, 2003). Na speciaci, hybridizaci a polyploidizaci se zaměřuje jen velmi málo studií a informace o těchto rostlinách dříve řazených do samostatného rodu *Cardaminopsis* jsou špatně dostupné. To často vede k používání mylné taxonomie, a tím pádem i chybným závěrům a komplikacím při srovnávání jednotlivých studií.

Z dosud známých faktů lze uvést, že se v tomto rodě vyskytuje autogamie i alogamie (Bechsgaard et al., 2006, Bomblies & Weigel, 2010; Willi & Mäattänen, 2010). Základem těchto procesů je schopnost rozpoznání cizího a vlastního pylu a jeho odmítnutí v případě, že je z hlediska příbuznosti pro danou rostlinu nevyhovující (Takayama & Isogai, 2003). Apomixie zatím nebyla v tomto rodě prokázána, ačkoli jedna studie uvádí, že by bylo možné ji uměle vyvolat skrze mutaci samičí gamety (Ravi et al., 2008).

Stejně tak složitá je i hybridizace v rámci tohoto rodu. Kromě krajních případů, kdy se rostliny rodu *Arabidopsis* kříží (s téměř padesátiprocentní úspěšností) s jiným rodem (konkrétně *A. thaliana* s druhem *Olimarabidopsis pumila*, dříve řazeného přímo do rodu *Arabidopsis*) (Berger, 1966), dochází k hojnému křížení i uvnitř samotného rodu. Pro příklad lze uvést alotetraploidní druh *A. suecica*, který vzniká křížením druhů *A. arenosa* a *A. thaliana* (O’Kane et al., 1996).

Dalším faktorem, který ovlivňuje vnitřní taxonomii rodu, je polyploidizace. Ta může být spolu s hybridizací jedním z mechanismů speciace (Stebbins, 1940). Polyploidizace hraje v tomto rodě významnou roli (Clauss & Koch, 2006; Kolář et al., 2013; Měsíček, 1970; Schmickl & Koch, 2011).



Tato práce se zaměřuje na rozmnožovací systémy komplexu *Arabidopsis arenosa*, který se v posledních letech začíná jevit jako daleko komplikovanější, než se v minulosti předpokládalo. Mnoho studií ještě dnes automaticky uvádí informaci, že druhy rodu *Arabidopsis* jsou autoinkompatibilní, aniž by byl tento fakt experimentálně ověřen. Právě v komplexu *Arabidopsis arenosa* je objevováno čím dál více jevů, které nasvědčují tomu, že autokompatibilita je zde alespoň do určité míry přítomna. Stejně jako u ostatních divoce žijících druhů *Arabidopsis* se zřejmě vyvinula následkem mutací na samčím S-lokusovém proteinu (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015).

Rozmnožovací systém může být ovlivněn i populační ekologií druhu. Například u populací druhu *Arabidopsis lyrata* rostoucích v okolí kanadských Velkých jezer byl zaznamenán přechod od cizosprašnosti k samosprašnosti na okrajích areálů (Willi & Mäattänen, 2010). Tito severoameričtí samosprašní jedinci netvořili jednu jasně definovanou skupinu, ale naopak se vyskytovali v několika genetických skupinách tvořených jinak autoinkompatibilními jedinci. To naznačuje, že samosprašnost se zde buď vyvinula několikrát nezávisle na sobě, nebo se postupně rozšířila do různých genetických pozadí. Jako pravděpodobnější se jeví spíše její opakovaný vznik (Foxe et al., 2010). To je pro zkoumání rozmnožovacího systému rodu *Arabidopsis* důležitý poznatek. Může-li vlivem stavby populace docházet k (pravděpodobně opakovaným) změnám reprodukční strategie, pak je potřeba při studiu tohoto rodu z hlediska rozmnožování věnovat pozornost také populační struktuře.

Bez znalosti reprodukčního způsobu nelze vytvářet závěry o hybridizaci, speciaci, reprodukčních bariérách, a tím pádem ani o evoluci a členění dané skupiny, proto má jeho studium zásadní význam pro celkové pochopení taxonu.

Druh *Arabidopsis arenosa* se v poslední době stává objektem zájmu mj. i genomických studií, a to nejen kvůli své příbuznosti s modelovým organizmem *Arabidopsis thaliana*, ale i díky ploidně variabilnímu genomu, který je větší než genom *Arabidopsis thaliana*. Výhodou může být i delší životnost. Zatímco monokarpická *Arabidopsis thaliana* po odkvětu odumírá, rostliny druhu *Arabidopsis arenosa* žijí a plodí

i několik let, což umožňuje realizaci pokusů, které na jednoletém samosprašném druhu *A. thaliana* provádět nelze (Hohmann et al., 2014).

## CÍLE PRÁCE

Práce je součástí rozsáhlého projektu řešícího taxonomii, životní strategie a genetické vztahy divoce žijících druhů rodu *Arabidopsis*.

Cílem této práce je otestovat schopnost autogamie rostlin v komplexu *Arabidopsis arenosa*, odhalit případné rozdíly v reprodukčních způsobech mezi jednotlivými genetickými liniemi a ploidiemi a zjistit reprodukční bariéry mezi nimi. Dále se zaměřuje na morfologické rozdíly v life-history znacích a srovnává je mezi ploidiemi a vývojovými liniemi. Zohledněna je i nadmořská výška, ze které rostliny pocházely.

## JIŽ ZNÁMÁ FKATA

### CHARAKTERISTIKA RODU A TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ

*Arabidopsis* je rod hmyzosnubných dvouděložných rostlin z čeledi *Brassicaceae*.

Jedná se o terestrické rostliny menšího vzrůstu (10-50 cm) rostoucí na polích, rumišťích, podél řek, cest a železnic a na kamenitých svazích. Jako konkurenčně slabým rostlinám se jim daří především na narušovaných stanovištích a písčných substrátech od nížin až do hor - ekologická amplituda je tedy poměrně široká.

Lodyhy a laločnaté listy v přizemní růžici jsou často porostlé jednoduchými či rozvětvenými trichomy. Lodyhy jsou přímé, často větvené, listy přisedlé nebo krátce řapíkaté. *Arabidopsis* tvoří hroznovitá květenství s bílými až fialovými aktinomorfními květy, které se skládají ze čtyř kališních a čtyř korunních lístků, pestíku, čtyř dlouhých a dvou krátkých tyčinek.

Vyskytuje se především v mírném pásu severní polokoule, ale i v Jižní Americe, jižní Africe, Austrálii a na Novém Zélandu (Al-Shehbaz & Ihsan, 2003).

Z hlediska reprodukce a taxonomie je tento rod složitý. Objevuje se zde autogamie i alogamie (Bechsgaard et al., 2006, Bomblies & Weigel, 2010; Willi & Mäattänen, 2010). Dále je zde častá polyploidie. Vyskytují se obvykle diploidní a tetraploidní druhy (Al-Shehbaz & O’Kane, 2002), ale u druhu *A. arenosa* lze vzácně nalézt i triploidní a aneuploidní jedince (Měsíček, 1970).

Co se týče vnitřního členění rodu *Arabidopsis*, v poslední době je na základě molekulárních dat (ITS, mikrosatelity, chloroplastová a jaderná DNA) členěn do tří superskupin: *Arabidopsis arenosa*, *Arabidopsis halleri* a *Arabidopsis lyrata*. Dalšími jasně oddělenými diploidními liniemi jsou *A. pedemontana*, *A. cebennensis* a *A. croatica*. Dále jsou známi alopolyloidní kříženci *A. suecica* (s *A. arenosa* a *A. thaliana* jako rodičovskými druhy) a *A. kamchatica* (rodičovskými druhy jsou *A. lyrata* a *A. halleri* subsp. *gemmifera*). Dalším (pod)druhem, který ale ještě není taxonomicky zcela jasně zařazen, je tetraploidní potomek druhů *A. arenosa* a *A. lyrata*, který buď vznikl zdvojením genomu (alopolyloidizací) nebo duplikací genomu *A. lyrata* (autopolyloidizací) a následnou introgresí *A. arenosa* (Hohmann et al., 2014).

<b><i>Arabidopsis arenosa</i> agg.</b>		
<i>Arabidopsis arenosa</i> (L.) Lawalrée		
subsp. <i>arenosa</i>	(2n = 32)	Střední a západní Evropa, Skandinávie (nižší nadmořské výšky)
subsp. <i>arenosa</i> var. <i>intermedia</i> (Kovats) Hayek	(2n = 32)	Jihovýchod rakouských Alp (podobně jako <i>A. neglecta</i> )
subsp. <i>borbasii</i> (Zapałowicz) O’Kane & Al-Shehbaz	(2n = 32)	Střední a západní Evropa (horské oblasti, vyšší nadmořské výšky)
<i>Arabidopsis arenosa</i> , unclear taxonomic treatment	(2n = 16)	Balkán
<i>Arabidopsis carpatica</i> , nom. prov.	(2n = 16)	Karpaty (střední nadmořské výšky, vápencové skály)
<i>Arabidopsis neglecta</i> (Schultes) O’Kane		

& Al-Shehbaz		
subsp. <i>neglecta</i>	(2n = 16)	Karpaty (horské oblasti)
subsp. <i>robusta</i> , nom. prov.	(2n = 32)	Karpaty (horské oblasti, v nižších nadmořských výškách jen občas)
<i>Arabidopsis nitida</i> , nom. prov.	(2n = 16)	Karpaty (horské oblasti, od středních do subalpinských poloh)
<i>Arabidopsis petrogena</i> (A. Kern) V.I. Dorof.		
?subsp. <i>petrogena</i>	(2n = 16)	Karpaty, panonské nížiny (možná dvě variety)
subsp. <i>exoleta</i> , nom. prov.	(2n = 32)	Karpaty (nižší nadmořské výšky)
<b><i>Arabidopsis lyrata</i> linie</b>		
<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> (L.) O'Kane & Al-Shehbaz	(2n = 16)	Aljaška, Kanada, Spojené státy
<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>petraea</i> (L.) O'Kane & Al-Shehbaz	(2n = 16/32)	Evropa
= <i>A. petraea</i> (L.) V.I. Dorof.		
<i>Arabidopsis petraea</i> subsp. <i>umbrosa</i> (Turcz. Ex Steud.) Elven & D.F. Murray	(2n = 16)	Arktická severovýchodní Asie, Sibiř, Aljaška, Kanada
<i>Arabidopsis petraea</i> subsp. <i>septentrionalis</i> (N. Busch) Elven & D.F. Murray	(2n = 32)	Arktická severovýchodní Evropa, Evropská část Ruska až po Sibiř
<i>Arabidopsis arenicola</i> (Richardson ex Hook.) Al-Shehbaz et al.	(2n = 16)	Arktická Kanada a Grónsko
<b><i>Arabidopsis halleri</i> linie</b>		
<i>Arabidopsis halleri</i> subsp. <i>halleri</i> (L.) O'Kane & Al-Shehbaz	(2n = 16)	Evropa
<i>Arabidopsis halleri</i> subsp. <i>dacica</i> (Heuff.) Kolník	(2n = 16)	Karpaty, Rumunsko
<i>Arabidopsis halleri</i> subsp. <i>gemmifera</i> (Matsum.) O'Kane & Al-Shehbaz	(2n = 16)	Rusko - dálný východ, severovýchodní Čína, Korea, Japonsko, Taiwan

<i>Arabidopsis halleri</i> subsp. <i>ovirensis</i> (Wulfen) A. P. Iljinsk.	(2n = 16)	Pouze Rakousko (všehny přírůstky z Balkánu patří k subsp. <i>halleri</i> )
<i>Arabidopsis halleri</i> subsp. <i>tatrica</i> (Pawł.) Kolník	(2n = 16)	Tatry, Slovensko
<i>Arabidopsis umezawana</i> Kadota	(2n = ?)	Japonsko - Hokkaido (horské části Mt. Rishirizin), jednoleté až dvouleté
<b>Další diploidní taxony</b>		
<i>Arabidopsis pedemontana</i> (Boiss.) O’Kane & Al-Shehbaz	(2n = 16)	Severovýchodní Itálie
<i>Arabidopsis cebennensis</i> (DC.) O’Kane & Al-Shehbaz	(2n = 16)	Jihovýchodní Francie, , Francouzské středohoří
<i>Arabidopsis croatica</i> (Schott) O’Kane & Al-Shehbaz	(2n = 16)	Chorvatsko
<b>Alopolyploidní taxony</b>		
<i>Arabidopsis kamchatica</i> (Fisch. Ex DC.) O’Kane & Al-Shehbaz	(2n = 32)	Boreální Aljaška, Kanada, východní Sibiř, Rusko - dálný východ, Korea, Japonsko
Taiwan		
<i>Arabidopsis kamchatica</i> subsp. <i>kawasakiana</i> (Makino) Shimizu & Kudoh	(2n = 32)	Japonsko, ozimé, (pobřežní, nížinné)
<i>Arabidopsis suecica</i> (Fr.) Norrl.	(2n = 26)	Fennoskandinávie a baltské oblasti

**Tab. 1.** Přehled členění divoce žijících skupin rodu *Arabidopsis* podle Hohmann et al., 2014 (upraveno).

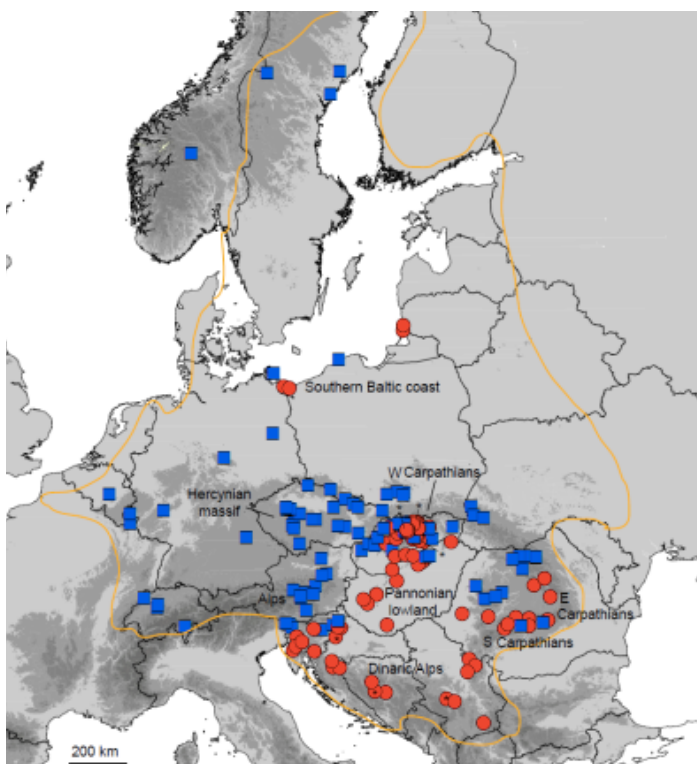
## ARABIDOPSIS ARENOSA

Jedním z nejkomplicovanějších taxonů rodu *Arabidopsis* je *A. arenosa*, který je spíše komplexem mezi sebou se křížících druhů a poddruhů. Dříve byly podle některých pojetí do této skupiny řazeny např. i druhy *Arabidopsis nitida* nom.prov., *Arabidopsis carpatica*, *Arabidopsis petrogena* a *Arabidopsis arenosa* s.s., popřípadě i *Arabidopsis croatica* (Měsíček, 1970; Schmickl et al., 2012). Jiní autoři rozdělovali *A. arenosa* na dva poddruhy a to *A. arenosa* subsp. *borbasii* a *A. arenosa* subsp. *arenosa*, která je velmi podobná druhu *A. suecica* (Al-Shehbaz & O’Kane, 2002). K chaosu ve vnitřním členění

tohoto taxonu přispívají i hybridizace a polyploidizace, které celou situaci ještě více komplikují (Clauss & Koch, 2006). Definitivní rozdělení této skupiny je tak stále nejasné.

Haploidní chromozomové číslo rostlin z komplexu *Arabidopsis arenosa* je  $x=8$  (Bombliés & Weigel, 2010). Somatický počet chromozomů je  $2n=16/32$  (Al-Shehbaz & O`Kane, 2002). Vzácně byli zachyceni i aneuploidní ( $2n=18, 19, \text{cca } 38, 30, 31 \text{ a } 34; n=17$ ) a triploidní ( $2n=24$ ) jedinci (Měsíček, 1970). Triploidní cytotypy byly vždy reprezentovány ojedinělými jedinci v jinak diploidních populacích (Kolář et al., 2013), lze se tedy domnívat, že jde o vznik z neredukovaných gamet. Existuje ojedinělá zmínka i o pentaploidním jedinci druhu *A. arenosa* (Měsíček, 1970). Nalezen byl také jedinec, který díky anomální meióze tvořil mikrospory  $n=8$ , ačkoli jeho somatická ploidie byla  $2n=32$ . Zde se nejspíš jednalo o případ náhodného dvojnásobného snížení chromozomového počtu (Měsíček, 1970). Navzdory výskytu rozdílných cytotypů v různých částech areálu je většina populací cytotypově uniformních – diploidní nebo tetraploidní (Kolář et al., 2013). Nápadně vysoká koncentrace diploidních jedinců *A. arenosa* je na území západních Karpat, což svědčí pro vývojové centrum tohoto komplexu (Měsíček, 1970; Schmickl et al., 2012).

Populace autotetraploidní *Arabidopsis arenosa* jsou široce rozšířené napříč severní a střední Evropou (obr. 1.). Diploidní populace se naproti tomu vyskytují ve východní Evropě a podél jižního pobřeží Baltu. Obě ploidie se potkávají v Karpatech. Bylo prokázáno, že některé široce rozšířené autotetraploidní populace vznikly ze stejné populace před cca 30 000 generacemi v severních Karpatech, kde byly v poslední době nalezeny jejich nejbližší existující diploidní příbuzní (Arnold et al. 2015). Poté tato tetraploidní populace sklouzla do přinejmenším čtyř hlavních linií, které kolonizovaly většinu Evropy. Rekonstrukce populační historie naznačuje podstatnou interploidní příměs v obou směrech, ale jenom mezi geograficky blízkými populacemi (Arnold et al. 2015).



**Obr. 1.** Mapa rozšíření a ploidii druhu *Arabidopsis arenosa*. Diploidní populace jsou značeny červeně, tetraploidní modře (Kolář et al., 2015).

Jednotlivé genetické linie komplexu *A. arenosa* byly již molekulárními metodami rozlišeny (Kolář et al., 2013), reprodukční kompatibility mezi nimi však zatím studovány nebyly. Díky vysoké variabilitě se v tomto komplexu nachází široká škála morfologických odlišností a ekologických nároků a v neposlední řadě také rozdílů v reprodukčních strategiích (Clauss & Koch, 2006). V minulosti již proběhly pokusy o podrobné prozkoumání tohoto komplexu na území Slovenska (Měsíček, 1970; Měsíček, nepublikováno), molekulární metody však tehdy ještě nebyly k dispozici a některé části studie nebyly publikovány. Molekulární markery již jsou pro tuto skupinu optimalizovány, což z ní - spolu s její cizosprašností a víceletostí - činí ideální modelový příklad pro zkoumání formování a evoluce alopolyplodizace, rostlinných adaptací a dalších evolučních procesů, které by na jednoletém samosprašném druhu *A. thaliana* bylo velmi komplikované až nemožné zkoumat.

## OD AUTOINKOMPATIBILITY K SAMOSPRAŠNOSTI

Pravděpodobně velká část rostlinných taxonů (přibližně 60%) je cizosprašných. Autoinkompatibilních je ale jen 40% rostlin, což dokazuje, že rostlina bez autoinkompatibilního bloku nemusí být nutně samosprašná. Samosprašnost byla zjištěna u cca 9% druhů, zbylé druhy mají smíšené strategie nebo nebyly prozkoumány (Igic & Kohn, 2006).

U čeledi *Brassicaceae* je systém autoinkompatibility podmíněn polymorfickým S-lokusem složeným ze tří polymorfních genů. Prvním z těchto genů je gen pro S-receptorovou kinázu (**SRK**) kódující membránovou kinázu, která určuje specifitu blizny. Druhý je gen pro S-lokusový protein 11 (SP11), také známý jako **SCR** (S-lokus cysteine-rich protein), kódující malý cysteinový protein, který určuje specifitu pylu. (Takayama & Isogai, 2003). Exprese SRC je regulována malými tandemovými RNA (Shimizu, 2015). Poslední z nich, S-lokus glykoprotein (SLG), je formou bliznového proteinu, podobnou extracelulární oblasti SRK (Takayama & Isogai, 2003). Jeho funkce v

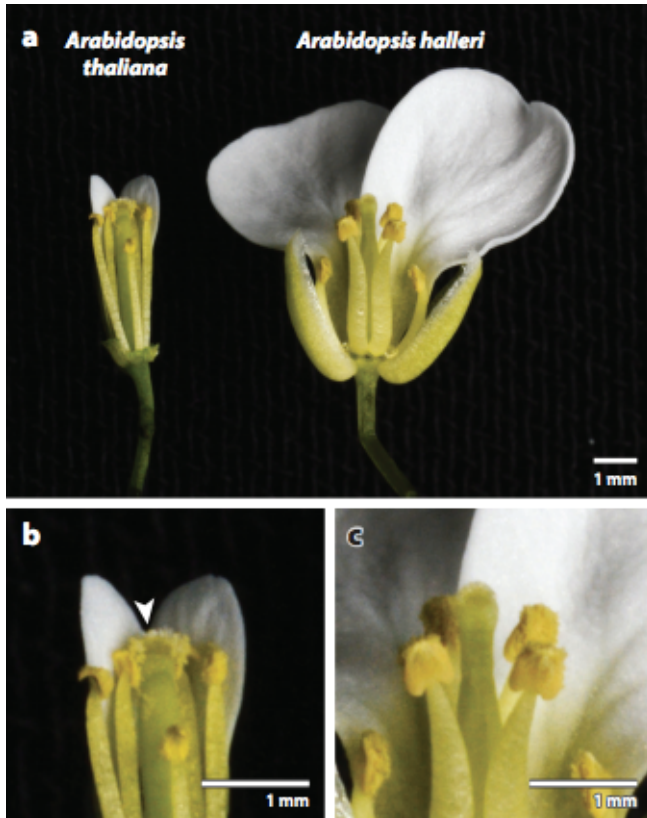
autoinkompatibilitě zatím nebyla zcela objasněna, ale pravděpodobně slouží jako prostředek ke kumulaci SRK a přispívá ke zrání SRK receptoru (Nasrallah, 2000). Interakce samčího SRC a samičího SRK indukuje autofosforylaci SRK, která je spouštěčem signální kaskády ústící v odmítnutí inkompatibilního pylu. Tato interakce je základem rozpoznání vlastního pylu (Takayama & Isogai, 2003).

Evoluce samosprašnosti v důsledku ztráty autoinkompatibility, která je řízena S-lokusem, je považována za jednu z nejčastějších evolučních událostí v rostlinné říši (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015). Obvykle je charakterizována třemi kroky. Prvním z nich je ztráta autoinkompatibilního bloku. Následuje rozvoj syndromu samosprašnosti, který zahrnuje mimo jiné i morfologické změny, jako je zmenšení velikosti a změna tvaru květů. Bylo prokázáno, že účinnost samoopylení koreluje s úhlem otevření korunních lístků květu (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015). K dalším znakům provázejícím syndrom samosprašnosti patří redukce množství pylu, vůně a dalších atraktantů pro opylovače a vymizení případných mechanismů, které brání samosprašení - dichogamie a herkogamie. Na rozvoji syndromu samosprašnosti se podílí také ARM gen, který



stabilizuje částečnou autoinkompatibilitu a spolu se SRK genem ovlivňuje tvar květů. Konečným krokem ve vývoji samosprašnosti je změna celogenomových polymorfních znaků (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015).

V extrémním případě může mít i jediná autokompatibilní mutace takový vliv, že způsobí skok od obligátní cizosprašnosti ke smíšené rozmnožovací strategii až převládající samosprašnosti (Igic & Busch, 2013).



**Obr. 2.** Srovnání morfologie květu samosprašné *Arabidopsis thaliana* a cizosprašné *Arabidopsis halleri*. Květ samosprašného druhu je výrazně menší, tyčinky jsou přimknuté k blizně a přenášejí na ni pyl. Cizosprašná rostlina má korunní plátky několikanásobně větší, tyčinky jsou od blizny odkloněny. Podle Shimizu & Tsuchimatsu, 2015.

Navzdory mnoha studiím zabývajícím se samoopylením stále není zcela jisté, které geny jsou konkrétně zodpovědné za vznik samosprašnosti. Hlavním důvodem je, že většina dotčených znaků je kvantitativní a tudíž ovlivněna více faktory. Je tedy obtížné identifikovat, co které jednotlivé geny ovlivňují. Jednou z metod, které lze použít k určování genů zodpovědných za vznik autoinkompatibility, je **QTL (quantitative trait locus) mapování**. To je také hlavní metodou pro studium genetické stavby

kvantitativních znaků a připravuje půdu pro subsekvenci izolaci genů (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015). Dosavadní studie používající tuto metodu poukazují na to, že autokompatibilita je řízena mnoha lokusy, z nichž některé mají na její fungování zásadní vliv (Sicard & Lenhart, 2011). Jediným genem, který byl dosud izolován pomocí QTL mapování a u kterého bylo přímo prokázáno ovlivňování autokompatibility, je gen nesoucí název Style2.1. Tento gen kóduje transkripční faktor pro strukturní protein, který ovlivňuje samoopylení skrze elongaci buněk v čnělkách u domestikovaného rajčete (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015).

Další metodou je **asociační mapování**, které se v poslední době dostává čím dál více do popředí pro analýzy kvantitativních znaků. Touto metodou bylo zjištěno, že gen zodpovědný za syntézu rostlinného hormonu giberelinu ovlivňuje také délku květních orgánů.

Třetí z metod, které byly využity k detekci autokompatibilních genů, je **analýza transkriptomů** porovnávající rostlinné transkriptomy samosprašných a cizosprašných taxonů. Nabízí tak seznam různě regulovaných genů. Tato metoda je aplikovatelná i na nemodelové druhy (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015).

Na základě studovaného taxonu lze studie rozdělit do dvou skupin: ty, které srovnávají samosprašné rostliny s autoinkompatibilními, a druhé porovnávající samosprašné druhy mezi sebou. Druhá možnost zkoumání je umožněna vysokou variabilitou, která se mezi samosprašnými druhy vyskytuje a umožňuje tak identifikovat geny potenciálně se podílející na vzniku samosprašnosti (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015).

Přechod k samosprašnosti může být ovlivněn i **domestikací**, jak bylo zjištěno u rodu *Brassica*. V divoce žijících populacích tohoto rodu byly autokompatibilní mutace zjištěny pouze v samčím genu SRC. V těchto populacích je totiž autokompatibilita podstatně výhodnější pro pylová zrna, protože takový pyl je kompatibilní se všemi bliznami v populaci. Tím pádem mají rostliny s tímto pylem vyšší fitness než ostatní rostliny, jejichž pylová zrna nejsou schopna opylit blizny se stejnou S-alelou. Naproti tomu autokompatibilita blizen není v porovnání s cizosprašnými tak výhodná. Zvýhodněny jsou pouze v případě, že se nacházejí v podmínkách se silnou pylovou

limitací (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015). I ostatní druhy, na kterých byl tento jev zkoumán, vykazují mutace převážně v SRC genu, což naznačuje, že pylová limitace nebývá nijak častá nebo silná (Castric et al. 2014, Tsuchimatsu & Shimizu 2013, Tsuchimatsu et al. 2012). Fitness rostliny je tedy v tomto ohledu zvyšována rozdílnou mírou skrze pyl a skrze vajíčka (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015).

Naproti tomu u domestikovaných populací se často projevuje autokompatibilita skrze mutaci v samičím genu SRK (Tsuchimatsu et al., 2012). Kódující regiony samičího SRK genu jsou přibližně desetkrát delší než u samčího SRC genu, proto jsou v nich mutace způsobující ztrátu autoinkompatibility zhruba desetkrát častější než u SRC (Tsuchimatsu et al., 2010). Rozdíl mezi divoce žijící a domestikovanou populací je zřejmě způsoben umělou selekcí, která podporuje spíše samosprašnost než příležitosti k cizoopylení.

To, že se autokompatibilní mutace v samičím genu v divoce žijících populacích téměř nevyskytují, může být vysvětleno také pleiotropií, tedy častým jevem, kdy jeden gen ovlivňuje více fenotypových znaků. SRK může mít pleiotropní efekt i v jiných znacích v kombinaci s jinými geny. Tento jev je častý v divokých i domestikovaných populacích. Ztráta funkce SRK genu tedy zřejmě není sama o sobě škodlivá (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015).

Přijde-li populace o autoinkompatibilní blok, je tato změna s největší pravděpodobností nevratná. Autokompatibilní taxon je schopen udržet jenom několik desítek haploskupin, které jsou navíc narušovány mutacemi. Nevratnost narušení autoinkompatibility lze přičíst tomu, že mutace, které narušují geny, jsou častější než zpětné mutace, které by teoreticky snad mohly vést zpět k autoinkompatibilitě (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015).

Nevratnost ztráty autoinkompatibility ale nutně neznamená, že je nevratný i vývoj k převládajícímu samoopylení. Samosprašné linie mohou obnovit cizosprašnost rozvinutím odlišného rozmnožovacího systému nebo skrze změny v morfologii květů spíše, než aby se vracely k obnovování autoinkompatibilního bloku. V některých skupinách byla popsána evoluce gynodioecie, tedy vznik samičích jedinců v

autokompatibilních hermafroditických populacích. Předpokládá se, že potenciálně by byl touto cestou možný i vznik androdioecie (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015).

Za určitých okolností může i cizosprašná rostlina přijmout vlastní pyl. Mimo jiných vlivů, jako je prostředí s příliš vysokou teplotou nebo pozdní opylení, sem spadá i jev označovaný jako mentor efekt. Dostane-li se na bliznu zároveň s vlastním pylem i pyl jiného jedince, může vlastní pyl překonat autoinkompatibilní blok mateřské rostliny a opylit ji (Richards, 1997).

## DOPADY REPRODUKČNÍCH SYSTÉMŮ NA EVOLUCI POPULACE

Rozmnožovací způsoby zanechávají výrazné stopy na struktuře populace či celého taxonu, do níž ale zasahuje i mnoho dalších faktorů.

Se zvyšujícím se stupněm samosprašnosti obvykle klesá genetická diverzita. Efektivní velikost populace by v těchto případech teoreticky měla být poloviční, než by bylo předpokládáno u kompletně cizosprašné populace. Empirické studie však ukazují, že redukce efektivní velikosti je ve skutečnosti u samosprašných populací ještě vyšší než o polovinu. Příčinou je pravděpodobně menší úspěšnost rekombinací způsobená zvýšenou homozygotitou, kolonizační efekt hrdla láhve nebo demografická stochasticita (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015). Např. u *A. kamchatica* byla zjištěna nižší genová diverzita než vykazují její rodičovské druhy. Může to být následek nejen samosprašnosti, ale i efektu hrdla láhve, který umožnil začlenění jen omezeného množství rodičovské variability do genomu *A. kamchatica* (Shimizu et al. 2009).

Snížení efektivní velikosti populace vede k méně efektivní selekci. Tím pádem genomy v samosprašných populacích hromadí více mírně škodlivých mutací. Např. u samosprašné *Capsella rubella* (*Brassicaceae*) je poměr nesynonymních a synonymních mutací přibližně dvakrát tak vysoký než u jejího příbuzného cizosprašného druhu *Capsella grandiflora*. Nadbytek nesynonymních substitucí u samosprašného druhu však často vůbec nezpůsobí jakékoli odlišnosti od cizosprašných příbuzných. Pravděpodobně proto, že samosprašnost často vzniká recentně a selekce tak zatím neměla dostatek času na to, aby působila na úrovni druhu. Pro nedávný původ samosprašnosti hovoří časové

odhady založené na celogenomovém polymorfizmu a přetrvávající geny pro autoinkompatibilitu (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015).

Samosprašné rostliny mají výhodu v jistotě rozmnožení a díky tomu jsou také výborní kolonizátoři. Podle Bakerova pravidla stačí ke kolonizaci nového území i jediná samosprašná rostlina (Baker, 1967).

Naproti tomu nevýhodou samosprašnosti může být především omezená schopnost se vyvíjet oproti alogamním druhům. Autogamní druh nemusí být schopen čelit rychleji se vyvíjejícím patogenům a predátorům (hypotéza Červené královny). Na druhou stranu i u samosprašných druhů byly pozorovány určité známky adaptací. Bohužel možnosti empirického pozorování rozdílů v adaptivních variacích mezi samosprašnými a cizosprašnými taxony, které jsou pro odhad adaptivního potenciálu a evolučního osudu samosprašného taxonu kriticky důležité, jsou zároveň i značně omezené (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015). Co se týče evoluční zdatnosti rostlin s autogamickými/alogamickými rodiči, byla prokázána nevýhodnost dlouhodobého autogamického rozmnožování. V téže studii byla zároveň prokázána existence heterózního efektu (Jones, 1924). Měřítky fitness může být např. výška rostliny, množství květů, semen, plodů atp. Tato měření prováděl již Darwin s druhem *Zea mays* (Briggs a Walters, 2001).

Co se týče pravděpodobné nedávnosti původu samosprašnosti, existují pro ni dvě vysvětlení, která se navzájem nevylučují. Za prvé: samosprašný taxon pravděpodobně bude krátkověký (evoluční slepá ulička), a za druhé: glaciální cykly, které byly během posledního milionu let výrazné, mohly indukovat efekt hrdla lahve a populační expanze. Tyto jevy mohly upřednostňovat samosprašnost dalšími třemi cestami. První z nich je limitace opylovačů či rozmnožovacích partnerů, což může podněcovat samosprašnost jako reprodukční jistotu. Dále přichází v úvahu silný genetický efekt hrdla lahve, který by redukoval počet S-haploskupin pomocí driftu, což by ve výsledku také mohlo vést k limitaci dostupnosti partnerů (Busch & Schoen 2008). A konečně populační efekt hrdla lahve, který mohl redukovat inbrední depresi, a to buď pročištěním nebo pomocí fixace recesivních škodlivých mutací, a eliminovat tak selekci proti samosprašnosti (Pujol et al. 2009).

Geograficky není samosprašnost vázána na konkrétní region, samosprašné druhy jsou široce rozšířené od temperátních do arktických regionů, které byly silně ovlivňovány zaledněním (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015).

Vliv samosprašnosti na strukturu populace a polymorfní znaky v ní závisí nejen na reprodukčním způsobu, ale i na dalších faktorech. Třídění druhů pouze na samosprašné a cizosprašné tedy může být při hodnocení dopadů rozmnožovacího systému na strukturu taxonu až příliš zjednodušující (Shimizu & Tsuchimatsu, 2015).

### POLYPLOIDIZACE V KONTEXTU REPRODUKČNÍHO SYSTÉMU A HYBRIDIZACE

Nově odštěpené polyploidní taxony jsou často omezovány silnými rozmnožovacími limity. Tím pádem může být upřednostňována autokompatibilita, díky níž má taxon opylení téměř jisté. Navíc v polyploidních rostlinách, které mají vícenásobné kopie genu, může být snadněji redukována inbrední deprese (Lande & Schemske, 1985).

Ve sporofytickém autoinkompatibilním rozmnožovacím systému u *Brassicaceae* může převažující rozmnožovací systém hrát zásadní roli v polyploidní speciaci. Ačkoli tetraploidi mívají duplikované S-lokusy, mohou ve většině dominantních haploskupin i jednoduché autokompatibilní mutace vyvolat autokompatibilitu a to díky malým RNA, které potlačují expresi SRC genu - tím pádem není potřeba dvou mutací k porušení každého duplikovaného S-lokusu zvlášť (Shimizu et al., 2011). Polyploidie tedy sice není zárukou samosprašnosti, ale pravděpodobně může jejím vlivem dojít k přesmyku k autokompatibilitě (Mable et al., 2004).

Co se týče mezidruhové hybridizace, dobře doloženým příkladem hybridizace spojené se speciací je *A. suecica*, která vznikla křížením druhů *A. arenosa* a *A. thaliana* (O'Kane et al., 1996, Jakobsson et al. 2006). Mezidruhoví hybridi i hybridi mezi ploidiemi mají však sníženou fitness a často tato křížení vedou k abortovaným semenům (Bomblies & Weigel, 2010). V některých případech umělé křížení *A. thaliana* a tetraploidní *A. arenosa* subsp. *arenosa* (resp. *Cardaminopsis arenosa* (L.) subsp. *arenosa*) bylo zcela neúspěšné (Měsíček, 1967). Existuje studie, která dokonce tvrdí, že *A. suecica* je spíše potomkem *A. neglecta* než *A. arenosa* (Beck, 2007).

*A. thaliana* se kříží i s *A. lyrata*, jejich potomci jsou však většinou sterilní (Měsíček, 1967), nedojde-li ke zdvojení somatických chromozomů, jež by mohlo mít za následek produkci funkčního pylu (Nasrallah et al., 2000).

Jedinci komplexu *A. arenosa* a druhu *A. neglecta* mezi sebou pravděpodobně hybridizují, i když zřejmě pouze jedinci téže ploidie. Diploidní *A. neglecta* ( $2n=16$ ) byla neúspěšně křížena s tetraploidní *A. arenosa*. Úspěšně byla naopak křížena s dnes již nerozlišovaným (a dosud řádně nepopsaným) druhem z komplexu *A. arenosa* - *Cardaminopsis carpatica* – z tohoto křížení vznikla fertilní semena a následně rostliny s počtem chromozomů  $2n=16$  (Měsíček, 1970).

## METODIKA A MATERIÁL

K dispozici byla semena různých ploidií a evolučních linií z celého areálu rozšíření komplexu z končícího GAČR projektu prof. Marholda. Bylo vybráno 23 populací ze Slovenska, Rakouska, Slovinska, Chorvatska, Srbska, Bulharska, Polska, pobřeží Německa a Litvy, Švédska a západního Ruska. Tyto populace spadaly do celkem osmi evolučních linií - čtyř diploidních a čtyř tetraploidních. Rozlišení diploidních linií vychází z článku Kolář et al., 2013. Tetraploidní linie byly vybrány podle předběžných molekulárních analýz.

Pro podrobný přehled viz příloha I.

linie	ploidie	populace		
WCARP	diploidní linie	AA016	AA84	AA090
DINAR		AA054	AA127	AA161
SECARP		AA221	AA066	AA123
BALT		AA200	AA153	
RUDERAL	tetraploidní linie	AA061	AA180	AA215
SEC		AA222	AA218	AA065
WC		AA229	AA168	AA171
ALP		AA253	AA255	AA265

Tab. 2. Genetické linie použité pro tento pokus.

V roce 2014 proběhl pilotní pokus, při kterém byly rostliny pěstovány v botanické zahradě v Průhoncích a kontrolovaně opylovány. Květenství byla izolována pomocí dvou vrstev monofilových sáčků a konstrukcí z drátů. Bohužel tato metoda se ukázala jako nepoužitelná. Izolační konstrukce poškozovaly květenství, protože byly příliš těžké a nedržely pevně uchycené v květináči, a dále samotné pěstování na záhoně bez možnosti regulace teploty a osvitů se ukázalo být pro tyto rostliny nevhodné (docházelo k hromadným úhynům). Vyprodukovaná semena byla úspěšně klíčena ve skleníku, ale vyrostlé semenáčky ve skleníku také záhy uhynuly. Tato část byla přínosná pro optimalizaci metodiky, bohužel pokusy určené pro sběr dat musely být v následujícím roce zahájeny od začátku.





**Obr. 3.** Mapa rozšíření celkem 23 populací, které byly pro tyto pokusy použity. Diploidní populace jsou označeny červeně, tetraploidní modře.

V roce 2015 byla zahájena hlavní část pokusů, tentokrát v brněnském CEITECu. Zde byly k dispozici fytotrony, ve kterých je možné regulovat teplotu a osvit. Podle některých zdrojů může mít stres vliv na rozmnožovací strategie rostlin (Ebert et al., 1989), proto byla snaha se co nejvíce přiblížit optimálním podmínkám. Rostliny v těchto podmínkách prospívaly dobře a žádné známky stresu nevykazovaly.

Pokusné rostliny byly vysévány od konce února do konce května 2015. Výsev některých populací musel být opakován kvůli špatné klíčivosti. Semena pro výsevy byla sebrána v terénu z planě rostoucích mateřských jedinců. Ze semen vyrostlé semenáčky byly jarovizovány od začátku srpna do 12.10. 2015, protože bylo nutné synchronizovat jejich kvetení. Dále byly pěstovány ve fytotronech. Z každé populace bylo vypěstováno 13 až 19 rostlin, které byly pěstovány v květináčích po jednom jedinci v substrátu FloraSelf Nature bez rašeliny s bílým kaznějovským pískem (pH 6) v poměru 1/3, při

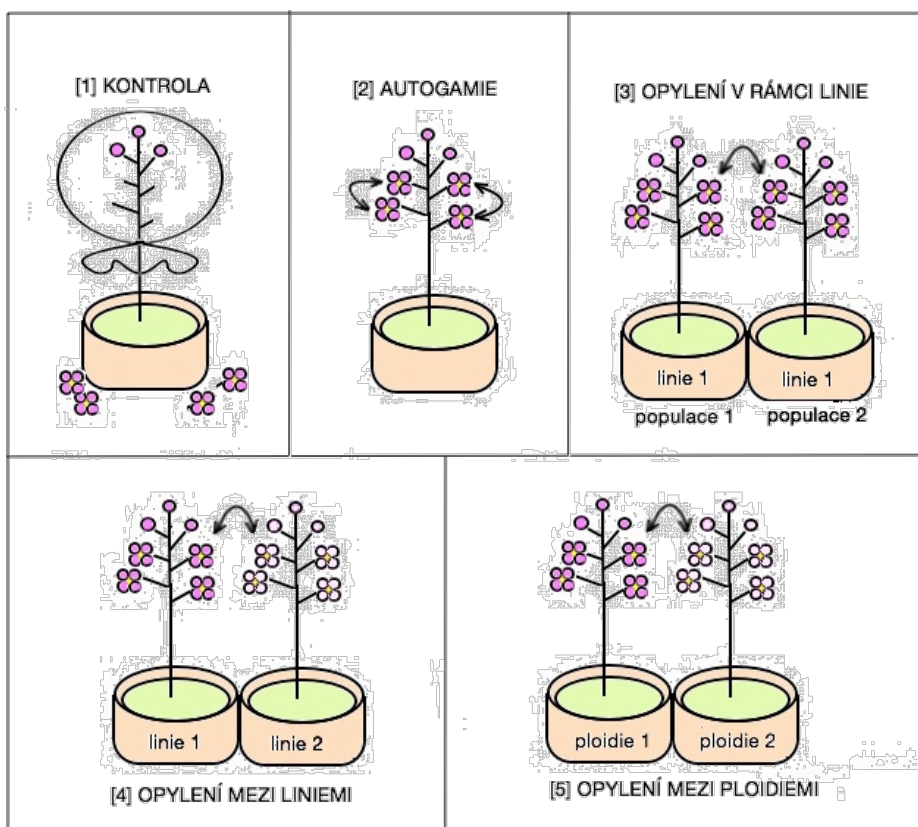
režimu, kdy den trval 16 hod., rostliny byly osvětleny umělým denním světlem v prostředí s teplotou 21°C. Noc trvala 8 hod. (bez osvětlení) a teplota byla nastavena na 19°C. Fytotrony nejsou vybaveny zavlažovacím systémem, proto byla prováděna běžná zálivka do květináčů a misek, ve kterých byly květináče umístěny. Do jedné misky se vešlo 15 květináčů, ale některé misky byly uprostřed mírně vypouklé, což občas způsobovalo rychlejší vysychání některých rostlin. Je tedy možné, že při přísunu vody k rostlinám docházelo k určitým odchylkám.

### OPYLOVACÍ POKUSY

Pro uskutečnění pokusu bylo nezbytné synchronizovat kvetení všech pokusných rostlin. Pokus byl zahájen v okamžiku, kdy více než polovina pokusných rostlin byla v plném květu a ostatní začínaly rozkvétat. Rostliny vždy tvořily několik desítek květů na většinou rozvětveném květenství.

Opylovací pokusy byly rozděleny na pět zásahů: 1) kontrola, 2) samostrášení, 3) cizosprášení populacemi z téže linie, 4) cizosprášení populacemi z jiné linie, 5) meziplodní hybridizace (obr. 4; podrobněji rozebráno níže). Již rozkvetlé květy byly vždy před opylováním odstraněny, aby se zamezilo mylným interpretacím z květů, které mohly být kontaminovány manipulací s květináči. Zásah byl vždy prováděn na čerstvě otevřených květech, které byly den předtím na rostlině jako jediné ponechány a to ve formě pupat. Vždy po dokončení zásahu (obvykle po třech dnech) bylo celé ošetřené květenství izolováno pomocí papírového sáčku přilepeného ke špejli zapíchnuté v květináči (viz obr. 5). Zamezilo se tak kontaminacím a zároveň tak byla sebrána vzniklá semena. Mezi jednotlivými dny, kdy probíhaly zásahy, byly rostliny umístěny vždy tak, aby se navzájem nedotýkaly a nemohly tak být kontaminovány nežádoucím pylem.

Po odpození rostlin byla semena sebrána, vyčištěna a spočítána.



**Obr. 4.** Schematické znázornění jednotlivých zásahů provedených při opylovacích pokusech.

### Kontrola

Již rozvité květy byly odstraněny a vždy minimálně deset nerozvitých pupat bylo izolováno pomocí papírového sáčku. Květy tak byly po celou svou fertillní fázi izolované a nemohlo dojít ke kontaminaci.

### Samosprášení

Testování schopností autogamie je klíčovou částí této práce. Z pokusných rostlin byly nejprve odstraněny již rozvité květy, které mohly být nekontrolovaně opyleny kontaktem s jinými rostlinami. Nato byly umístěny do fytotronů tak, aby se nedotýkaly jiných rostlin ani sebe navzájem, a nemohlo tak dojít k náhodnému sprášení. Druhý den byly nově rozvité květy opyleny mezi sebou. Následující dny bylo opylování zopakováno, dokud počet opylených květů na rostlině nedosáhl deseti (zpravidla tři dny). Poslední den opylování byly rostliny izolovány pomocí papírového sáčku.



**Obr. 5.** Květenství izolované pomocí papírového sáčku proti kontaminaci a nekontrolovanému vysypání semen. Sáček je zahnutý kolem špejle a přelepený izolepou.

### Cizosprašení populacemi z téže linie

Sprašení bylo prováděno mezi populacemi, aby mohla být vyloučena případná příbuznost křížených jedinců (toto riziko by mohlo vzniknout v případě křížení v rámci jedné populace). Abychom omezili chyby vzniklé individuálními odchylkami rostlin, prováděli jsme opylování pomocí pylových směsí vytvořených z celých populací. Pro tento zásah byly vytvořeny pylové směsi z každé populace zvlášť. Následně bylo z jedné populace vybráno pět jedinců, kteří byli vykastrováni a opyleni pylovými směsmi ostatních populací z téže linie. Ve většině případů tedy dalšími dvěma populacemi, v případě linie BALT pouze jednou populací. Po prvním dni, kdy byly rostliny vykastrovány a opyleny, bylo jejich opylování zopakováno ještě v následujících dvou dnech, abychom se ujistili, že se doba opylování neminula s obdobím receptivity blizny. Květy byly kastrovány ve stadiu poupěte těsně před rozvitím, protože během otevírání květu jsou blizny již receptivní (Smyth et al., 1990). Obvykle bylo opyleno deset květů na jedince.

### Cizosprášení populacemi z jiné linie

Tento zásah sloužil k odhalení případných reprodukčních bariér mezi různými evolučními liniemi a byl prováděn pouze na diploidních liniích, protože zatím jen u této ploidie bylo vymezení jednotlivých linií potvrzeno molekulárními markery (Kolář et al., 2013).

Opět byly připraveny pylové směsi, tentokrát však byla vytvořena jedna pylová směs z celé linie dohromady. Následně byli vybráni dva jedinci z každé populace všech diploidních linií, kromě té, z níž byla vytvořena pylová směs. Vybraní jedinci byli vykastrováni a opyleni (opět optimálně deset květů na jedince) Stejně jako u předchozího zásahu bylo toto opylení v následujících ještě dvakrát zopakováno.

### Meziploidní hybridizace

Tento zásah byl proveden pouze pilotně k odhalení potenciálu meziploidního křížení nebo případných meziploidních bariér. Pokud by zde byly zjištěny reprodukční bariéry, bylo by možné použít pyl odlišné ploidie pro další zkoumání mentor efektu.

Byly vybrány čtyři diploidní a čtyři tetraploidní populace. Z každé populace byli vybráni tři jedinci, kteří byli opylováni (celkem tedy dvanáct rostlin na ploidii). Počet opylených květů na rostlinu byl v tomto případě variabilní, protože nebylo možné rozeznat, které květy již byly opyleny předchozí den a které ne. Tato skutečnost byla zohledněna při vyhodnocování.

Následně byla vytvořena pylová směs ze dvou diploidních a dvou tetraploidních populací. Pylová směs byla po tři dny nanášena na vybrané rostliny z populací odlišné ploidie. Nakonec byla květenství opylených rostlin izolována pomocí papírového sáčku.

### MĚŘENÍ LIFE-HISTORY ZNAKŮ

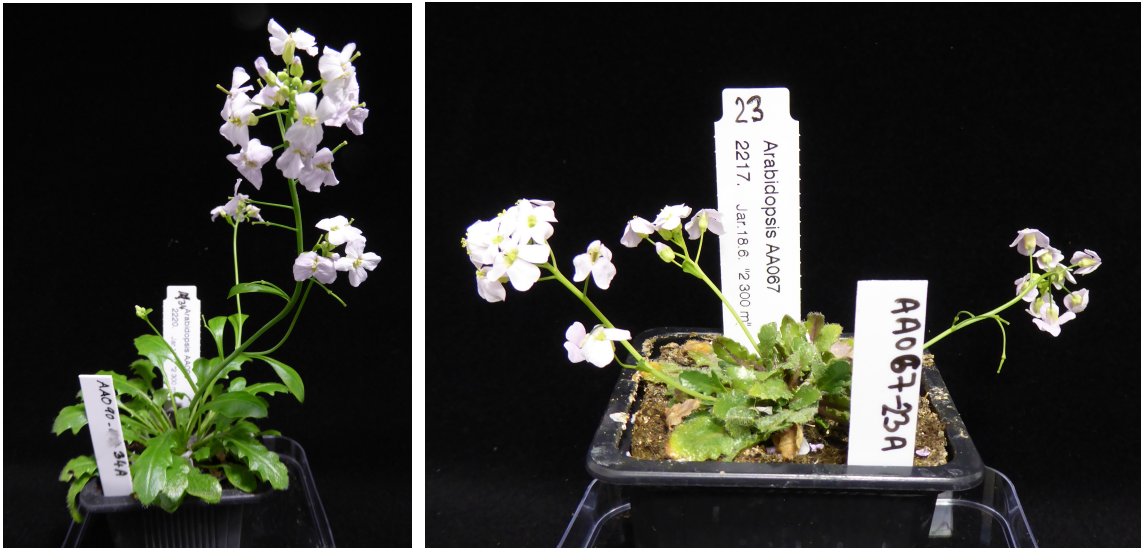
Měření life-history znaků je morfometrická metoda sloužící k posouzení míry, kterou rostlina investuje do reprodukce a do rozvoje vegetativních pletiv. Zároveň je to metoda, díky níž lze relativně objektivně posoudit rozdíly v morfologických znacích a vývoji rostlin (Marhold & Suda, 2002)

Znaky byly měřeny ve třech fázích: přelom vegetativní a časně generativní fáze, vrchol generativní fáze (rostliny v plném květu) a nakonec ve fázi po vytvoření plodů. Na přelomu vegetativní a časně generativní fáze (dále jen časně generativní) byly měřeny většinou pouze růžice listů, protože většina rostlin ještě nekvetla. Ve vrcholně generativní fázi již byla drtivá většina jedinců v plném květu a s výjimkou jedné linie (2xBALT), která měla zpravidla jen jeden stonek na jedince, rozkvétaly poměrně košatě. Za hlavní stonek byla považována nejsilnější lodyha vyrůstající ze středu růžice (Obr. 6a a 6b). Výjimečně se objevovali rostliny, které takovou lodyhu neměli. V takovém případě byla za hlavní stonek považována nejdelší lodyha.

Časně generativní fáze	Průměr růžice - i s u suchými listy
	Průměr růžice živých listů
	Délka nejdelšího stonku
	Počet stonků
	Počet rozvitých květů
Vrcholně generativní fáze	Počet bazálních růžic
	Počet stonkových růžic
	<b>Průměr hlavní růžice</b>
	Průměr další růžice
	Počet růžic s kvetoucími stonky
	<b>Délka lodyhy</b>
	<b>Počet stonků</b>
	<b>Počet kvetoucích větví vedlejších stonků</b>
	<b>Počet kvetoucí větví hlavního stonku</b>
	<b>Počet květů na apikální větvi nejdelšího stonku</b>
	Počet hlavních stonků
Fáze po odplození	Průměr růžice

**Tab. 3.** Přehled měřených znaků. Časně generativní fáze byla měřena v říjnu 2015; vrcholně generativní během opylovacích pokusů v listopadu 2015; fáze po odplození v lednu 2016. Tučně jsou zvýrazněny znaky použité pro následnou LDA.

Data byla vyčištěna od chybějících hodnot a pro analýzu byla použita jen vrcholně generativní fáze (v ostatních fázích nebyl dostatek dat nebo byla silně korelovaná). Byly použity pouze nekorelované znaky (v tab. 3 tučně zvýrazněné).



**Obr. 6a a 6b.** Vlevo příklad rostliny s hlavním stonkem, vpravo jedinec bez výrazného hlavního stonku (lodyhy jsou rovnocenné).

## HODNOCENÍ KLÍČIVOSTI SEMEN A VIABILITY POTOMSTVA

Byla vyseta semena z autogamického zásahu (20 výsevů po deseti semenech) a semena z křížení v rámci linie (39 výsevů po deseti semenech). Klíčení probíhalo na Petriho miskách v klíčidle s regulovatelnou teplotou a osvitem. Režim byl nastaven následovně: den 7:00-19:00 hod., teplota 20°C; noc 19:00-7:00 hod., teplota 10°C. V klíčidle byla semena klíčena sedm týdnů a jejich růst by průběžně zaznamenáván v průměru po třech dnech (za začátku častěji, ke konci již méně často). Po přibližně sedmi týdnech byla přesazena do pěstebního substrátu a umístěna do skleníku. Bohužel teplotu ve skleníku nebylo možné regulovat tak efektivně jako v klíčidle a většina semenáčků během prvních několika týdnů uhynula.

Životaschopnost semenáčků byla pro usnadnění vyhodnocení sumarizována jako součet násobků délek nejdelších listů jednotlivých semenáčků a počtu semenáčků ve vzorku, kteří dané hodnoty dosáhly.

## PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Průtoková cytometrie (FCM = flow cytometry) je dnes hojně využívanou cytogenomickou metodou v základním i aplikovaném biologickém výzkumu (Suda, 2005). V botanice je používána od osmdesátých let minulého století (Doležel et al.,

2007). Jedná se o časově a finančně relativně nenáročnou metodu, která pro dospělou rostlinu není destruktivní (pro semena bohužel ano). Její pomocí lze stanovit obsah jaderné DNA a ploidii (Suda, 2015).

Její princip spočívá v navázání fluorescenčního barviva na dvoušroubovici nukleové kyseliny a následném ozáření tohoto barviva světlem vhodné vlnové délky. Dojde k fluorescenci (excitace), tedy uvolnění světelné energie, která je přístrojem měřena za použití vhodných filtrů. Jádrem přístroje je průtoková komůrka, kde se částice v úzkém prostoru řadí jedna za druhou a pohybují se přes ohnisko excitačního záření. Dalším zpracováním dochází k digitalizaci ve formě histogramu, který zobrazuje relativní intenzitu fluorescence jednotlivých částic (Suda, 2005).

Existují tři typy fluorochromů (fluorescenčních barviv), jejichž volba ovlivňuje kvalitu analýzy. Prvním z nich se neselektivně vmezeřuje do dvoušroubovice DNA a umožňuje tak stanovení celkového množství nukleové kyseliny. Mezi tato barviva patří propidium jodid a ethidium bromid. Druhým typem jsou barviva navazující se přednostně na A-T báze. Těmi jsou např. DAPI, DIPI nebo Hoechst. Třetí typ se váže přednostně na G-C báze a zahrnuje např. i antibiotika mitramycin, chromomycin a olivomycin. Tato třetí skupina je však málo používaná z důvodu špatné kvality analýz (Suda, 2005).

V tomto případě bylo použito fluorescenční barvivo DAPI a jako standard byly použity listy druhu *Solanum pseudocapsicum* 2C = 2.59 pg. (Temsch, et al. 2010). Pletiva vzorku byla spolu s pletivy standardu rozsekána žiletkou v 0,5 ml pufru Otto I, tedy v 0,1 M monohydrátu kyseliny citronové a 0,5% detergentu Tween 20 (Otto, 1990; Doležel & Göhde, 1995). Vzniklá směs byla přefiltrována přes monofilový filtr a obarvena roztokem složeným z 1 ml fluorescenčního barviva (50 mg/ml), pufru Otto II - tedy 0,4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (Otto 1990), RNázy IIA (50 mg/ml) a β-merkptoethanolu 2 mg/ml (Suda, 2004). Připravený vzorek se nechal několik minut odstát a poté byl vložen do cytometru. Histogramy, které jsou výstupem průtokové cytometrie, byly vyhodnocovány v programu FloMax a to pomocí analýzy vzdálenosti píků standardu a měřeného jedince. Tímto způsobem byla vypočítána velikost genomů rostlin.



V rámci celého projektu *Arabidopsis* bylo metodou FCM analyzováno více než 3 tisíce rostlin. Na základě zjištěné značné uniformity ve velikosti genomu jsme analyzovali vždy pouze vybraného jedince z populace, ze které pochází mateřská rostlina, jejíž semena jsme použili na pokus. Byly porovnány relativní velikosti genomu. Pro tyto analýzy byly použity části listů nebo květů živých rostlin sesbíraných v terénu a následně uskladněných v sáčkích v lednici (teplota 4°C).

Průtoková cytometrie byla dále použita k odhadnutí ploidie semen z meziploidní hybridizace. Měření bylo orientačně provedeno na semenech z šesti jedinců. Semena byla vybrána od těch rostlin, které jich vytvořily nejvíce. Při výběru vzorků byly zohledněny viditelné rozdíly na semenech (velikost). K výběru takto omezeného množství vzorků bylo přistoupeno kvůli snaze zachovat co nejvíce semen pro výsevy v dalších letech.

## MĚŘENÍ A VÁŽENÍ SEMEN

Rozdíly mezi populacemi a zásahy byly zjišťovány mj. pomocí rozměrů a váhy semen. Semena sebraná do papírových sáčků byla nejprve důkladně vyčištěna, aby mezi nimi nebyly žádné nečistoty a zbytky z odkvetlé rostliny.

Pro měření byl vybrán reprezentativní vzorek semen z každé populace a od každého zásahu. V případě, že se semena od rostlin z téže populace velikostně lišila, bylo pracováno s více vzorky, aby byla zahrnuta celá škála velikosti v dané skupině. 115 vzorků semen bylo nafoceno pod binokulární lupou a změřeno pomocí programu ImageJ. Všude, kde to počet semen dovozoval (ve většině vzorků), bylo vyfoceno a změřeno deset semen na vzorek. Měřena byla vždy délka a šířka semene, z nichž byla vypočítána plocha, se kterou bylo dále pracováno.

Z těchto změřených semen bylo vybráno dvacet vzorků, které byly zváženy. Jednalo se o vždy o pět vzorků z prvních čtyř opylovacích zásahů (tedy všech, kromě meziploidního křížení). K redukci počtu vážených vzorků jsme přistoupeni z důvodu náročnosti práce s takto malými semeny (průměrná váha semene je 1,6 mg). Zvážen byl vždy celý počet semen ve vzorku a jeho váha následně vydělena počtem semen.

## VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Ke statistickému vyhodnocení dat a tvorbě grafů byly využity programy PAST (Hammer et al., 2001), STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc.) a R (R Core Team, 2013).

V programu R byly vyhodnoceny life-history znaky pomocí lineární diskriminační analýzy (LDA). V R byl také modelován růst a životaschopnost potomstva, pro který byla použita i STATISTICA (tvorba grafů). Program PAST byl použit pro analýzu souvislostí nadmořské výšky a morfologických znaků (lineární regrese), závislostí rozměrů a váhy semen a jejich souvislostí s nadmořskou výškou.

Vyhodnocení opylovacího experimentu bylo provedeno v programu STATISTICA pomocí následujících modelů:

**Model 1:** Testování autogamie. Mají zásah, linie a jejich interakce vliv na produkci semen? Porovnání zásahů 2 - autogamie) a 3 - opylení v rámci linie, která měla sloužit pro srovnání. Testovali jsme hypotézy pomocí zobecněného lineárního modelu (GLM), kdy proměnnou byl počet vyprodukovaných semen, přičemž kategoriálními prediktory (faktory) byly populace, linie a zásah. Populace byl faktor s náhodným efektem a zároveň vnořený do linie. Testovali jsme vliv jednotlivých faktorů i interakci zásah \* linie. **Model 2:** Je produkce semen závislá na ploidii mateřské rostliny? Zde byl u zásahů 2 - autogamie a 3 - opylení v rámci linie porovnán počet semen, který vyprodukovaly diploidní a tetraploidní linie. Testovali jsme zobecněným lineárním modelem, kdy proměnnou byl počet semen a faktory byla populace, linie a ploidie. Faktory s náhodným faktorem byly populace a linie, přičemž populace byla vnořená do linie a linie do ploidie. Testovali jsme vliv ploidie.

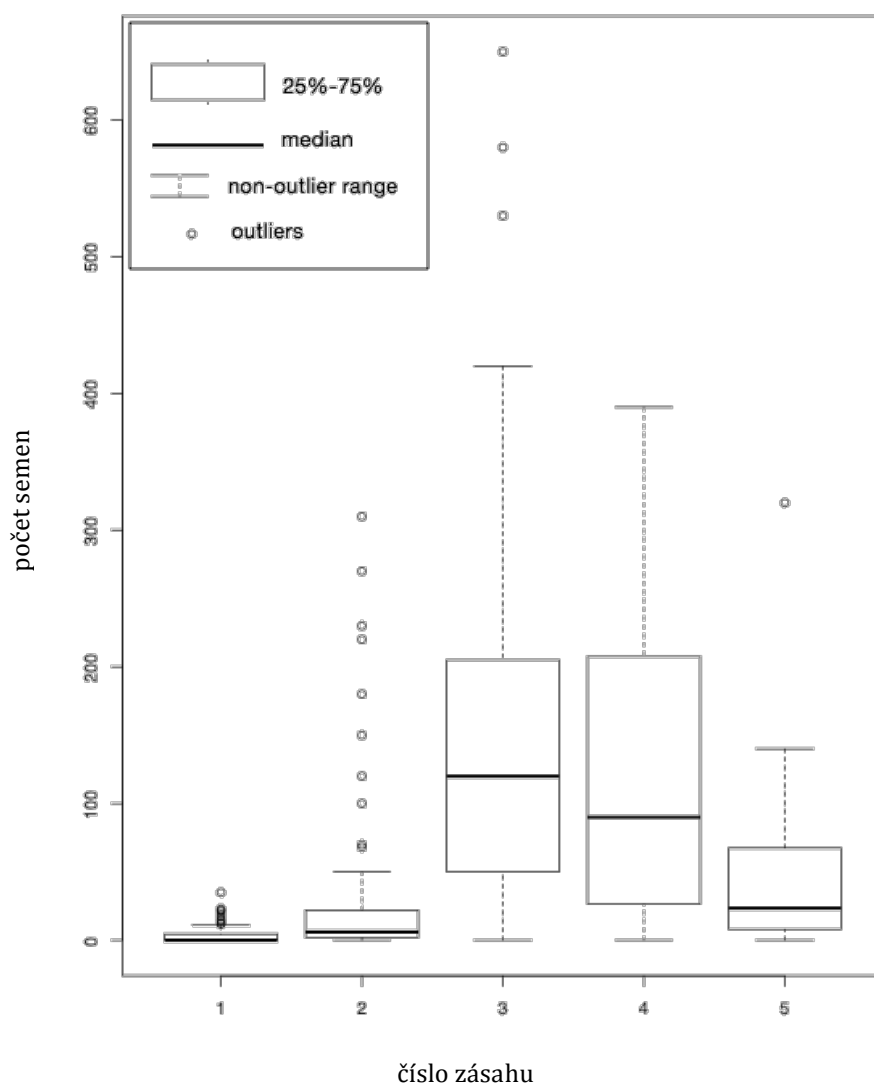
**Model 3:** Tento model testoval reprodukční bariéry mezi liniemi. Opět zkoumal, jestli mají zásah a linie vliv na produkci semen, tentokrát zde však byla zahrnuta opylení v rámci linie (kontrolní) – zásah 3 a opylení mezi liniemi – zásah 4. Testovali jsme jen diploidy (protože zásah 4 byl prováděn jen na diploidech) pomocí GLM, kdy populace, linie a zásah byly faktory, populace byla vnořená do linie a testovali jsme interakci zásah \* linie.

Počet semen byl kvůli normalitě rozdělení ve všech třech modelech transformován logaritmickou funkcí.

## VÝSLEDKY

### PRODUKCE SEMEN

Bylo zjištěno, že v produkci semen se jednotlivé zásahy liší (Obr. 7). Podle očekávání byly rostliny nejméně úspěšné při sprášení jinými populacemi téže linie [zásah 3]. K samosprášení [zásah 2] docházelo výrazně vzácněji a s menším úspěchem, ale přesto se občas u některých jedinců objevilo. Míra samosprašnosti nebyla závislá na linii. Určitý, i když velmi nízký (nejvýše 35) počet semen vznikl i u části kontrolních rostlin [zásah 1] (celkem pozorováno u 31 jedinců), u nichž žádným způsobem nemohlo dojít ke kontaminaci, což svědčí o alespoň omezené míře autokompatibility.



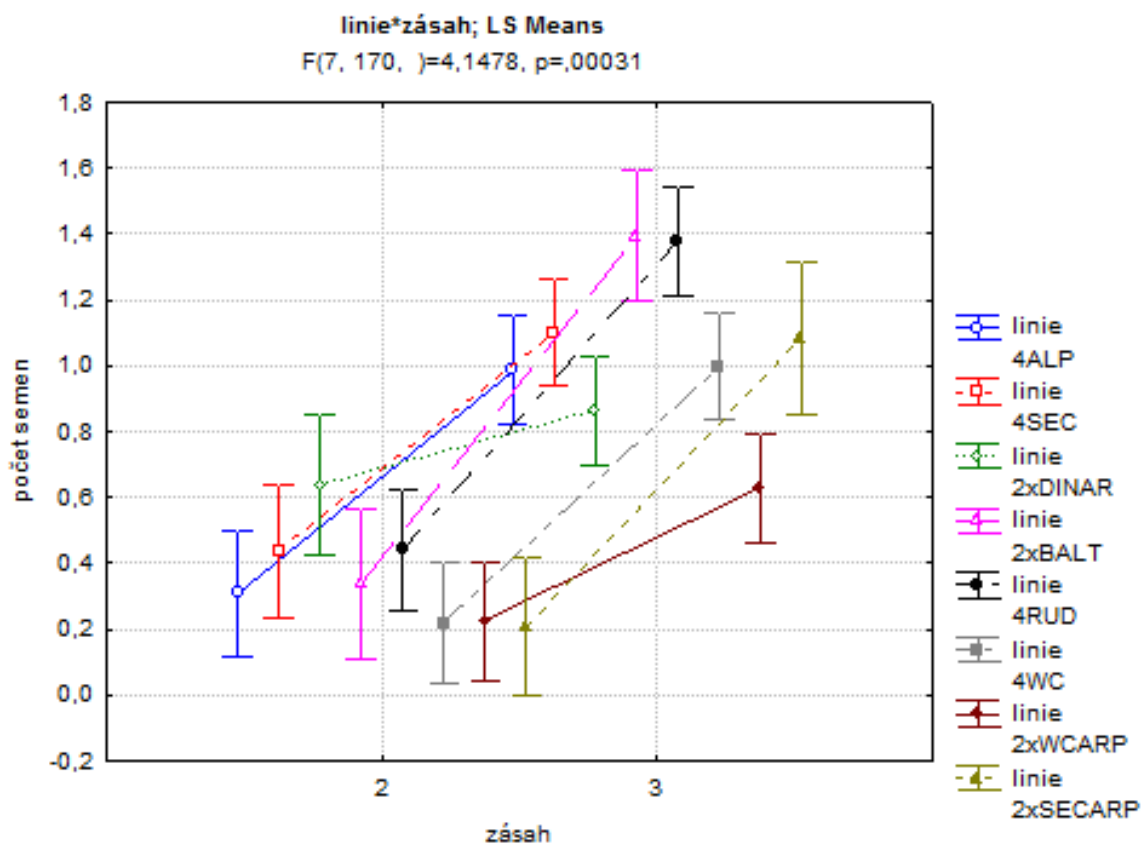
**Obr. 7.** Graf znázorňující celkový počet vzniklých semen z (1) kontrolních rostlin, na nichž nebylo prováděno žádné opylování, (2) ze samosprášených rostlin, (3) z rostlin opylených jinou populací v rámci téže linie, (4) z rostlin opylených jinou populací z jiné linie a (5) z rostlin opylených jedinci jiné ploidie

## Model 1

Průkazná byla interakce linie a zásahů autogamie [zásah 2] a sprášení v rámci linie [zásah 3]. Tato interakce má tedy vliv na produkci semen (Obr. 8).

GLM	Effect (F/R)	SS	Degree of freedom	MS	Den.Syn.Error df	Den.Syn.Error MS	F	p
Intercept	Fixed	82,04215	1	82,04215	17,2934	0,374636	218,9915	0,000000
Linie*Zásah	Fixed	3,01279	7	0,43040	170,0000	0,103766	4,1478	0,000308
Linie	Fixed	4,16442	7	0,59492	16,5335	0,398327	1,4935	0,236675
Zásah	Fixed	23,67239	1	23,67239	170,0000	0,103766	228,1321	0,000000
Populace(Linie)	Random	6,68739	16	0,41796	170,0000	0,103766	4,0279	0,000002
Error		17,64025	170	0,10377				

**Tab. 4. Model 1.** Vliv zásahu na produkci semen je průkazný; průkazná je i interakce linie a zásahu. Vliv samotné linie průkazný není.



**Obr. 8.** Porovnání produkce semen ze (2) samosprášení a (3) opylení jinou populací z téže linie. Většina rostlin vyprodukovala podstatně více semen při křížení s jinou populací než při samosprášení.

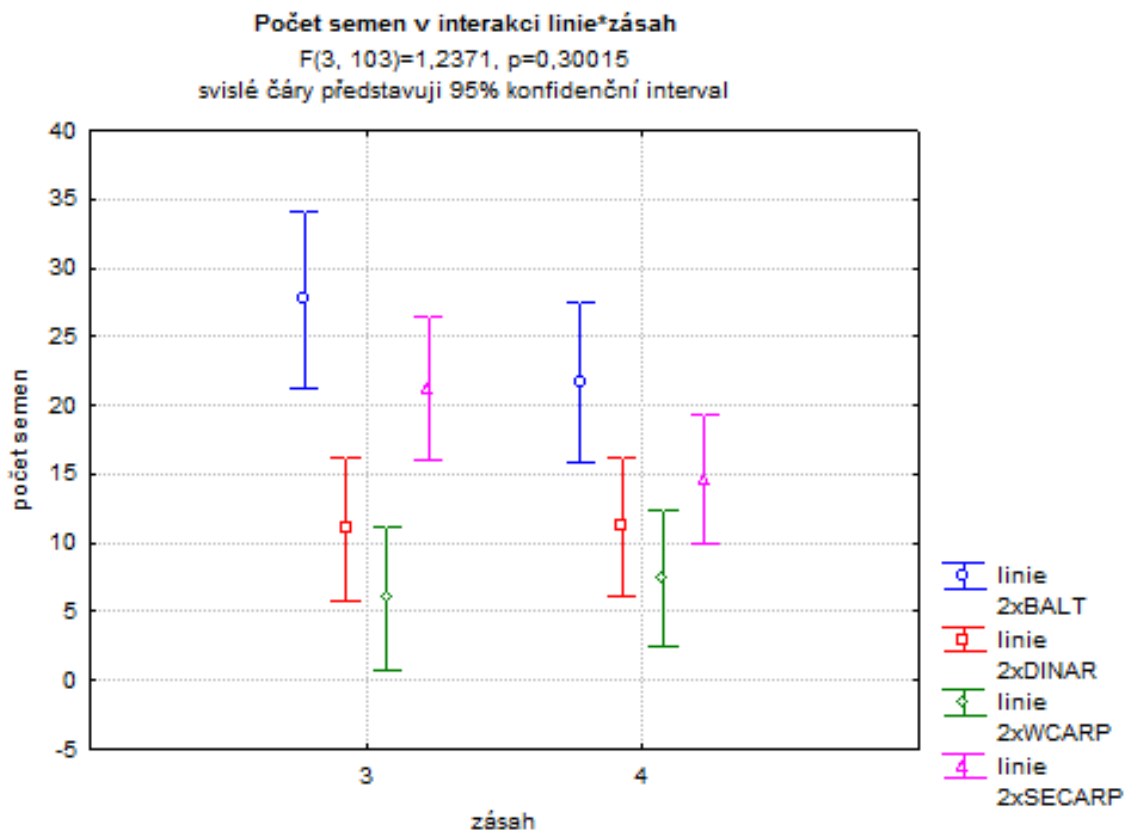


### Model 3

Pro zjištění bariér mezi genetickými liniemi byla porovnána produkce semen z opylení v rámci linie [3] a z opylení mezi liniemi [4] (viz obr. 10). V grafu jsou zobrazeny mateřské linie. Ovlivnění donorem pylu nebylo prokázáno. Na konkrétní bariéry mezi jednotlivými liniemi tedy není možné usuzovat. Linie 2xBALT a 2xSECARP jsou ve [4] jen lehce odchýlené oproti [3].

GLM	Effect (F/R)	SS	Degree of freedom	MS	Den.Syn.Error df	Den.Syn.Error MS	F	p
Intercept	Fixed	25595,15	1	25595,15	7,0024	744,4559	34,38102	0,000621
zasah	Fixed	216,35	1	216,35	103,0000	103,5262	2,08978	0,151323
Linie	Fixed	4915,31	3	1638,44	7,0029	744,2703	2,20140	0,175687
Linie*zasah	Fixed	384,22	3	128,07	103,0000	103,5262	1,23712	0,300151
Populace(Linie)	Random	5216,62	7	745,23	103,0000	103,5262	7,19847	0,000001
Error		10663,20	103	103,53				

Tab. 6. Model 3. Závislost na linii a zásahu není průkazná.



Obr. 10. Porovnání produkce semen z [3] opylení v rámci linie a z [4] opylení mezi liniemi. Zobrazeny jsou mateřské linie. U linií 2xBALT a 2xSECARP můžeme u [4] pozorovat jistý pokles oproti [3].

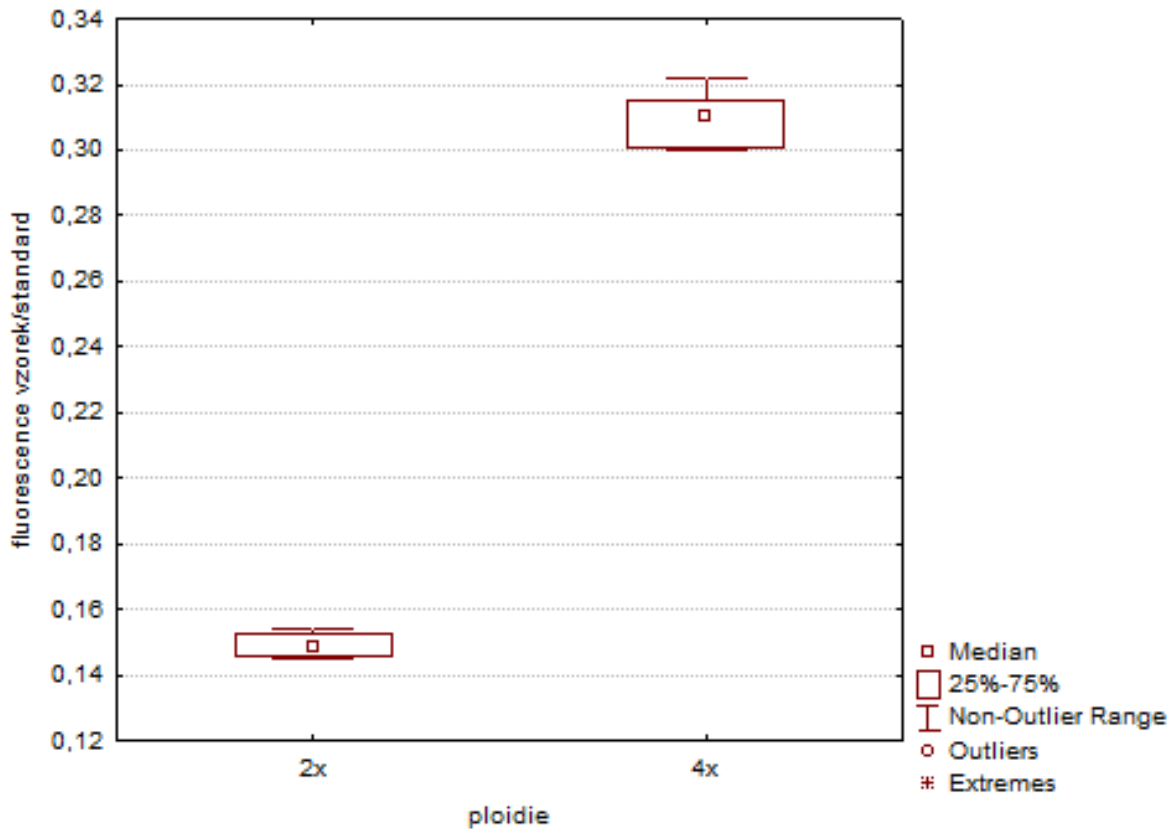
## PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Pomocí průtokové cytometrie byla analyzována semena ze zásahu 5 - meziploidní hybridizace. Semena byla analyzována po dvou kusech, aby bylo ve vzorku dostatečné množství materiálu. Výsledky ukazují, že vznikli i triploidní jedinci (v těchto analýzách byl skutečně jen jeden pík). Rozporuplný je vzorek AA218-A-5, kde kromě tetraploidního píku vznikl ještě pík v 1,5 násobku. Ukazoval byl na endosperm, nicméně ten u semen *Arabidopsis* nebývá, což je ve shodě s ostatními našimi analýzami.

populace	ploidie	materiál	standard	FL vzorku	FL standardu	CV vzorku	CV standardu	poměr	velikost genomu	zjištěná DNAploidie
AA090-C-5	2x	2 semena	S	110,56	631,9	8,81	1,99	0,174964	0,453	2x
AA153-B-5	2x	2 semena	S	148,2	604,29	4,77	1,28	0,245246	0,635	3x
AA215-C-5	4x	2 semena malá	S	196,48	614,34	2,84	1,39	0,319823	0,828	4x
AA215-C-5	4x	2 semena velká	S	193,29	607,02	3,28	0,9	0,318424	0,825	4x
AA218-A-5	4x	2 semena velká	S	195,27	615,11	2,11	0,89	0,317455	0,822	4x
				300,68	615,11	1,78	0,89	0,488823	1,266	endosperm?
AA218-A-5	4x	2 semena malá	S	148,26	610,78	3,52	0,88	0,242739	0,629	3x
AA218-B-5	4x	2 semena malá	S	147,88	612,3	2,41	1,66	0,241516	0,626	3x
AA218-B-5	4x	2 semena velká	S	205,7	612,66	3,94	2,06	0,335749	0,87	4x
AA161-A-5	2x	2 semena	S	nepodařilo se analyzovat						

**Tab. 7.** Přehled výsledků FCM semen.

U analyzovaných rodičovských rostlin byl průměrný poměr relativní fluorescence vzorku a standardu 0,149 u diploidních jedinců a u tetraploidních 0,309. Průměrný koeficient variance vzorku byl 2,79 % a standardu 1,53 %. Relativní velikosti genomu těchto mateřských jedinců, kteří byli použiti pro opylovací pokusy, jsou zobrazeny v obr. 11.



**Obř. 11.** Relativní velikost genomu mateřských rostlin vyjádřená jako poměr fluorescence vzorku a standardu.

## VIABILITA POTOMSTVA

Při porovnání klíčení a růstu ze zásahů autogamie [2] a cizosprášení [3] nebyly odhaleny závislosti na linii, zásahu ani jejich interakci. Při porovnání každého zásahu zvláště však vycházel u obou zásahů marginálně signifikantní vliv linie (pro zásah 2 - tab. 8, pro zásah 3 - tab. 9).

---

**# Data: data.jen2**

# Models:

# mod2.null: sqrt(fitness) ~ 1 + (cas | jedinec)

# mod2: sqrt(fitness) ~ linie + (cas | jedinec)

# Df	AIC	BIC	logLik	deviance	Chisq	Chi Df	Pr(>Chisq)
# mod2.null	5 225.39	237.89	-107.70		215.39		
# mod2	9 224.77	247.26	-103.38		206.77	8.6266	4 0.07114 .

**Tab. 8.** Popis modelu vlivu linie u zásahu 2 v R a výsledky analýzy



---

```

# Data: data.jen3
# Models:
# mod2.null: sqrt(fitness) ~ 1 + (cas | jedinec)
# mod2: sqrt(fitness) ~ linie + (cas | jedinec)
# Df      AIC    BIC    logLik deviance Chisq  Chi Df  Pr(>Chisq)
# mod2.null  5      636.85 654.49 -313.42 626.85
# mod2      13      638.40 684.28 -306.20 612.40 14.445  8 0.07087 .

```

---

**Tab. 9.** Popis modelu vlivu linie u zásahu 3 v R a výsledky analýzy

Růst potomstva byl také porovnán s nadmořskou výškou, ze které pocházely mateřské rostliny. U semen vzniklých cizosprášením v rámci linie byl vliv nadmořské výšky vysoce signifikantní (tab. 10, obr. 12). U semen vzniklých z autogamie vztah s nadmořskou výškou průkazný nebyl.

---

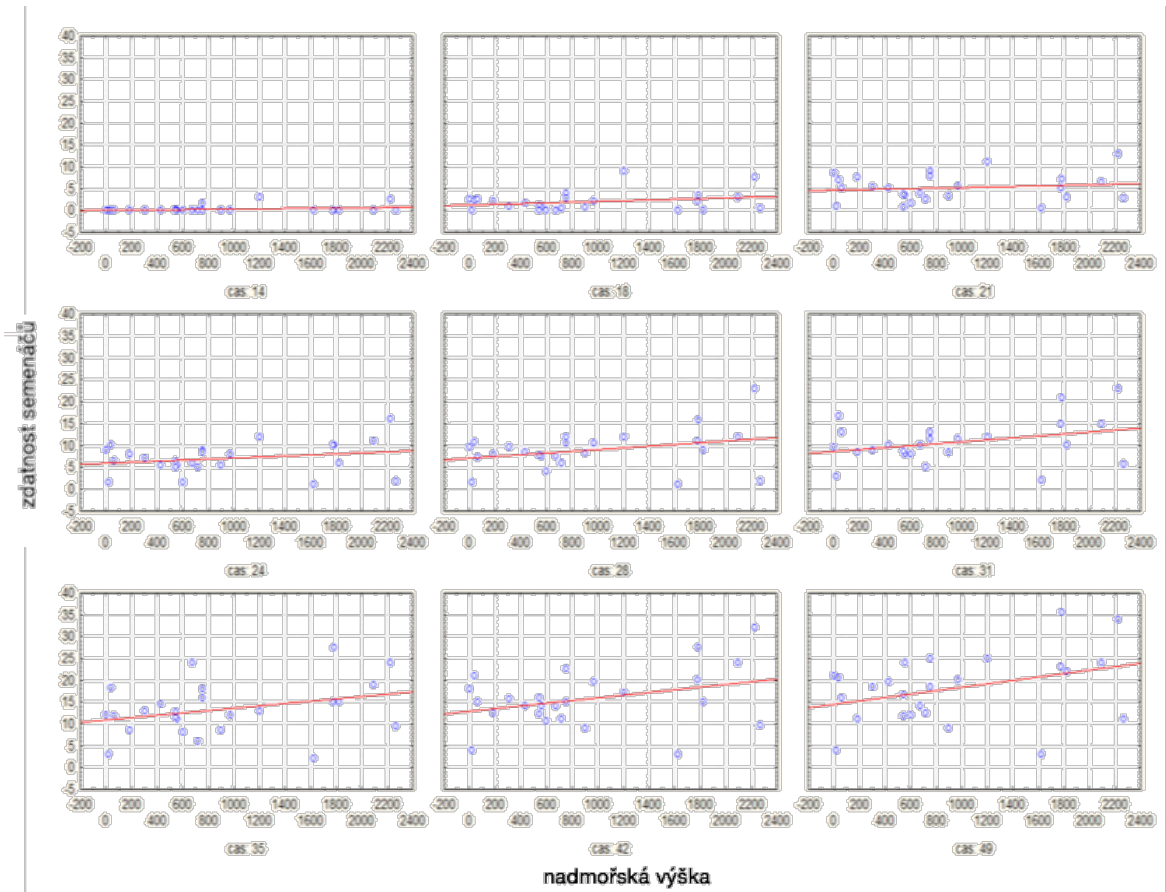
```

Data:3
# Models:
# mod2.null: sqrt(fitness) ~ 1 + (cas | jedinec)
# mod2: sqrt(fitness) ~ altituda + (cas | jedinec)
# Df AIC  BIC  logLik deviance  Chisq Chi Df Pr(>Chisq)
# mod2.null 5 636.85 654.49 -313.42 626.85
# mod2 6 565.33 585.83 -276.67 553.33 73.516  1 < 2.2e-16 ***

```

---

**Tab. 10.** Popis modelu souvislosti růstu potomstva a nadmořské výšky v R a výsledky analýzy



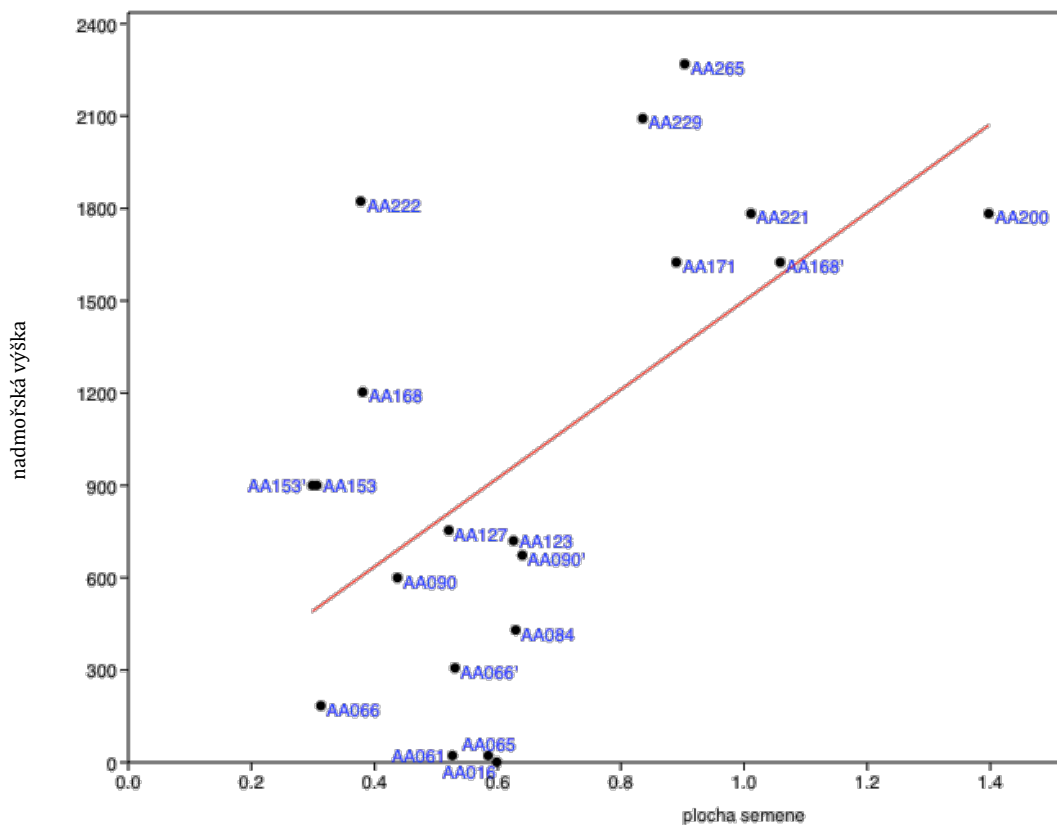
**Obr. 12.** Růst semenáčků ze sprášení v rámci jedné linie v závislosti na nadmořské výšce. Fitness roste s rostoucí nadmořskou. Závislost je patrná po celou dobu experimentu a v čase se prohlubuje.

## VÁHA A VELIKOST SEMEN

Nebyla zjištěna žádná souvislost mezi váhou a rozměry semen se zásahem, linií nebo ploidií. Jisté odlišnosti však byly pozorovány v souvislosti s nadmořskou výškou, ze které pocházely mateřské rostliny (obr. 13 a 14). S rostoucí nadmořskou výškou roste i velikost a váha semen.

Proměnná	Sklon	Chyba	Intercept	Chyba	r	p
B	0.00022504	8.5496E-05	0.40213	0.10391	0.5497	0.018117

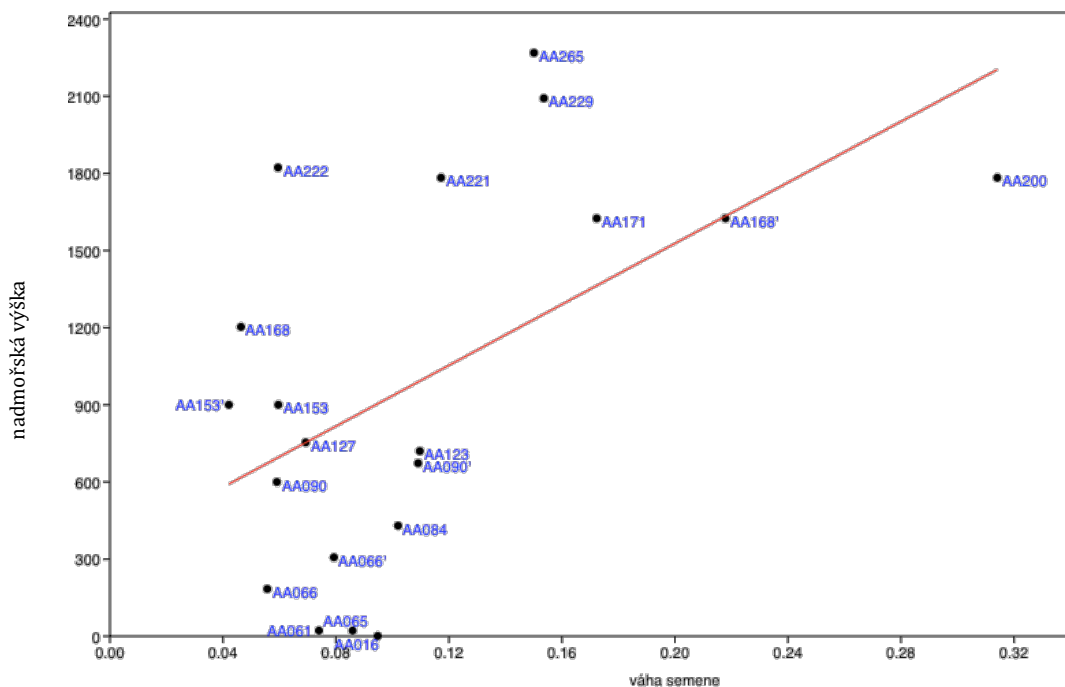
Tab. 11. Výsledek lineární regrese vztahu plochy semene a nadmořské výšky.



Obr. 13. Vztah nadmořské výšky a velikosti (plochy) semene.

Variable	Slope	Error	Intercept	Error	r	p
B	5.3986E-05	2.0441E-05	0.055648	0.024844	0.55099	0.017791

Tab. 12. Výsledek inearní regrese vztahu váhy semene a nadmořské výšky.



Obr. 14. Vztah váhy a nadmořské výšky semene.

## LIFE HISTORY

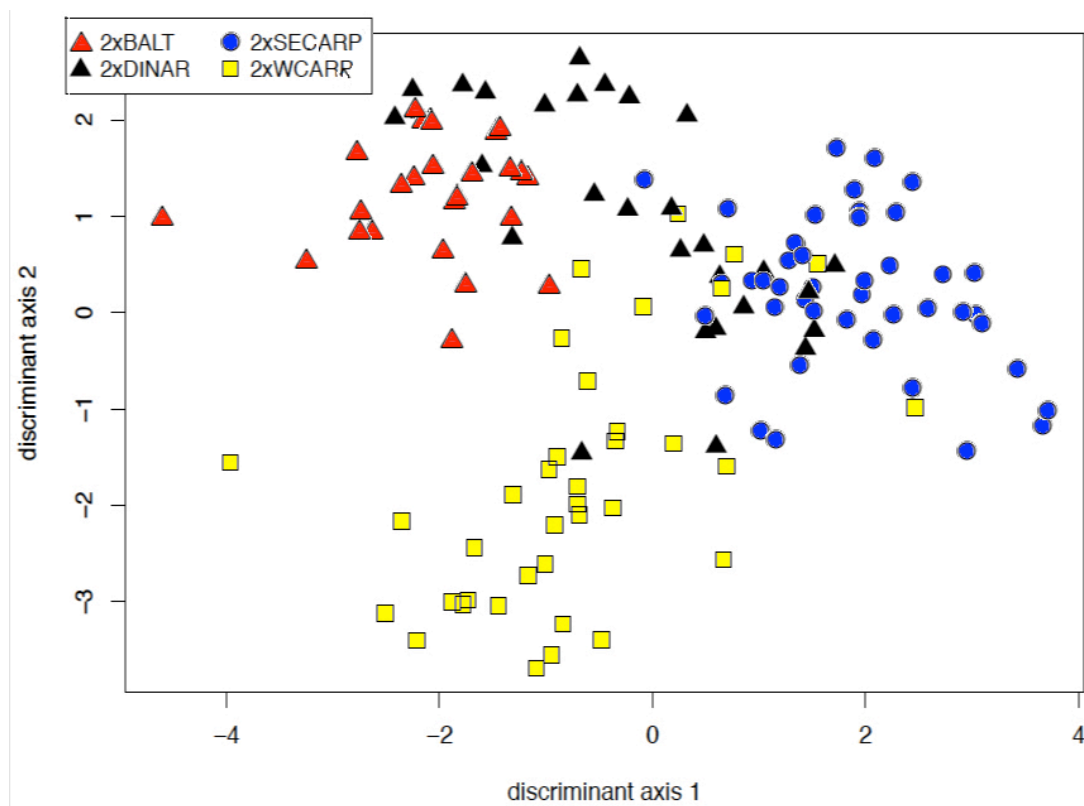
Lineární diskriminační analýza life-history znaků nevytvořila žádné skupiny u tetraploidních jedinců, což nasvědčuje tomu, že jejich rozřazení do linií bude ještě potřeba dále zkoumat. Naproti tomu diploidní linie, které byly stanoveny na základě molekulárních analýz (Kolář et al., 2013), vykazovaly odlišnou morfologii (obr. 15).

Character	Df	ChiSquare	F	Pr..F.
laretal_rosette	1	0.0889509308632128	7.38575812304251	1
G2_rosette_diam	1	0.0262576695854007	2.18022222533866	97
G2_stem_len	1	0.0130946899112034	1.08727600084499	368
G2_N_stems	1	0.154935287356759	12.8645596626843	1
G2_N_branch_lateral_stems_LOG	1	0.185449990240709	15.3982511317926	1
G2_N_branch_main_stem_LOG	1	0.300623565775751	24.9613232976802	1
G2_N_flowers	1	0.229666613714922	19.0696380732107	1
Residual	126	1.51749043253908		

Tab. 13. Korelační matice testování unikátních efektů LDA.

Character	Df	AIC	F	Pr..F.	Character	Df	AIC	F
<none>		149.214046681526			<none>		149.214046681526	
laretal_rosette	1	137.375124197899	14.3611889395	5	laretal_rosette	1	137.375124197899	14.3611889395
G2_rosette_diam	1	145.919324277909	5.320110920991	5	G2_rosette_diam	1	145.919324277909	5.320110920991
G2_stem_len	1	144.552119116367	6.728363251705	5	G2_stem_len	1	144.552119116367	6.728363251705
G2_N_stems	1	136.685467001406	15.116407183556	5	G2_N_stems	1	136.685467001406	15.116407183556
G2_N_branch_lateral_stems_LOG	1	135.125829367376	16.838711400636	5	G2_N_branch_lateral_stems_LOG	1	135.125829367376	16.838711400636
G2_N_branch_main_stem_LOG	1	123.887887406891	29.859469143745	5	G2_N_branch_main_stem_LOG	1	123.887887406891	29.859469143745
G2_N_flowers	1	136.724878578567	15.073144220416	5	G2_N_flowers	1	136.724878578567	15.073144220416
Character	Df	AIC	F	Pr..F.	Character	Df	AIC	F
<none>		149.214046681526			<none>		149.214046681526	

Tab. 14. Korelační testování marginálních efektů LDA.

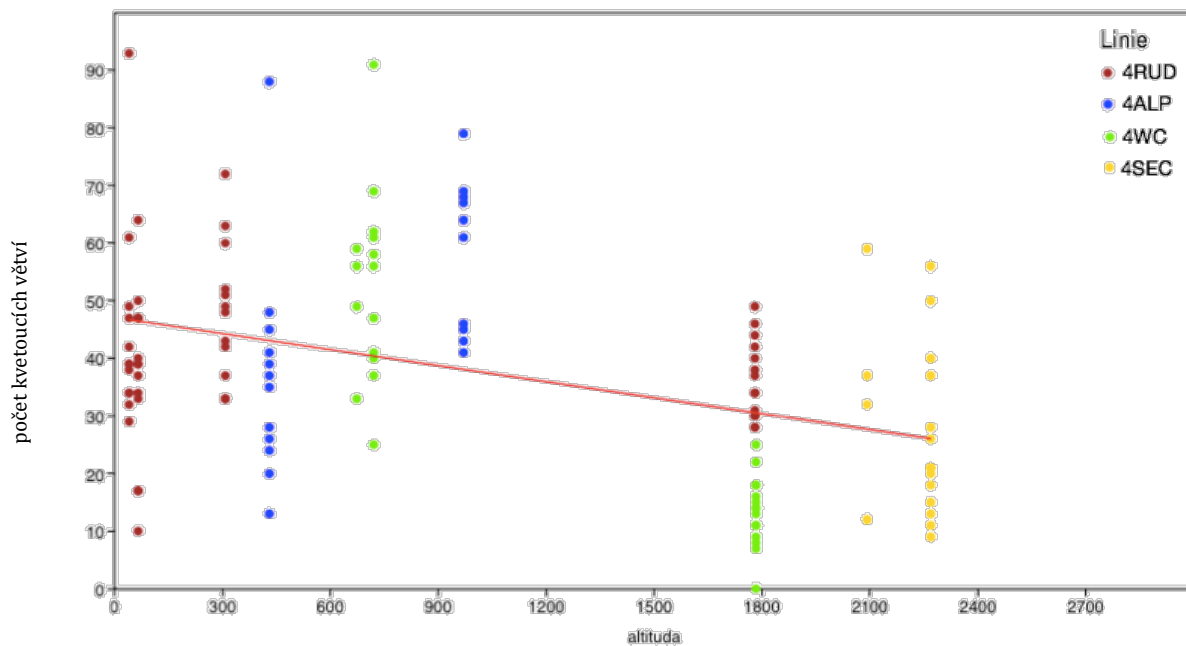


Obr.15. Lineární diskriminační analýza life-history znaků u diploidních jedinců. Graf zahrnuje čtyři linie (viz legenda). Linie tvoří relativně oddělené shluky, což poukazuje na morfologickou variabilitu mezi liniemi v průběhu vývoje rostlin.

Byly porovnávány morfologické znaky s nadmořskou výškou, ze které rostlina pochází. Ze znaků, které byly měřeny, byly pozorovány závislosti počtu kvetoucích větví. Populace z vyšších poloh byly méně rozvětvené než nížinné. Tato souvislost však platila pouze u tetraploidních rostlin (Obr. 16). U diploidů toto srovnání nevykazovalo žádnou souvislost.

Proměnná	Sklon	Chyba	Intercept	Chyba	r	p
B	-0.0092776	0.0018673	47067	2.4283	-0.40609	2.1696E-06

**Tab. 15.** Výsledek lineární regrese pro souvislost počtu kvetoucích větví a nadmořské výšky.



**Obr. 16.** Počet kvetoucích větví závislý na nadmořské výšce. Zobrazeny jsou pouze tetraploidní populace. S rostoucí nadmořskou výškou klesá rozvětvenost rostlin.

## DISKUZE

Stupeň **samosprašnosti** je často klasifikován do tří kategorií: samosprašnost, smíšené rozmnožování a obligátní cizosprašnost. Ačkoli není žádná přesně stanovená hranice, obvykle je stupeň samosprašnosti menší nebo roven 20% považován za obligátní samosprašnost a míra samosprašnosti přesahující 80% za převažující samosprašnost. Populace spadající mezi tyto hranice mají smíšenou rozmnožovací strategii (Goodwillie et al., 2005). Například stupeň samosprašnosti modelového druhu *A. thaliana* může v laboratorních podmínkách dosáhnout až 100%, ale v přírodě bylo pozorováno i malé procento cizosprašnosti (Shimizu et al., 2011). Vzácné cizosprašné události v převážně samosprašné populaci mohou být důležité pro zpomalení kumulace škodlivých mutací (Pamilo et al., 1987).

Podle výsledků této práce převažuje v komplexu *Arabidopsis arenosa* cizosprašnost, ale nelze vyloučit ani jistou - i když omezenou - míru samosprašnosti. To je v souladu s předchozími výzkumy, kterým se také nepodařilo schopnost autogamie spolehlivě vyloučit (Bechsgaard et al., 2006, Bomblies & Weigel, 2010; Willi & Mäattänen, 2010).

Výše již bylo zmíněno, že míra samosprašnosti může být ovlivněna stresem (Ebert et al., 1989). Ačkoli podmínky, ve kterých byly rostliny pěstovány, nebyly pro pokusné jedince viditelně stresující, nelze zcela vyloučit, že pokusní jedinci nebyli vystaveni určité míře stresu způsobené odchylkami od jejich přirozených podmínek nebo oštipováním rozvité květů. Rozsah narušení pletiv však nebyl nijak dramatický - podobné i vyšší míře mechanického poškození může být rostlina běžně vystavena i v přirozených podmínkách (okus herbivory, parazitózy, plísňe atd.).

Při zkoumání **bariér mezi liniemi** byla zaznamenána drobná odchylka pro linie 2xBALT a 2xSECARP. Je možné, že tyto linie hůře přijímají pyl z jiných linií, ovšem nezávisle na tom, ze kterých - ovlivnění donorem pylu nebylo prokázáno. Druhé dvě linie (2xDINAR a 2xWCARP) jsou zřejmě stejně ochotné přijímat pyl z vlastní linie jako z cizí. U blízce příbuzného druhu *Arabidopsis lyrata*, který stejně jako *A. arenosa* není tvořen jedinou přesně definovanou skupinou (Foxe et al., 2010), byly zjištěny izolované

genetické linie (Schmickl et al. 2010). Na základě plodnosti pokusných rostlin v tomto pokusu lze usuzovat na nepřítomnost obdobných reprodukčních bariér mezi liniemi, jako u *A. lyrata*. Zatím však chybí dostatek informací o fertilitě a viabilitě dalších generací, které by mohly výsledky podstatně ovlivnit.

**Meziploidní křížení**, které mělo sloužit jako pilotní pokus, zda rostliny přijímají i pyl z odlišné ploidy, přineslo výsledky, které mluví spíše pro křížitelnost ploidií. Vzniklá semena pravděpodobně jsou triploidními potomky a na blok mezi ploidiemi se tedy zatím usuzovat nedá ani v jednom směru. Genový tok mezi ploidiemi byl již prokázán i u příbuzné *A. lyrata* (Jørgensen, et al. 2011). Triploidní jedinci, kteří byli nalezeni v přírodě (Kolář, et al. 2013, Měsíček, 1970) tak nemusí být pouze produktem neredukovaných gamet, jak by se dalo předpokládat podle jejich výskytu v čistě diploidních populacích (Kolář et al., 2013), ale pravděpodobně mají potenciál vznikat i cestou meziploidní hybridizace.

**Viabilita** F1 potomstva ze zásahu 2 (autogamie) a 3 (opylení v rámci linie) byla odděleně marginálně signifikantní s vlivem linie. To může být následek toho, že rostliny z různých linií reagují odlišně na umělé pěstební podmínky. Pro další studium tohoto tématu by bylo vhodné pokračovat v pozorování potomstva a zjistit vztah mezi mírou samosprašnosti a životaschopnosti semenáčků v konkrétních liniích. Je možné, že některé populace jsou již z předchozích generací zatíženy inbrední depresí (Dapp et al., 2015). V tomto experimentu se však životaschopnost potomstva nelišila v závislosti na tom, zda pocházelo z autogamického nebo alogamického zásahu. Inbrední deprese potomstva zde tedy zachycena nebyla, ale příčinou může být ale i malý vzorek vypěstovaných rostlin.

Byla prokázána závislost životaschopnosti semenáčků na nadmořské výšce, ale pouze u rostlin vzniklých opylením v rámci linie. Fitness s nadmořskou výškou stoupala. Semena rostlin z vyšších nadmořských výšek byla také větší a těžší než z nížinných rostlin, což odpovídá předchozím poznatkům i z jiných rodů, že semena horských rostlin jsou větší a lépe zásobena živinami, aby na přežila v nehostinných podmínkách (Vera,



1997). Je možné, že sjednocení podmínek pro tyto vysokohorské a nížinné rostliny, má za následek lepší životaschopnost horských semen právě díky jejich adaptacím na méně příznivé podmínky, než ve kterých byly pěstovány.

Co se týče **životního cyklu** rostlin, rozdíly byly prokázány pouze u diploidních linií, což je v souladu s faktem, že tetraploidní linie jsou vývojově mladší (15 000 až 19 000 generací), než diploidní (cca 35 generací) (Arnold, et al. 2015). Z toho je možné usuzovat na menší divergenci tetraploidních linií oproti diploidním.

Naproti tomu, tetraploidní linie vykazovaly morfologické odlišnosti v počtu kvetoucích větví v závislosti na nadmořské výšce (nepřímá úměrnost), zatímco diploidní linie ne. U diploidních linií zřejmě byl tento sklon narušen linií 2xBALT, která byla morfologicky velmi výrazně odlišná od všech ostatních - ač nížinná, kvetla zpravidla jen jedním stonkem s jedním apikálním květenstvím.

## ZÁVĚR

Ve většině taxonů spadajících do rodu *Arabidopsis* dochází k častým hybridizacím a polyploidizacím, které produkují nové druhy a poddruhy. Komplex *Arabidopsis arenosa* patří z tohoto hlediska mezi nejkomplicovanější taxony tohoto rodu. Stále ještě zde narážíme na mnoho nejasností ohledně taxonomie, genetické variability a proměnlivosti ve způsobu rozmnožování. Nejasná taxonomická struktura může snadno vést k chybným závěrům a potížím při srovnávání jednotlivých studií.

Tato práce přináší náhled na rozmnožovací systémy komplexu *Arabidopsis arenosa*, který se v posledních letech dostává do popředí díky svým vlastnostem, které z něj činí potenciální modelový organizmus. Ověřuje schopnost autogamie a zjišťuje reprodukční bariéry mezi liniemi a ploidiemi; dále zkoumá rozdíly v životním cyklu jednotlivých linií a populací.

Bylo zde ověřeno, že rostliny komplexu *Arabidopsis arenosa* nejsou zcela autoinkompatibilní a vykazují jistou míru samosprašnosti. Produkce semen z autogamie však byla výrazně nižší, než z cizosprašení.

Bariéry mezi genetickými liniemi nebyly odhaleny ve směru přenosu diploidního pylu na tetraploidní matku ani při přenosu tetraploidního pylu na diploidního mateřského jedince.

V závislosti pouze na linii původu a ploidii se produkce semen výrazným způsobem neliší.

Morfologické rozdíly v life-history znacích byly pozorovány u diploidních linií. Tetraploidní linie jsou zřejmě důsledkem menšího stáří méně divergované. Naproti tomu vztah s nadmořskou výškou byl pozorován právě u tetraploidních linií, které s postupem do vyšších poloh měly méně kvetoucích větví.

V další návaznosti na tuto práci by bylo zajímavé zaměřit se na dlouhodobější pozorování potomstva, na jeho případné projevy inbrední deprese při autogamických pokusech a na počáteční speciaci mezi geneticky odlišnými liniemi, které komplex *Arabidopsis arenosa* nabízí. K dalšímu zkoumání se nabízí i populační ekologie druhu a její vliv na rozmnožovací systémy.

## POUŽITÁ LITERATURA

- **Al-Shehbaz, I.A. & O’Kane, S.L. Jr. 2002.** Taxonomy and Phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists
- **Al-Shehbaz, Ihsan. 2003.** Brassicaceae of the World: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. Version: 2003. <http://flora.huh.harvard.edu/Brassicaceae/>
- **Arnold, B. et al. 2015.** Single geographic origin of a widespread autotetraploid *Arabidopsis arenosa* lineage followed by interploidy admixture. MBE Advance Access
- **Baker, H. G. 1967.** Support for Baker's law-as a rule. *Evolution* 21: 853-856
- **Beck, J.B. et al. 2007.** Further insights into the phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae) from nuclear *Atmyb2* flanking sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 122–130
- **Bechsgaard, J. S., et al. 2006.** The transition to self-compatibility in *Arabidopsis thaliana* and evolution within S-haplotypes over 10 Myr. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1741–1750
- **Berger, B. 1966.** Pollen tube growth in intra- and interspecific combinations. The *Arabidopsis* information resource 03.
- **Bomblies, K., Weigel, D. 2010.** *Arabidopsis* and relatives as models for the study of genetic and genomic incompatibilities. Review. *Philosophical Transactions of the Royal Society B – Biological sciences* 365: 1815–1823
- **Briggs, D., Walters, S. M. 2001.** Proměnlivost a evoluce rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci – 1. české vydání
- **Busch, J.W. & Schoen, D.J. 2008.** The evolution of self-incompatibility when mates are limiting. *Trends in Plant Science* 13:128–36
- **Castric V. et al. 2014.** Trait transitions in explicit ecological and genomic contexts: plant mating systems as case studies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 781:7–36
- **Clauss, M.J. & Koch M.A. 2006.** Poorly known relatives of *Arabidopsis thaliana*. Review. *Trends in Plant Science* 11: 449-459 28

- **Dapp, M. et al. 2015.** Heterosis and inbreeding depression of epigenetic Arabidopsis hybrids. *Nature Plants* 1: 15092
- **Doležal, J. & Göhde, W. 1995.** Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19: 103–106.
- **Doležal, J. et al. 2007.** Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- **Ebert, P.R. et al. 1989.** Genetic polymorphism of self-incompatibility in flowering plants. *Biology* 23: 123–2131
- **Foxe J.P. et al. 2010.** Reconstructing origins of loss of self-incompatibility and selfing in north american *Arabidopsis lyrata*: a population genetic context. *Evolution* 64-12: 3495–3510
- **Goodwillie, C. et al. 2005.** The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual reviews of ecology, evolution and systematics*. 36:47–79
- **Hammer, Ø. et al. 2001.** PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- **Hohmann, N. et al. 2014.** Taming the wild: resolving the gene pools of nonmodel *Arabidopsis* lineages. *Evolutionary Biology* 201414:224
- **Igic, B. & Busch, JW. 2013.** Is self-fertilization an evolutionary dead end? *New Phytol.* 198:386–97
- **Igic, B. & Kohn J. R. 2006.** The distribution of plant mating systems: study bias against obligately outcrossing species. *Evolution* 60: 1098-1103
- **Jakobsson, M. et al. 2006.** A Unique Recent Origin of the Allotetraploid Species *Arabidopsis suecica*: Evidence from Nuclear DNA Markers. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1217-1231
- **Jones, D.F. 1924.** The attainment of homozygosity in inbred strains of maize. *Genetics* 9: 405–418
- **Jørgensen M.H. et al. 2011.** Interspecific and interploidal gene flow in Central European *Arabidopsis* (Brassicaceae). *BMC Evol Biol* 11: 346

- **Kolář, F. et al. 2013.** Cytological variation of *Arabidopsis arenosa* in its Carpathian diversity centre. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, 55: 51-51
- **Lande, R. & Schemske, D.W. 1985.** The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39:24–40
- **Marhold, K. & Suda, J. 2002.** Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii (Fenetické metody). Karolinum, Praha.
- **Mable, B. K. et al. 2004.** Inheritance and dominance of self-incompatibility alleles in polyploid *Arabidopsis lyrata*. *Heredity* 93: 476–486
- **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. Nepublikováno.** Biosystematická studie československých druhů rodu *Cardaminopsis* (C: A. Meyer) Hayek
- **Nautiyal, B.P. et al. 2003.** Germinability, productivity and economic viability of *Rheum emodi* Wall. ex Meissn. cultivated at lower altitude. *CURRENT SCIENCE* 84: 143-148
- **Nasrallah, M.E. et al. 2000.** *Arabidopsis* Species Hybrids in the Study of Species Differences and Evolution of Amphiploidy in Plants. *Plant Physiology* 124: 1605–1614.
- **Nasrallah, J.B. 2000.** Cell–cell signaling in the self-incompatibility response. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 368–373
- **Otto, F. 1990.** DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods in Cell Biology*: 105-110, Academic Press, New York
- **O’Kane, S.L., et al. 1996.** The Origins of *Arabidopsis suecica* (Brassicaceae) as Indicated by Nuclear rDNA Sequences. *Systematic Botany* 21: 559-566
- **Pamilo, P. et al. 1987.** Accumulation of mutations in sexual and asexual populations. *Genet. Res.* 49:135–46
- **Pujol, B. et al. 2009.** Reduced inbreeding depression after species range expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 106:15379–83

- **R Core Team. 2013.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- **Ravi, M., et al. 2008.** Gamete formation without meiosis in Arabidopsis. *Nature* 451: 1121-1125
- **Richards, A. J. 1997.** Plant breeding systems. Ed 2. Chapman and Hall, London etc.
- **Shimizu, K.K. et al. 2011.** Plant sexual reproduction during climate change: gene function in natura studied by ecological and evolutionary systems biology. *Annals of Botany*. 108:777–87
- **Shimizu, K. K. & Tsuchimatsu, T. 2015.** Evolution of selfing: Recurrent patterns in molecular adaptation. *Annual reviews of ecology, evolution and systematics*. 46:593-622
- **Shimizu-Inatsugi R. et al. 2009.** The allopolyploid Arabidopsis kamchatica originated from multiple individuals of Arabidopsis lyrata and Arabidopsis halleri. *Molecular ecology* 18: 4024–4048 30
- **Schmickl, R. & Koch M. A. 2011.** Arabidopsis hybrid speciation processes. Centre for Organismal Studies Heidelberg, Department of Biodiversity and Plant Systematics, University of Heidelberg, D-69120 Heidelberg, Germany
- **Schmickl, R., et al. 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
- **Schmickl, R. et al. 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* 201010:98
- **Sicard, A. & Lenhard, M. 2011.** The selfing syndrome: a model for studying the genetic and evolutionary basis of morphological adaptation in plants. *ANNALS OF BOTANY* 107: 1433-1443
- **Smyth, D. R. et al. 1990.** Early Flower Development in Arabidopsis. *Plant Cell* 2(8): 755–767.
- **Stebbins, G.L. 1940.** The significance of polyploidy in plant evolution. *The American Naturalist* 74:54–66

- **Suda, J. 2004.** An employment of flow cytometry into plant biosystematics. Ms. Disert. práce, depon. in Knihovna katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, Praha.
- **Suda, J. 2005.** Co se skrývá za průtokovou cytometrií? *Živa* 53: 46-48.
- **Takayama, S. & Isogai, A. 2003.** Molecular mechanism of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility. *Journal of Experimental Botany* 54: 149±156
- **Temsch, E.M. et al. 2010.** Genome size in liverworts. *Preslia* 82: 63–80.
- **Trávníček, P. et al. 2012.** Minority cytotypes in European populations of the *Gymnadenia conopsea* complex (Orchidaceae) greatly increase intraspecific and intrapopulation diversity. *Annals of Botany* 110: 977-986
- **Tsuchimatsu, T. et al. 2010.** Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene. *Nature* 464:1342–46
- **Tsuchimatsu, T. et al. 2012.** Recent loss of self-incompatibility by degradation of the male component in allotetraploid *Arabidopsis kamchatica*. *PLOS Genet.* 8:e1002838
- **Tsuchimatsu & Shimizu. 2013.** Effects of pollen availability and the mutation bias on the fixation of mutations disabling the male specificity of self-incompatibility. *Journal of Evolutionary Biology* 26:2221–32
- **Vera, M.L. 1997.** Effects of altitude and seed size on germination and seedling survival of heathland plants in north Spain. *Plant Ecology* 133: 101–106
- **Willi, Y. & Määtänen, K. 2010.** Evolutionary dynamics of mating system shifts in *Arabidopsis lyrata*. *Journal of Evolutionary Biology* 23(10):2123-31.